



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEONARDO RAFFA QUINTANA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTO
FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS:
EFEITO NA ALIMENTAÇÃO DE AVES**

Londrina
2010

LEONARDO RAFFA QUINTANA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTO
FERMENTADO RICO EM
QUITOOLIGOSSACARÍDEOS: EFEITO NA
ALIMENTAÇÃO DE AVES**

Dissertação apresentada ao programa de
Mestrado e Doutorado em Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Raul Jorge Hernan
Castro Gómez

Londrina
2010

LEONARDO RAFFA QUINTANA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTO FERMENTADO
RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS: EFEITO NA ALIMENTAÇÃO
DE AVES**

Dissertação apresentada ao programa de
Mestrado e Doutorado em Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Alexandre Oba
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Suely Mayumi Obara Dói
UEL – Londrina – PR

Londrina, 08 de julho de 2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lúcia e Luiz, pelos grandes valores ensinados a mim e por sempre me apoiarem. Também a minha namorada, Fernanda, pelo apoio, carinho e paciência, além da grande e fundamental ajuda neste trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez pela orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Alexandre Oba do departamento de zootecnia da UEL pela colaboração e sugestões para o trabalho, além da grande ajuda na execução.

Ao prof. Phileno do departamento de ciências patológicas da UEL pelo auxílio em algumas etapas do trabalho.

À aluna Luciana Juliani do curso de medicina veterinária da UEL pela valiosa ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos alunos do curso de zootecnia que ajudaram durante a etapa de criação das aves.

À aluna de pós-graduação Carolina do departamento de ciências patológicas pela ajuda em algumas etapas.

Aos amigos do curso de pós-graduação em ciência de alimentos da UEL pelo apoio e incentivo.

Aos colegas, professores e funcionários do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL e todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

QUINTANA, Leonardo Raffa. **Produção e caracterização de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos**: efeito na alimentação de aves. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2009.

RESUMO

Parte da indústria de carne de frango utiliza antimicrobianos que atuam como promotores de crescimento em aves, podendo causar sérios problemas de resistência microbiana. Logo, esta prática pode se tornar algo perigoso, de maneira que, a busca por novos compostos seguros que atuem melhorando o desempenho zootécnico acompanhado de melhora no sistema imunológico das aves se torna promissor, destacando-se os quitooligossacarídeos por seus efeitos em animais. Assim, este trabalho teve como objetivo obter um produto fermentado rico em quitooligossacarídeos a partir da farinha de crisálida fermentada por *Bacillus* spp DP4, caracterizar este produto e avaliar seus efeitos quando administrado na alimentação de aves. Para isso foi feita fermentação da farinha de crisálida (resíduo da indústria de seda rico em quitina) por *Bacillus* ssp DP4 sob condições já otimizadas para produção e atuação de quitinases, gerando assim fermentado contendo os quitooligossacarídeos. Em seguida, foi feita a caracterização do fermentado quanto à composição química, teor de quitooligossacarídeos e atividades enzimáticas (celulases, amilases, quitinases e ligninases). Fez-se experimento com frangos de corte incorporando o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos em diferentes concentrações (154 ppm, 461 ppm, 769 ppm, 1.080 ppm), e um grupo controle, sendo as rações administradas durante 42 dias de experimento. Durante esse período foi avaliado o desempenho zootécnico das aves (consumo de ração, conversão alimentar, ganho de peso e viabilidade criatória), além da coleta de sangue periódica (7, 21 e 42 dias de idade) para avaliação do sistema imunológico (título de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle, teor de óxido nítrico e contagem diferencial leucocitária) e o abate de animais para a coleta da carne e avaliação da qualidade da mesma (cor, pH, força de cisalhamento e perdas de peso por cozimento). A suplementação da ração para aves com o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos contendo 461 ppm, influenciou no desempenho dos animais reduzindo o consumo de ração em 185 g por animal e mantendo ganho de peso. Igualmente neste grupo, não houve diferenças na qualidade da carne exceto na força de cisalhamento, que foi maior (32,730² Newton/cm²), indicando que a textura da carne do frango era mais firme quando comparada com os outros grupos. Com relação ao sistema imunológico, pode-se verificar que as aves tratadas apresentaram elevação no teor de óxido nítrico com o aumento da idade e proporcional à suplementação da ração com o produto fermentado, diferentemente do grupo controle onde houve redução desse teor. A produção de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle após a vacinação, foi mais acentuada nas aves tratadas com o produto fermentado do que nos animais do grupo controle, porém não houve diferença entre os tratamentos na percentagem de linfócitos e células fagocíticas no sangue.

Palavras-chave: Farinha de Crisálida. *Bacillus* spp DP4. Quitooligossacarídeos. Desempenho e Imunidade de frangos.

QUINTANA, Leonardo Raffa. **Production and characterization of fermented product rich in chitooligosaccharides: effect on poultry feed.** 2009. 77 f. Dissertation (Food Science Master's degree) – State University of Londrina, 2009.

ABSTRACT

The producers and the chicken industry use antimicrobials products that acts as growth promoters and can cause serious problems due to the phenomenon of microbial resistance. The European Union banned the use of these compounds and the purchase of products containing such molecules. Thus, the use of antibiotics as growth promoters may become dangerous, so the search for new safe compounds that act improving performance with improvement in immune system of chicken is promising. Therefore, this study aimed to obtain a fermented product rich in chitooligosaccharides using a substrate containing chrysalis meal (waste of the silk industry rich in chitin) and fermented by *Bacillus* spp DP4, characterize the product and evaluate its effects in poultry feed. The fermentation conditions were already optimized for chitinases production by *Bacillus* spp DP4 and thereby generating a fermented product containing high levels of chitooligosaccharides. This product was mixed with inert vehicle and dried at 45°C. Then, its chemical composition was determinate and also its chitooligosaccharides content and enzymatic activities (cellulases, amylases, chitinases and ligninase). The effect of the fermented product rich in chitooligosaccharides in the poultry feed used 260 broiler chicken that were feed with a basic diet which was added with different concentrations of the fermented product (154 ppm, 461 ppm, 769 ppm and 1080 ppm), and a control group. The diets were administered during 42 days. During this period it was evaluated the performance of the chickens (feed intake, feed conversion, weight gain and production viability), besides the regular collection of blood of some animals in each group (at 7, 21 and 42 days old) to evaluated the immune system (antibodies against Newcastle disease virus, content of nitric oxide and differential leukocyte count) and the slaughter of some animals for the collection of meat to evaluate its quality (color, pH, shear force and the cooking losses). Supplementation of poultry feed with 461 ppm of fermented product rich in chitooligosaccharides influence the performance of the animals by reducing feed intake for about 185 g per animal and maintaining the weight gain when compared with the control group. Also in this group, there was no difference in the meat quality, except in shear force which was higher than others group (32,730 Newton/cm²), indicating that the texture of the chicken meat in this group was stronger. On the immune system, it was found that the treatments with fermented product showed increase in nitric oxide levels with increasing the age of the poultry, proportional to the supplementation of the diet with the fermented product, unlike the control group where there was a reduction of it content. The production of antibodies against Newcastle disease virus after vaccination was more pronounced in birds treated with the fermented product than that of the control group, but there was no difference in the percentage of lymphocytes and phagocytic cells in the blood.

Keywords: Chrysalis meal. *Bacillus* spp DP4. Chitooligosaccharides. Performance and immunity of chicke

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Boxes de alojamento das aves	37
Figura 2 – Determinação das perdas de peso por cozimento	39
Figura 3 – Linfócito, heterófilo e monócito do sangue de frango	41
Figura 4 – Cromatografia em camada delgada do extrato do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos	49
Figura 5 – Concentração de óxido nítrico (NO) em relação aos níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos	59
Figura 6 – Concentração de óxido nítrico (NO) em relação aos dias de idade das aves	59
Figura 7 – Médias observadas do teor de óxido nítrico (NO) em cada nível do produto fermentado rico em em quitooligossacarídeos	60
Figura 8 – Título de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle (VDN) em relação aos dias e idade das aves	62
Figura 9 – Médias observadas do título de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle (VDN) em cada nível do produto	63
Figura 10 – Percentagem de linfócitos em relação aos dias de idade das aves	64
Figura 11 – Percentagem de células fagocíticas em relação aos dias de idade das aves	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de quitina em alguns invertebrados e fungos	21
Tabela 2 – Teor de fibra alimentar total, aminoácidos e minerais da farinha de crisálida	29
Tabela 3 - Composição centesimal e calculada das rações de acordo com a idade das aves	36
Tabela 4 - Composição centesimal (b.s) do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos.....	45
Tabela 5 - Teor de alguns minerais do produto fermentado.....	46
Tabela 6 - Perfil de atividades enzimáticas do fermentado	47
Tabela 7 - Valores do fator de retenção (Rf) da cromatografia em camada delgada para os padrões e amostra do produto fermentado.....	50
Tabela 8 - Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 7 dias de idade	51
Tabela 9 - Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 21 dias de idade	53
Tabela 10 - Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 35 dias de idade	53
Tabela 11 - Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 42 dias de idade	54
Tabela 12 - Resultados da coloração da carne do peito de frangos submetidos a dietas contendo diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos.....	55
Tabela 13 - Resultados das análises de pH, força de cisalhamento e perdas de peso por cozimento das amostras de carne do peito de frangos alimentados com diferentes níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos.....	56

Tabela 14 -Resultado das análises imunológicas de frangos alimentados com diferentes níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos.....	58
Tabela 15 -Análise estatística do teor de óxido nítrico no soro das aves de acordo com cada tratamento nas diferentes idades estudadas	60
Tabela 16 -Análise estatística do título de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle (VDN) no soro das aves de acordo com cada tratamento nas diferentes idades estudadas.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA	15
2.2 ADITIVOS NÃO ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA.....	17
2.3 QUITOOLIGOSSACARÍDEOS	20
2.3.1 Fontes de Obtenção de Quitooligossacarídeos	20
2.3.2 Produção de Quitooligossacarídeos	22
2.3.3 Efeitos dos Quitooligossacarídeos	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÃO DO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS	29
4.1.1 Preparo do Inoculo.....	29
4.1.2 Produção do Fermentado rico em Quitooligossacarídeos	30
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS	30
4.2.1 Composição Centesimal do Produto Fermentado	30
4.2.2 Caracterização Mineral do Produto Fermentado Rico em Quitooligossacarídeos	30
4.2.3 Perfil Enzimático do Produto Fermentado	31
4.2.3.1 Determinação da atividade da enzima celulase-CX	31
4.2.3.2 Determinação da atividade da enzima celulase-C1	32
4.2.3.3 Determinação da atividade lignolítica	32
4.2.3.4 Determinação da atividade amilolítica	32
4.2.3.5 Determinação da atividade quitinolítica	33
4.2.4 Quantificação e Caracterização dos Quitooligossacarídeos do Produto Fermentado	33
4.2.4.1 Quantificação dos quitooligossacarídeos	34
4.2.4.2 Cromatografia em camada delgada.....	34

4.3	AVALIAÇÃO IN VIVO DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS	35
4.3.1	Avaliação do Desempenho Zootécnico dos Animais	37
4.3.2	Avaliação da Qualidade da Carne	38
4.3.2.1	Determinação do pH final e cor da carne do peito dos frangos	38
4.3.2.2	Determinação de perdas de peso por cozimento	38
4.3.2.3	Determinação da força de cisalhamento da carne cozida	39
4.3.3	Avaliação dos Parâmetros Imunológicos	40
4.3.3.1	Contagem diferencial leucocitária	40
4.3.3.2	Quantificação de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle (VDN) pelo método de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	41
4.3.3.3	Quantificação de óxido nítrico (NO)	42
4.3.3.4	Análise estatística do experimento	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS	45
5.1.1	Composição do Produto Fermentado rico em Quitooligossacarídeos	45
5.1.2	Perfil Enzimático do Produto Fermentado Rico em Quitooligossacarídeos	46
5.1.3	Quantificação e Caracterização dos Quitooligossacarídeos do Produto Fermentado	48
5.2	AVALIAÇÃO IN VIVO DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS	51
5.2.1	Análise do Desempenho Zootécnico dos Animais	51
5.2.2	Análises de Qualidade da Carne	55
5.2.3	Parâmetros Imunológicos das Aves	57
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira representa uma das mais importantes cadeias produtivas do país e tem passado por um intenso desenvolvimento, o que faz com que o Brasil ocupe uma posição de destaque no mercado internacional, na produção (3º colocado) e em especial na exportação como principal exportador (ABEF, 2009). Esta alta produtividade foi alcançada pelo Brasil e por outros países principalmente pelo uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (DIONIZIO *et al.*, 2002).

A partir da década de 50, pesquisadores descobriram que dosagens subclínicas de antimicrobianos na ração de aves proporcionavam efeitos favoráveis no crescimento e na eficiência de produção. Esses compostos são eficazes no controle de microrganismos patogênicos, principalmente aqueles que atuam no sistema digestório e respiratório, impedindo que animais criados em uma condição de alta densidade (alto desafio) se tornem enfermos, além de melhorar os índices produtivos, principalmente a conversão alimentar, proporcionando menor custo na criação do animal aliado a qualidade do produto final (DIONIZIO *et al.*, 2002).

Apesar desses benefícios, têm surgido críticas em relação ao uso rotineiro desses aditivos por parte dos órgãos oficiais de saúde pública, de organizações não governamentais, de profissionais ligados à área de produção animal e da população, em particular do mercado externo, para o qual se destina grande parte da produção brasileira de carne de frangos de corte (LODDI *et al.*, 2000).

Assim, desde janeiro de 2006 a Comunidade Européia proibiu a compra de proteína de animais que tenham sido alimentados com antimicrobianos promotores de crescimento, pois estes estão sendo relacionados ao desenvolvimento de resistência cruzada em bactérias patogênicas aos humanos, além de deixar resíduos na carne (GATTASS *et al.*, 2008). Desta forma, a avicultura está se adaptando à nova condição, visto que os atuais índices produtivos podem piorar devido a não utilização destes aditivos (LODDI *et al.*, 2000).

Atualmente essas substâncias ainda são utilizadas em alguns países em razão dos benefícios que apresentam no aumento da eficiência alimentar, na diminuição da mortalidade e na melhoria do bem estar das aves. Diante dessa

situação, torna-se importante pesquisar alternativas para substituir os antimicrobianos usados como promotores de crescimento, sem causar redução na produtividade e aumento no custo de produção (DIONIZIO *et al*, 2002).

Sendo assim, algumas alternativas têm sido empregadas com estes objetivos, tais como adição de mananoligossacarídeos, frutooligossacarídeos, probióticos, ácidos orgânicos e extratos de microrganismos ou plantas na ração ofertada aos animais (GRIGGS; JACOBS, 2005). No entanto, a utilização desses aditivos alternativos deve ser avaliada, não somente como beneficiadores de crescimento, mas também por seus efeitos na qualidade da carne, cortes nobres da carcaça e deposição de gordura abdominal, dentre outros (ALBINO *et al.*, 2006)

A principal vantagem desses aditivos beneficiadores de crescimento, em relação aos antibióticos, é a ausência do fenômeno da resistência bacteriana. Esse fator representa um aspecto importante em relação aos riscos de saúde pública e segurança dos produtos finais (MOTA *et al.*, 2005).

Diante disso, compostos imunomoduladores não-específicos, de preferência de origem natural, começam a ganhar interesse como promotores de crescimento indireto. Estas substâncias podem ser usadas como alternativas para substituir o uso de antibióticos visto que são eficazes em aumentar a imunocompetência e a resistência dos animais a doenças, por não deixarem resíduos no meio ambiente e na carcaça do animal, por não provocarem resistência de microrganismos patogênicos aos humanos e, além disso, algumas pesquisas indicam que esses aditivos possuem propriedades que estimulam o crescimento de frangos de corte (SILVA, 2000).

Alguns carboidratos e seus derivados, incluindo β -glucanas, quitosana e quitooligossacarídeos, têm sido reportados com propriedades imunomoduladoras (KIM; RAJAPAKSE, 2005), o que pode ser interessante para cadeia produtiva de aves.

Quitooligossacarídeos são carboidratos obtidos a partir da hidrólise parcial de quitina ou quitosana, compostos por número variável de unidades de N-acetil-D-glicosamina e/ou D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (LIN *et al*, 2007). Esses açúcares apresentam diversos efeitos benéficos, destacando-se o estímulo de células animais do sistema imunológico não específico (DOU *et al*, 2007), atividades antitumorais (HUANG *et al*, 2006), ação contra hipertensão arterial (HUANG *et al*, 2005), atividade antioxidante (RAJAPAKSE *et al*,

2007) e efeitos antimicrobianos principalmente contra patógenos (WANG *et al*, 2007).

Portanto este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar um produto rico em quitooligossacarídeos oriundo da fermentação de meio a base de farinha de crisálida por *Bacillus* spp DP4, além de sua utilização na alimentação de frangos de corte.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA

A biota digestiva das aves, assim como de outras espécies, é mantida pelo equilíbrio entre os níveis e tipos de bactérias, as quais se estabelecem em diferentes concentrações ou são eliminadas por efeitos bacteriostáticos e/ou bactericida da biota nativa predominante. A função dessa biota, dentre outras, é a de proteger o hospedeiro, impedindo a proliferação de microrganismos com potencial patogênico e/ou produtores de toxinas (PADILHA *et al.*, 2006).

No sistema avícola industrial, a produção de pintainhos ocorre em ambientes artificiais (incubatórios) que procuram reduzir sua contaminação em todas as fases do processo, tornando-os quase estéreis do ponto de vista microbiológico. A ausência de uma microbiota natural, logo após o nascimento, restringe e seleciona a colonização do trato digestório, afetando o equilíbrio adequado da biota e o desenvolvimento intestinal e geral das aves, de modo que o uso de antimicrobianos na alimentação poderia auxiliar a contornar esse problema (PADILHA *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação dos antimicrobianos promotores de crescimento ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que sua atuação ocorre sobre a biota intestinal dos animais, inibindo principalmente o desenvolvimento de bactérias patogênicas, além de reduzir a competição entre as bactérias do trato intestinal e o hospedeiro (FARIA *et al.*, 2009a).

Alguns agentes antimicrobianos são incorporados rotineiramente em rações de frangos. Esta prática vem sendo usada há mais de 50 anos e deriva de observações feitas desde a década de 40, dando conta de que aves criadas intensivamente tinham maior eficiência alimentar quando recebiam doses de antimicrobianos na ração, fazendo com que frangos criados até 40 dias com rações contendo essas substâncias pesassem mais que seus equivalentes criados na ausência de tais moléculas. É uma prática, portanto, que visa maior produtividade e não deve ser confundida com o uso terapêutico ou preventivo (DIONIZIO *et al.*, 2002).

De acordo com Loreçon *et al.* (2007), na década de 80 a segurança dos antimicrobianos passou a ser questionada, principalmente em virtude do seu uso rotineiro na alimentação das aves. A possibilidade dos microrganismos patogênicos adquirirem resistência aos antimicrobianos, devido à adição contínua em doses subterapêuticas nas dietas, é um dos maiores problemas de sua utilização. Também é possível a transferência dessa resistência para microrganismos patogênicos à população humana, chamada resistência cruzada (MOTA *et al.*, 2005).

O uso de drogas antimicrobianas tanto em animais quanto no homem, determina aumento da resistência aos antimicrobianos nos microrganismos de sua microbiota normal e bactérias patogênicas. Segundo Mota *et al.* (2005), somente 50% dos antimicrobianos produzidos são utilizados na terapia humana. A outra metade é empregada na profilaxia, tratamento ou como promotores de crescimento animal, e no extermínio de pragas na agricultura.

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública. Há evidências de que o tratamento indiscriminado de animais com antimicrobianos torna seus produtos e derivados contaminados com microrganismos resistentes e com potencial para transmissão dessa resistência à microbiota natural dos seres humanos, assim como à microrganismos patogênicos (MOTA *et al.*, 2005).

Em 1999, a Comunidade Européia banuiu o uso de tilosina, virgiamicina, espiramicina e bacitracina de zinco como antimicrobianos promotores de crescimento. Esta atitude foi parte de um plano para erradicação total do uso de tais substâncias a partir de janeiro de 2006 (GATTASS *et al.*, 2008).

A retirada total dos antimicrobianos promotores de crescimento resulta em menor lucratividade para o setor, pois acarreta em diminuição média do desempenho de 3 a 7%, com impacto negativo sobre a saúde animal e a mortalidade. Com isso, há a necessidade de se introduzir estratégias novas a fim de contornar esses efeitos negativos (TOLEDO *et al.*, 2007). Nesse contexto, tem aumentado a procura por aditivos alimentares alternativos que garantam máximo crescimento dos animais e mantenham a qualidade final do produto (DIONIZIO *et al.*, 2002).

2.2 ADITIVOS NÃO ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA

A contínua busca pela máxima eficiência alimentar na avicultura, assim como em outras criações animais, tem se tornado tema central de pesquisas, sendo os aditivos alimentares de qualquer categoria de grande relevância por contribuírem para um melhor desempenho dos animais (PELICANO *et al.*, 2004).

Devido à problemática do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, pesquisas com outras substâncias, preferencialmente de origens naturais, tem tido maior atenção (GUO *et al.*, 2004). Esses aditivos em substituição aos antimicrobianos podem ser de diferentes categorias tais como probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, extratos de plantas e enzimas (GRIGGS ; JACOBS, 2005).

Probióticos são microrganismos que, quando ingeridos, causam efeitos benéficos ao hospedeiro, podendo ser administrada apenas uma espécie do microrganismo probiótico ou associações com duas ou mais espécies. Na avicultura e demais criações animais costumam-se utilizar associações de microrganismos por apresentarem melhor eficiência, aonde *Bacillus subtilis* destaca-se como principal microrganismo probiótico para animais (GRIGGS ; JACOBS, 2005).

Pelicano *et al.* (2004) verificaram que o uso de dois tipos de probióticos diferentes na alimentação de frangos de corte não causou diferenças no ganho de peso, consumo de ração e viabilidade quando avaliados de 1 a 21 dias e de 1 a 42 dias de idade. Entretanto, esses mesmos autores observaram que esses probióticos administrados diminuíram o índice de conversão alimentar nos animais avaliados de 1 a 21 dias, tornando-os mais eficientes na transformação da ração ingerida em ganho de peso.

Faria *et al.* (2009a) concluíram que o uso de probióticos é tecnicamente viável e caracteriza-se como alternativa aos promotores de crescimento antimicrobianos. Além disso, verificaram que a viabilidade dos probióticos utilizados em frangos de corte não é alterada pelo uso conjunto de monensina sódica (agente anticoccidiano) e da avilamicina (promotor de crescimento antimicrobiano). No entanto, a virginiamicina (promotor de crescimento antimicrobiano) pode comprometer a viabilidade dos probióticos.

Os prebióticos, outra categoria de aditivo que tem sido extensamente pesquisada, são carboidratos não digeríveis geralmente de cadeias longas, podendo se apresentar também em cadeias menores os quais são chamados de oligossacarídeos (GRIGGS ; JACOBS, 2005).

Os efeitos benéficos causados pelos prebióticos se devem principalmente à capacidade de alterar a microbiota do hospedeiro, estimulando o crescimento de bactérias probióticas que possuem a capacidade de digerir tais açúcares, trazendo efeitos benéficos, além de diminuir a população de microrganismos patogênicos. Outros efeitos sistêmicos causados pela ingestão de prebióticos ainda não estão totalmente conhecidos, como modulação do sistema imunológico do hospedeiro (ALBINO *et al.*, 2006).

Albino *et al.* (2006) comparou o uso de um aditivo promotor de crescimento antimicrobiano adicionado de prebiótico a base de mananoligossacarídeos da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, constatando que o uso desse prebiótico pode ser uma alternativa relevante na avicultura por proporcionar às aves tratadas desempenho similar aos animais alimentados com promotor de crescimento antimicrobiano.

O uso de probióticos e prebióticos associados, chamado de simbiótico, é uma alternativa promissora na criação de aves, pois em animais tratados com simbióticos não foram encontradas diferenças no desempenho quando comparadas com animais tratados com promotor de crescimento antimicrobiano (MAIORKA *et al.*, 2001)

Os ácidos orgânicos, outro tipo de aditivo que pode ser usado na avicultura, são ácidos graxos de cadeia curta como, por exemplo, ácido acético, propiônico, butírico, fumárico, fórmico, dentre outros. Eles podem agir diminuindo a proliferação de microrganismos patogênicos no intestino das aves, inibindo o desenvolvimento de fungos nas rações e potencializando ganhos nutricionais (FARIA *et al.*, 2009b).

O uso dos ácidos láctico, acético e fórmico na ração juntamente com ácido fosfórico na água melhorou o ganho de peso de frangos de corte em comparação ao uso de dietas isentas de antimicrobianos promotores de crescimento (VIOLA *et al.*, 2008).

Todavia Faria *et al.* (2009b) não verificaram diferenças no desempenho e em rendimento de carcaça de frangos de corte aos 42 dias quando

alimentados com ração contendo ácido fumárico e ácido propiônico associado ao ácido fórmico. Contudo os mesmos autores verificaram diminuição do pH das rações contendo ácido propiônico e fórmico, o que pode ser importante para o controle de microrganismos na ração.

O uso de extratos de plantas como aditivos se baseiam principalmente na utilização de óleos essenciais devido às suas características antimicrobianas com potencial de inibir microrganismos patogênicos para frangos, evitando infecções (GRIGGS; JACOBS, 2005).

Outra categoria de aditivos que merece destaque é o uso de enzimas exógenas, isto porque o uso destas em dietas para aves pode aumentar a digestibilidade dos nutrientes e o valor nutritivo das dietas formuladas com milho e soja, resultando em melhor desempenho de frangos (SARTORI *et al.*, 2007).

Segundo Silva *et al.* (2000b), as enzimas exógenas aumentam a digestibilidade e a eficiência dos alimentos, reduzindo a ação de inibidores de crescimento, sobretudo os polissacarídeos não-amiláceos, encontrados como componentes estruturais das paredes celulares dos cereais, auxiliando as enzimas endógenas nos processos digestivos.

Garcia *et al.* (2000) concluíram que a adição de complexo multienzimático em rações com farelo de soja integral extrusada para frangos de 1 a 42 dias foi efetiva na melhora da utilização de energia metabolizável, proteína e aminoácidos (metionina, metionina+cistina e lisina) em 9, 7, e 5%, respectivamente.

Gao *et al.* (2008) observaram melhor desempenho de frangos de corte alimentados com a enzima xilanase em rações a base de trigo, sendo esta melhora devido a influência da enzima na digestão e absorção dos nutrientes.

Assim, o uso de aditivos não antimicrobianos tem sido impulsionado tanto pelas pesquisas com resultados promissores como por políticas econômicas, as quais impedem ou dificultam a compra de proteínas de animais que tenham sido alimentadas com aditivos antimicrobianos (GATTASS *et al.*, 2008).

Diante desse contexto, o uso de quitooligossacarídeos na alimentação não só de frangos, mas de outros animais, se torna muito interessante devido aos efeitos fisiológicos atribuídos a essas moléculas como estímulo de células do sistema imunológico não específico de animais (DOU *et al.*, 2007), atividades antitumorais (HUANG *et al.*, 2006), ação contra hipertensão arterial

(HUANG *et al*, 2005), atividade antioxidante (RAJAPAKSE *et al*, 2007) e efeitos antimicrobianos principalmente contra patógenos (WANG *et al*, 2007).

Além disso, Zhou *et al.* (2009) alimentaram frangos de corte com quitooligossacarídeos e observaram melhoras na qualidade da carne dessas aves devido à redução da gordura, assim como o aumento do colesterol HDL no sangue dos animais.

2.3 QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

2.3.1 Fontes de Obtenção de Quitooligossacarídeos

O composto do qual se obtém os quitooligossacarídeos é a quitina. Esta substância é um polímero linear insolúvel em água no qual a unidade repetitiva é o N-acetil-D-glicosamina unidos por ligação glicosídica do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (THARANATHAN ; KITTUR, 2003).

A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na biosfera sendo superada apenas pela celulose. Além disso, a quitina e a celulose possuem características estruturais semelhantes e atuam como invólucros protetores e materiais de suporte e defesa nos organismos em que ocorrem. A quitina encontra-se na matriz da estrutura esquelética de invertebrados como artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, em algas diatomáceas, além de estar presente também nas paredes celulares de alguns fungos como ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Teor de quitina em alguns invertebrados e fungos (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007)

Quitina (% em massa)	
CRUSTÁCEOS	
<i>Callinectes</i> spp (caranguejo-azul)	14,0 ^a
<i>Pleurocondes</i> spp (caranguejo-vermelho)	10,4 ^a
<i>Cragon</i> spp (camarão)	69,1 ^b
<i>Nephrops</i> spp (lagosta)	69,8 ^b
INSETOS	
<i>Bombyx</i> spp (bicho da seda)	44,2 ^b
<i>Periplaneta</i> spp (barata)	2,0 ^b
MOLUSCOS	
Conchas de ostras	3,6
FUNGOS	
<i>Aspergillus niger</i>	42,0 ^c
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20,1 ^c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9 ^c

a) massa úmida do corpo; b) fração orgânica da cutícula; c) massa seca da parede celular

Assim como na celulose as ligações são do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, definindo-se assim os terminais redutor e não-redutor das cadeias poliméricas, os quais correspondem às extremidades que contêm grupo hidroxila livre ligado ao carbono 1 (terminal redutor) e carbono 4 (terminal não-redutor) (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

O fato de que a quitina pode ser extraída da biomassa, e mesmo a partir de matérias-primas abundantes e relativamente baratas – consideradas como refugos principalmente da atividade pesqueira voltada para exploração industrial de frutos do mar - é um fator importante em favor de sua produção a baixos custos e diversas utilizações. Entretanto, deve ser reconhecido que, em se tratando de produto natural cuja biossíntese não está sob estrito controle genético, ocorrem variações de composição além da mesma raramente ocorrer em forma pura (THARANATHAN ; KITTUR, 2003).

Outro polímero de onde se pode obter quitooligossacarídeos é a quitosana. Esta substância pode ocorrer naturalmente em alguns fungos, contudo o mais comum é sua obtenção pela desacetilação da quitina (CAMPANA-FILHO; SINGNINI, 2001). A quitosana, assim como a quitina, é insolúvel em água, e o grau de desacetilação pode ser variado dependendo do processo utilizado (ácido ou

alcalino), o tempo de reação, assim como a fonte da quitina utilizada (SILVA *et al.*, 2006).

Apesar da quitosana não ser hidrossolúvel ela pode ser solubilizada em soluções de ácidos orgânicos como acético, fórmico, cítrico, dentre outros. Isto, aliado às propriedades de biocompatibilidade e baixa toxicidade, tornaram o uso da quitosana bastante difundido com diversos empregos (JEON *et al.*, 2001). Este polímero pode agir como floculante em tratamentos de efluentes, resina quelante na remoção de metais pesados (JOSUÉ *et al.*, 2000), além de várias propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, efeito analgésico, efeito coagulante, estimulante da cicatrização, efeito hipocolesterolêmico e redução de peso, sendo que para ocorrer a maioria desses efeitos a quitosana é quebrada liberando quitooligossacarídeos, os quais são as moléculas que efetivamente causam os efeitos mencionados (SILVA *et al.*, 2006).

2.3.2 Produção de Quitooligossacarídeos

O uso de enzimas ou complexos enzimáticos para produção de quitooligossacarídeos a partir de quitina ou quitosana é muito comum. A utilização de um extrato bruto contendo complexo enzimático com atividade quitinolítica de *Paenibacillus illioisensis* produziu um total de 2,21 mg/mL de uma mistura de quitooligossacarídeos após 24 horas de reação com quitina em tampão acetato de sódio e pH 5,0 (JUNG *et al.*, 2007).

Em estudo de Jeon *et al.* (2001), quitooligossacarídeos foram obtidos utilizando um biorreator de membrana com quitosanase de *Bacillus* spp imobilizada, a partir de uma solução ácida de quitosana, a qual passava pelo sistema com fluxo de 5 mL por minuto à 45 °C. Este mesmo método foi empregado em outras situações apenas com algumas alterações (KIM; KIM, 2006; JUNG *et al.*, 2006).

Algumas outras enzimas além de quitinases ou quitosanases também podem apresentar esse tipo de atividade em condições específicas como, por exemplo, o uso de pectinase de *Aspergillus niger* adicionada em solução ácida

(pH 3,0) de quitosana durante seis horas, sendo o resultado final uma mistura de quitooligossacarídeos (KITTUR *et al.*, 2005).

A obtenção de quitooligossacarídeos a partir de quitina ou quitosana também pode ser realizada através de ruptura desses polímeros por atividade química, como por tratamentos com soluções ácidas ou alcalinas. De forma geral, a ação enzimática produz quitooligossacarídeos com polimerização menor e a ação química gera oligossacarídeos de polimerização maiores (CABRERA; CUTSEM, 2005).

Utilizando mistura de enzimas (celulases, lipases e proteases) a 40 °C durante 40 minutos em uma solução ácida de quitosana (pH 5,6), é possível obter uma mistura de quitooligossacarídeos onde as maiores concentrações são de oligômeros que possuem entre três e dez unidades monoméricas, as quais possuem os melhores efeitos fisiológicos (ZHANG *et al.*, 1999; DOU *et al.*, 2007). Além disso, é possível se obter quitooligossacarídeos utilizando apenas celulase a partir de uma solução de quitosana a 5 % em tampão com pH 5,2, sob temperatura de 55 °C durante nove horas com agitação constante (WU; TSAI, 2007).

Em estudo de Prashanth e Tharanathan (2005) a mistura de quitooligossacarídeos utilizada foi obtida a partir de uma solução de quitosana a 1 % em ácido acético 0,5 %, onde foi borbulhado nitrogênio a 60 °C sob agitação, com adição de solução de persulfato de potássio 0,8 mM para completar a reação. Em seguida, foi feita diálise para alcançar maior pureza do produto.

Ainda que a obtenção de quitooligossacarídeos possa ser feita de diversas formas, enzimática ou química, as reações enzimáticas podem proporcionar produtos que desempenham melhores efeitos biológicos (ZHANG *et al.*, 1999). A utilização de enzimas específicas para a quebra dos polímeros quitina e quitosana (quitinases e quitosanases) são mais eficientes para produção de quitooligossacarídeos do que a utilização de outras enzimas que também possam apresentar essa atividade quitinolítica, como algumas proteases e celulases (KITTUR *et al.*, 2005).

2.3.3 Efeitos dos Quitooligossacarídeos

O óxido nítrico pode desempenhar várias funções em seres vivos como, por exemplo, a de neurotransmissor e molécula de defesa do sistema imune (NASSEM, 2005). Em estudo realizado com macrófagos oriundos de cultura celular, foi demonstrada a capacidade dos quitooligossacarídeos, juntamente com Interferon- γ , de estimular a síntese de óxido nítrico (WU; TSAI, 2007).

Dou *et al.* (2007) observaram a capacidade dos quitooligossacarídeos de atuarem como agentes reguladores da atividade de neutrófilos extraídos de camundongos, estimulando a produção de anion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico, fazendo com que estas células mostrassem elevada capacidade de ação antimicrobiana. Além disso, neutrófilos durante a fase aguda de resposta do sistema imune permanecem excessivamente ativados podendo causar danos aos tecidos, de modo que foi verificado o controle dessa ativação exacerbada pelos quitooligossacarídeos (DOU *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo é reconhecido como um fator importante em doenças crônicas como diabetes, artrite e complicações cardíacas, existindo relações diretas ou indiretas com espécies reativas de oxigênio geradas pela atividade celular. Desta maneira, em estudo realizado com culturas celulares de camundongos e humanos verificou-se a atividade de quitooligossacarídeos carboxilados e não carboxilados no controle de enzimas que geram espécies reativas de oxigênio, na estimulação de compostos antioxidantes produzidos pelas próprias células, além dos próprios açúcares, principalmente carboxilados, atuarem como agentes antioxidantes através da doação de prótons da molécula (RAJAPAKSE *et al.*, 2007).

A utilização de quitooligossacarídeos, principalmente de baixa massa molecular (menor que 5 KDa), na alimentação de camundongos fêmea, as quais foram retirados os ovários, demonstrou a capacidade desses açúcares em aumentar a biodisponibilidade do cálcio, podendo assim ser usado como complemento à dietas especiais ricas neste mineral (JUNG *et al.*, 2006).

Byun *et al.* (2005) verificou que quitooligossacarídeos de baixa massa molecular (entre 1 e 5 KDa) foram eficientes como agentes inibidores da

enzima β secretase. Esta enzima, juntamente com a γ -secretase, promovem a endoproteólise das proteínas precursoras de β -amilóide, ao passo que o acúmulo no cérebro desta última (β -amilóide) está associado à doença de Alzheimer (BYUN *et al.*, 2005).

Camundongos com tumores induzidos e tratados com quitooligossacarídeos injetados intraperitonealmente nas quantidades de 50 e 100 microgramas, principalmente os açúcares com seis e sete unidades repetitivas de N-acetilglicosamina, apresentaram diminuição na angiogênese, ou seja, diminuição da vascularização na região tumoral, além de induzirem a apoptose das células defeituosas (PRASHANTH; THARANATHAN, 2005).

A enzima conversora de angiotensina I (ACE) tem papel importante no desenvolvimento de hipertensão arterial por produzir a angiotensina II, a qual é um potente vasoconstritor, além de degradar compostos vasodilatadores (ROUSSEAU-PLASSE *et al.*, 1996), de maneira que a inibição dessa enzima é uma importante técnica terapêutica para o controle da hipertensão. Desta forma, há uma grande demanda por produtos naturais capazes de inibir a atividade dessa enzima como, por exemplo, alimentos que possuam compostos com tal propriedade, já que o uso de inibidores sintéticos geralmente causa efeitos colaterais indesejáveis (BALA *et al.*, 2002). Assim, em estudo realizado *in vitro* constatou-se a atividade inibitória da enzima ACE por quitooligossacarídeos, principalmente por moléculas carboxiladas (PARK *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2005).

Os quitooligossacarídeos, além de apresentarem diversos efeitos positivos em testes realizados *in vitro*, mostram-se viáveis para pesquisas *in vivo* dentre outras características por não apresentarem reações indesejáveis em contato com o sangue (LIN; LIN, 2003). Quitobiose e quitotriose, dois quitooligossacarídeos compostos por duas e três unidades de N-acetilglicosamina respectivamente, apresentaram atividade antioxidante satisfatória em análises *in vitro*. Além disso, essas moléculas administradas oralmente na concentração de 100 mg/Kg foram absorvidas pelo intestino de camundongos, demonstrando grande potencial para uso desses compostos como agentes antioxidantes (CHEN *et al.*, 2003).

Além disso, quitooligossacarídeos desempenham diversas atividades em plantas como estímulo da síntese de compostos importantes no desenvolvimento da planta, além de induzir a divisão celular e ativar a expressão de

genes envolvidos no mecanismo de defesa dos vegetais (KASPRZEWSKA, 2003). Desta forma, quitooligossacarídeos com oito unidades de N-acetilglicosamina são capazes de promover respostas celulares mais intensas, enquanto os quitooligossacarídeos compostos por quatro unidades (quitotetraose) são os que possuem a menor massa molecular possível para desencadear respostas nos tecidos vegetais (KASPRZEWSKA, 2003).

Cotilédones de sementes de trigo tratados com soluções de quitooligossacarídeos em concentrações que variaram de 0,01 a 100 mg/L apresentaram aumento na atividade de peroxidases aniônicas, envolvidas em processos de lignificação e de defesa, demonstrando assim ação eliciadora nos mecanismos de defesa de tecidos vegetais (YUSUPOVA *et al.*, 2005).

Burkhanova *et al.* (2007) realizou experimento utilizando sementes de trigo imersas em solução de quitooligossacarídeos (5 – 10 KDa) a 1 mg/L durante 3 horas, posteriormente colocadas para germinação. As plantas sofreram infecção com o fungo *Bipolaris sorokiniana* após dez dias de germinação e, em determinados intervalos de tempo após a infecção, foram feitas amostragens para avaliação da resistência das plantas à infecção. Os resultados mostraram melhor resistência pelas plantas oriundas de sementes tratadas com a solução dos quitooligossacarídeos, constatando-se a presença de níveis mais elevados de citocininas, além da indução para expressão do gene que codifica a isoperoxidase.

Os quitooligossacarídeos também apresentam atividades antimicrobianas. Desta forma, os grupamentos aminos carregados positivamente desses compostos ligam-se às moléculas de ácido teicóico e isoglutamato da espessa camada de peptideoglicano de bactérias gram-positivas, distorcendo e até mesmo causando rupturas em sua parede celular, fazendo com que haja desequilíbrio osmótico e conseqüente morte celular (KUMAR *et al.*, 2005; KITTUR *et al.*, 2005). No caso de bactérias gram-negativas, os grupamentos aminos dos quitooligossacarídeos se relacionam de forma iônica com estruturas da camada de lipopolissacarídeo (LPS), dificultando o transporte de nutrientes e provocando morte celular (KUMAR *et al.*, 2005; KITTUR *et al.*, 2005).

Além de bactérias os quitooligossacarídeos também apresentam efeitos antagônicos para fungos, como mostrado em trabalho de Wang *et al.* (2007), onde foi avaliada a atividade antifúngica e antibacteriana de quitooligossacarídeos, quitinases e quitosana. Assim, verificou-se que o grau de ação antimicrobiana

aumentava enquanto o grau de polimerização dos quitooligossacarídeos diminuía, além de se observar que a quitosana mostrou menor inibição em relação aos oligômeros ao passo que as quitinases obtiveram taxas de inibição semelhantes.

Todavia, em estudo de Jeon *et al.* (2001) foi verificado que os quitooligossacarídeos de maior massa molecular apresentaram melhores resultados de inibição de crescimento bacteriano, principalmente de patógenos como *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*, embora a quitosana tenha apresentado os melhores resultados de atividade antibacteriana. De qualquer modo é preciso ressaltar que quitosana é um polímero insolúvel, ao contrário dos quitooligossacarídeos, o que torna estes últimos mais interessantes para aplicações como conservantes (KUMAR *et al.*, 2005).

A mistura de quitooligossacarídeos produzidos por hidrólise enzimática de quitina a partir da concentração de 0,01% inibiu completamente o crescimento de *Escherichia coli* cultivada em meio líquido (JEON; KIM, 2000).

Kittur *et al.* (2005) verificaram a inibição do crescimento de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* por ação de misturas de quitooligossacarídeos e dos mesmos individualmente. De maneira que ao se usar polímeros com seis unidades de N-acetilglicosamina (hexâmeros) obteve-se a maior taxa de inibição de ambos os microrganismos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, caracterizar e utilizar na alimentação de frangos de corte produto rico em quitooligossacarídeos oriundo da fermentação de meio a base de farinha de crisálida por *Bacillus* spp DP4.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição centesimal, fibra alimentar, teor de quitooligossacarídeos e mineral do produto fermentado;
- Determinar a atividade quitinolítica, lignocelulolítica e amilolítica do produto fermentado;
- Avaliar o desempenho zootécnico de frangos de corte alimentados com o produto fermentado;
- Avaliar a qualidade da carne dos frangos alimentados com o produto fermentado quanto ao pH, cor, textura e perdas de peso por cozimento;
- Avaliar parâmetros imunológicos de frangos de corte alimentados com diferentes concentrações do produto fermentado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), no Departamento de Ciências Patológicas e na Fazenda Escola, todos da Universidade Estadual de Londrina.

4.1 OBTENÇÃO DO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

4.1.1 Preparo do Inoculo

O microrganismo *Bacillus* spp DP4, proveniente do acervo microbiológico do DCTA, foi usado para inocular o meio de cultura preparado segundo Itano (2006), contendo 7,10% de farinha de crisálida (Tabela 2) como única fonte de carbono adquirida na empresa Fiação de Seda BRATAC -Londrina-PR, além de 2,84% de peptona como única fonte de nitrogênio. O pH foi ajustado para 9,60 com solução de NaOH 30% e o meio esterilizado em autoclave à 121°C, 1 atmosfera de pressão, durante 15 minutos e, posteriormente, cultivado à temperatura de 31 °C durante 96 horas, com agitação de 110 rpm.

Tabela 2 – Teor de fibra alimentar, aminoácidos e minerais da farinha de crisálida (ANGELO, 2009)

Fibra alimentar total (%)	38,04	Triptofano (%)	0,67
Tirosina (%)	2,91	Prolina (%)	2,65
Arginina (%)	2,73	Valina (%)	2,84
Ácido Aspartico (%)	5,88	Histidina (%)	1,51
Glicina (%)	2,35	Serina (%)	2,65
Isoleucina (%)	2,19	Cálcio (%)	0,11
Leucina (%)	3,75	Fósforo total (%)	0,69
Ácido Glutâmico (%)	6,76	Potássio (mg/Kg)	7643,09
Lisina (%)	3,47	Magnésio (mg/Kg)	3266,75
Cistina (%)	0,62	Manganês (mg/Kg)	não detectado
Metionina (%)	1,69	Zinco (mg/Kg)	162,29
Fenilalanina (%)	2,66	Ferro (mg/Kg)	89,11
Alanina (%)	2,82	Cobre (mg/Kg)	14,65
Treonina (%)	2,61	Cobalto (mg/Kg)	8,50

4.1.2 Produção do Fermentado rico em Quitooligossacarídeos

O meio para produção do fermentado rico em quitooligossacarídeos foi o mesmo descrito anteriormente (ITANO, 2006), inoculado com alíquota de 5% retirada a partir do inóculo previamente preparado (item 4.1.1.) e mantido sob as mesmas condições. Após o tempo de cultivo (96 horas) foi feita a mistura do meio de cultura fermentado com farinha de ostra comercial na proporção de 2:1 (v/p) e, em seguida, essa mistura foi seca em estufa com circulação de ar a 45 °C por aproximadamente 48 horas, ou até que a amostra estivesse totalmente seca. Decorrido esse período, o produto foi triturado para homogeneização do mesmo e armazenado em sacos de polietileno (46 x 28 cm), vedados e mantidos em câmara fria a 5 °C até sua utilização.

A farinha de ostra foi escolhida como veículo por ser um composto inerte, não causando mudanças no fermentado, além da possibilidade de uso na avicultura como ingrediente da ração (RUTZ *et al.*, 2006).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

4.2.1 Composição Centesimal do Produto Fermentado

A partir do produto seco (item 4.1.2.) foi feita a composição centesimal do mesmo, através das determinações de umidade, proteína bruta, lipídeos e cinzas, além da determinação de fibra alimentar total, segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (2005). O teor de carboidratos foi estimado pela diferença entre 100 e as percentagens dos outros constituintes.

4.2.2 Caracterização Mineral do Produto Fermentado Rico em Quitooligossacarídeos

Além da determinação da composição centesimal do produto fermentado fez-se a quantificação de alguns minerais, os quais são importantes na

alimentação de frangos como cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco. A quantificação desses minerais foi realizada pelo laboratório de análises LABORSOLO, Londrina-PR, utilizando a técnica de espectrofotometria de absorção atômica, seguindo as normas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

4.2.3 Perfil Enzimático do Produto Fermentado

Para determinação das diferentes atividades enzimáticas do produto fermentado rico em quitoooligossacarídeos procedeu-se com a extração das enzimas do fermentado seco. A extração foi realizada com mistura do produto seco em água destilada na proporção de 1:2 (p/v), sob agitação a 100 rpm por 1 hora e à 30 °C. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3500 g por 10 minutos a 10 °C em centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5804R*, e o sobrenadante utilizado nas determinações enzimáticas (extrato do produto fermentado). As análises de determinação enzimática foram realizadas apenas de forma qualitativa, a fim de se detectar a ausência ou presença de tais enzimas.

4.2.3.1 Determinação da atividade da enzima celulase-CX

A atividade de Celulase-CX foi determinada pela quantidade de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática sobre o substrato carboximetilcelulose de sódio. Os tubos de ensaio contendo a mistura de 4,0 mL de solução 0,685% de carboximetilcelulose de sódio em tampão acetato 0,1 M (pH 4,5) e 1,0 mL de extrato do produto fermentado foram incubados por 30 minutos à 40 °C. Transcorrido esse período, retirou-se alíquotas de 1,0 mL para determinação de açúcares redutores, utilizando o método de Somogyi e Nelson (CASTRO-GOMEZ, 1985). Uma unidade de atividade enzimática (UA) de celulase-Cx foi expressa como quantidade de glicose ($\mu\text{g/mL}$) liberada por minuto e por grama de produto fermentado.

4.2.3.2 Determinação da atividade da enzima celulase-C1

A atividade Celulase-C1 foi determinada pela capacidade da enzima em degradar papel filtro Whatman nº 1. Em um tubo de ensaio foram colocados 1,0 mL do extrato do produto fermentado, 2,0 mL de tampão citrato 0,05M (pH 4,8) e um pedaço de papel filtro Whatman nº 1 de 1 x 6 cm. O conjunto foi incubado em banho maria à 50 °C durante 1,0 hora com agitação periódica. Após o tempo de incubação foram retiradas alíquotas de 1,0 mL para determinação de açúcares redutores (CASTRO-GOMEZ, 1985), sendo uma unidade de atividade enzimática (UA) de celulase-C1 expressa como quantidade de glicose ($\mu\text{g/mL}$) liberada por minuto e por grama de produto fermentado.

4.2.3.3 Determinação da atividade lignolítica

Para se determinar a atividade enzimática lignolítica adotou-se o método utilizado por Bruniera (1992), empregando o catecol (pirocatecol 1,2 dihidrobenzeno) na concentração de 11 mg/mL em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0) como substrato. Em 9,0 mL de tampão acetato contendo o substrato foi acrescentado 1,0 mL do extrato do produto fermentado. A reação enzimática, que resulta na oxidação do catecol com variação na absorvância da amostra, foi determinada no tempo 0 e após 15 minutos de reação, com auxílio de um espectrofotômetro Cintra 20 no comprimento de onda de 440 nm. A presença de atividade enzimática foi constatada com a diferença da absorvância após o tempo de reação. Uma unidade de atividade enzimática (UA) lignolítica foi expressa como a variação de absorvância por minuto por grama de produto fermentado.

4.2.3.4 Determinação da atividade amilolítica

A metodologia para determinação da atividade amilolítica foi do método iodométrico, onde o tubo de reação continha 100 μL de extrato do produto

fermentado e 1 mL de solução de amido solúvel (0,4 mg/mL) em tampão fosfato (pH 7,0). Após a incubação da amostra/substrato a 37 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida com 1mL da solução de iodeto 0,01 N em meio fortemente ácido (HCl) e, em seguida, a solução diluída com 4mL de água. A atividade amilolítica foi estimada medindo a cor azul (660 nm) formada pelo amido remanescente e a solução de iodeto (ROSSETO *et al.*, 2004) antes e após o tempo de reação, sendo considerada como uma unidade de atividade enzimática (UA) amilolítica a variação de absorvância por minuto por grama de produto fermentado.

4.2.3.5 Determinação da atividade quitinolítica

A atividade quitinolítica foi determinada de acordo com método de Itano (2006). A reação é baseada na quantificação de N-acetilglicosamina liberada pela hidrólise da quitina, incubando 1mL de solução de quitina coloidal 1% (p/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) com 1 mL de extrato do produto fermentado por 1 hora a 37 °C. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 10 minutos e o sobrenadante obtido da centrifugação (5000 g por 5 minutos) utilizado para dosagem de N-acetilglicosamina (açúcar redutor) pelo método de Somogyi e Nelson. Uma unidade de atividade enzimática (UA) quitinolítica foi expressa como a quantidade de N-acetilglicosamina ($\mu\text{g/mL}$) liberada por minuto e por grama de produto fermentado.

4.2.4 Quantificação e Caracterização dos Quitooligossacarídeos do Produto Fermentado

Devido à solubilidade dos quitooligossacarídeos em água, para a quantificação e caracterização dos mesmos utilizou-se o extrato do produto fermentado obtido segundo item 4.2.3, o mesmo usado para a determinação das atividades enzimáticas.

4.2.4.1 Quantificação dos quitooligossacarídeos

A quantificação dos quitooligossacarídeos foi muito importante para que fosse possível efetuar de forma correta as formulações das rações utilizadas no experimento com frangos, tendo em vista que o fermentado seria incorporado na ração com base no teor de quitooligossacarídeos. Deste modo, essa determinação foi realizada segundo a metodologia de Horn e Eijsink (2004), onde os quitooligossacarídeos das amostras reagem com 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) produzindo cor. Em um tubo foram colocados 200 µL de amostra, com posterior adição de 200 µL de solução de NaOH 0,5 N, 200 µL de solução MBTH a 3,0 mg/mL e 200 µL de solução de ditiotreitol (DTT) 1,0 mg/mL. Após agitação, os tubos foram incubados em banho de água a 80 °C por 15 minutos, sendo adicionados, imediatamente após a retirada dos tubos do banho, 400 µL de solução 0,5% de $(\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 0,5% de ácido sulfâmico em HCl 0,25 N. Após o resfriamento dos mesmos à temperatura ambiente por 15 minutos, fez-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro Cintra 20 com comprimento de onda de 620 nm.

4.2.4.2 Cromatografia em camada delgada

Para se avaliar quais os tipos de quitooligossacarídeos estavam presentes no fermentado foi realizada cromatografia em camada delgada segundo metodologia de Cabrera e Cutsem (2005). Utilizando placa de sílica para cromatografia, aplicou-se o extrato do produto fermentado e os padrões de quitooligossacarídeos diluído em água, com fase móvel composta de uma mistura de η -propanol, água e hidróxido de amônio na proporção de 7:2:1 (v/v/v), sendo a corrida encerrada após a eluição do solvente por 15 cm. A placa foi seca ao ar e, em seguida, o resultado revelado por solução de ácido sulfúrico a 10% em etanol, seguido de 20 minutos em estufa à 105 °C e os resultados observados sob luz ultravioleta.

4.3 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

Foram utilizados 260 frangos de corte macho da espécie *Galus galus* linhagem Hybro de um dia de idade, os quais foram submetidos à 5 níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos. Assim, os animais foram alimentados com ração base (Tabela 3), adicionada do produto fermentado nas concentrações de: 154 mg/Kg de ração (50 ppm de quitooligossacarídeos), 461 mg/Kg de ração (150 ppm de quitooligossacarídeos), 769 mg/Kg de ração (250 ppm de quitooligossacarídeos) e 1.080 mg/Kg de ração (350 ppm de quitooligossacarídeos) e um grupo controle, ou seja, sem adição do produto fermentado na ração.

Tabela 3 – Composição centesimal e calculada das rações de acordo com a idade das aves

Ingrediente (%)	Fases (dias)			
	Pré-inicial (1-7)	Inicial (8-21)	Crescimento (22-35)	Terminação (36-42)
Milho	56,72	60,76	62,79	66,81
Farelo de soja	36,60	33,56	30,11	26,26
Óleo de soja	2,37	1,82	3,42	3,45
Fosfato bicálcio	1,92	1,78	1,64	1,49
Calcário	0,86	0,83	0,79	0,75
Supl. Vit-mineral	0,40 ^a	0,40 ^a	0,40 ^b	0,40 ^c
Sal comum	0,46	0,44	0,42	0,39
DL-Metionina	0,36	0,25	0,24	0,23
L-Lisina HCL	0,31	0,16	0,19	0,22
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Calculado				
Proteína bruta (%)	22,04	20,79	19,41	18,03
Energia metabolizável aparente (Mcal/kg)	2,95	3,00	3,10	3,15
Cálcio (%)	0,94	0,88	0,82	0,76
Fósforo disponível (%)	0,47	0,44	0,41	0,38
Lisina digestível (%)	1,33	1,14	1,07	1,01
Metionina + cistina digestível (%)	0,95	0,81	0,77	0,73
Metionina digestível (%)	0,78	0,66	0,64	0,59
Sódio (%)	0,22	0,21	0,20	0,19

^a Garantia por kg do produto: vitamina A, 2.400.000 UI/g; Vitamina D3, 671,667 UI/g; Vitamina E, 2.133,333 mg/Kg; vitamina B1, 1.486,333 mg/Kg; vitamina B2, 1.066,667 mg/Kg; vitamina B6, 280,500 mg/Kg; vitamina B12, 2.666,667 mg/Kg; vitamina K3, 537,333 mg/Kg; pantotenato Ca, 2.153,333 mg/Kg; niacina, 5.341,000 mg/kg; ácido fólico, 66,667 mg/Kg; biotina, 3,333 mg/Kg; colina, 74,666,660 mg/Kg; metionina, 322.575,000 mg/Kg; lisina, 122.500,000 mg/Kg; zinco, 10.208,230 mg/Kg; ferro, 7.000,000 mg/Kg, cobre, 1.500,000 mg/Kg; manganês, 11.625,000 mg/Kg; cobalto, 33,333 mg/Kg; iodo, 162,500 mg/Kg; selênio, 50,000 mg/Kg; antioxidante, 2.666,667 mg/Kg.

^b Garantia por kg do produto: vitamina A, 2.340.000 UI/g; Vitamina D3, 654,875 UI/g; Vitamina E, 2.080,000 mg/Kg; vitamina B1, 1.449,175 mg/Kg; vitamina B2, 1.040,000 mg/Kg; vitamina B6, 273,488 mg/Kg; vitamina B12, 2.600,000 mg/Kg; vitamina K3, 523,900 mg/Kg; pantotenato Ca, 2.099,500 mg/Kg; niacina, 5.207,475 mg/kg; ácido fólico, 65,000 mg/Kg; biotina, 3,250 mg/Kg; colina, 72.800,000 mg/Kg; metionina, 333.073,100 mg/Kg; lisina, 98.000,000 mg/Kg; zinco, 9.953,125 mg/Kg; ferro, 6.825,000 mg/Kg, cobre, 1.462,500 mg/Kg; manganês, 11.334,380 mg/Kg; cobalto, 32,500 mg/Kg; iodo, 158,438 mg/Kg; selênio, 48,750 mg/Kg; antioxidante, 2.600,000 mg/Kg.

^c Garantia por kg do produto: vitamina A, 2.250.000 UI/g; Vitamina D3, 629,688 UI/g; Vitamina E, 2.000,000 mg/Kg; vitamina B1, 1.393,438 mg/Kg; vitamina B2, 1.000,000 mg/Kg; vitamina B6, 262,969 mg/Kg; vitamina B12, 2.500,000 mg/Kg; vitamina K3, 503,750 mg/Kg; pantotenato Ca, 2.018,750 mg/Kg; niacina, 5.007,188 mg/kg; ácido fólico, 62,500 mg/Kg; biotina, 3,125 mg/Kg; colina, 70,000,000 mg/Kg; metionina, 297.070,300 mg/Kg; lisina, 114.333,300 mg/Kg; zinco, 9.570,313 mg/Kg; ferro, 6.562,500 mg/Kg, cobre, 1.406,250 mg/Kg; manganês, 10.898,440 mg/Kg; cobalto, 31,250 mg/Kg; iodo, 152,344 mg/Kg; selênio, 46,875 mg/Kg; antioxidante, 2.500,000 mg/Kg.

No início do experimento os animais foram pesados e distribuídos de forma a se obter grupos experimentais homogêneos. Os tratamentos foram distribuídas aleatoriamente em boxes medindo 1,00 x 1,50 m, conforme pode ser observado na Figura 1. Foi disponibilizado aos animais água e ração (de acordo com cada grupo) *Ad libitum* durante o período experimental de 42 dias.



Figura 1 – Boxes de alojamento das aves

4.3.1 Avaliação do Desempenho Zootécnico dos Animais

O manejo dos animais foi executado duas vezes ao dia, uma no início da manhã e outra no final da tarde, sendo a limpeza dos bebedouros realizada diariamente. O controle de temperatura do galpão foi mantido no início do experimento com lâmpadas incandescentes em cada boxe (Figura 1), sendo as mesmas retiradas ao 14º dia de experimento e o controle de temperatura realizado apenas pela abertura e fechamento da cortina do galpão.

Nas mudanças de fase de ração as aves eram pesadas para se determinar os índices zootécnicos em cada período (consumo de ração, viabilidade criatória, ganho de peso e conversão alimentar). Desta forma, foi possível verificar a influência do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos adicionado à ração no desempenho dos animais de 1 – 7 dias; 1 – 21 dias; 1 – 35 dias e 1 – 42 dias de idade.

4.3.2 Avaliação da Qualidade da Carne

Para a avaliação da qualidade da carne foram selecionadas ao acaso e marcadas no início do experimento, duas aves de cada boxe totalizando 40 aves. Estas foram abatidas no final do experimento (42 dias) para coleta do peito (*Pectorales major*) que se utilizou para realizar as determinações descritas adiante. O abate das aves foi conforme práticas comerciais, com jejum dos animais de 10 horas, insensibilização elétrica, sangria, escaldagem, depenação, evisceração e resfriamento do peito (*Pectorales major*) por 24 horas.

4.3.2.1 Determinação do pH final e cor da carne do peito dos frangos

Após as 24 horas de refrigeração (4 °C) fez-se a medida do pH com auxílio de um potenciômetro da marca Texto modelo 205 na carne do peito. As determinações de cor da carne crua foram realizadas paralelamente à medida do pH, utilizando-se o colorímetro da marca Minolta CR10 para se fazer as medidas de cor através do sistema CIELAB, luminosidade (L*), componente verde-vermelho (a*) e componente azul-amarelo (b*), na face interna da carne do peito das aves.

4.3.2.2 Determinação de perdas de peso por cozimento

As amostras de carne do peito depois de coletadas e mantidas sob refrigeração por 24 horas, foram avaliadas quanto a perdas de peso por cozimento e textura (força de cisalhamento), segundo metodologia de Cason *et al.* (1997). As amostras de peito cru foram cortadas em pedaços retangulares de 2,5 cm de altura por 4,0 cm de largura e 7,0 cm de comprimento, sendo cada amostra pesada e devidamente identificada de acordo com o tratamento. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em pequenos sacos de polietileno (14,5 x 9,5 cm), vedados e colocados em água a 85 °C durante 30 minutos (Figura 2).



Figura 2 – Determinação das perdas de peso por cozimento

Passado esse tempo as amostras foram deixadas em papel absorvente até atingirem temperatura ambiente e pesadas novamente. O cálculo de perdas de peso por cozimento foi expresso segundo a seguinte fórmula:

$$\%PC = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

% PC = porcentagem de perdas de peso por cozimento

P_i = peso inicial

P_f = peso final

4.3.2.3 Determinação da força de cisalhamento da carne cozida

Para a determinação da força de cisalhamento da carne cozida, as mesmas amostras de peito utilizadas para a determinação de perdas de peso por cozimento, depois de cozidas foram armazenadas sob refrigeração por 24 horas.

Decorrido este tempo, as amostras foram cortadas em pedaços de 1,0 cm de altura por 1,0 cm de largura e 2,0 cm de comprimento para em seguida medir a força de cisalhamento. Esta foi realizada em texturômetro marca Texture Analyser TA-XT2i utilizando a sonda Warner Blatzer e o resultado expresso em Newton/cm^2 .

4.3.3 Avaliação dos Parâmetros Imunológicos

Para avaliar os parâmetros imunológicos, as mesmas aves selecionadas para a determinação da qualidade da carne (item 4.3.2.), foram utilizadas para coleta de sangue. As coletas foram realizadas nas aves com 7, 21 e 42 dias de idade através de punção da veia braquial da asa. Retirou-se aproximadamente 2,0 mL de cada animal, em cada coleta, sendo esse volume dividido em 2 tubos diferentes, um contendo anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) e outro vazio para coleta do soro sanguíneo.

4.3.3.1 Contagem diferencial leucocitária

A contagem diferencial leucocitária é uma técnica utilizada juntamente com outras para se avaliar a imunocompetência do indivíduo de acordo com a proporção dos tipos celulares do sistema imunológico (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Para a contagem diferencial leucocitária utilizou-se as amostras de sangue coletadas com anticoagulante, de onde foi preparado o esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro no mesmo dia da coleta das amostras para que não houvesse problemas na análise, principalmente com relação a células defeituosas. Depois de feito o esfregaço sanguíneo nas lâminas e secagem ao ar das mesmas, estas foram mergulhadas em metanol por 3 minutos para fixação do material e, depois de secas, o esfregaço corado com Giemsa por 15 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada, secas ao ar livre e os esfregaços observados ao microscópio óptico em objetiva de imersão. Fez-se contagem classificatória para linfócitos, heterófilos e monócitos (Figura 3), calculando-se a proporção de cada tipo em 100 células contadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

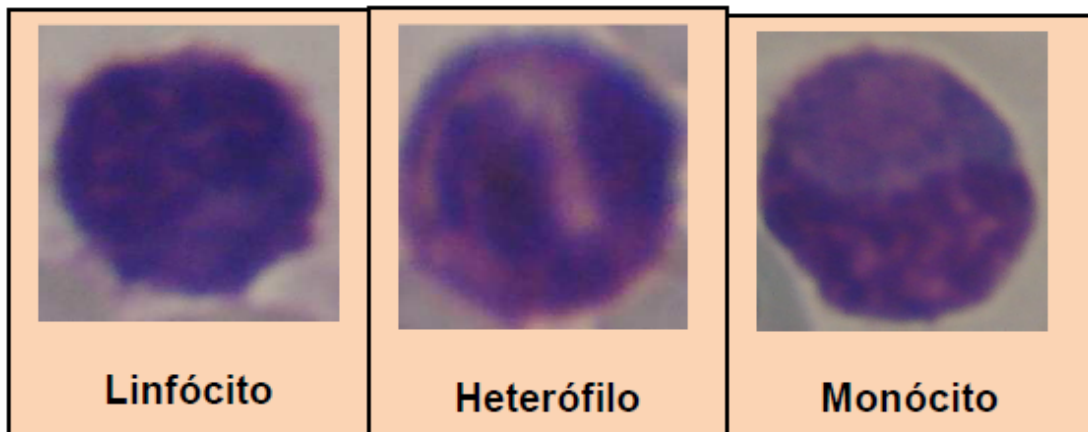


Figura 3 – Linfócito, heterófilo e monócito do sangue de frango

4.3.3.2 Quantificação de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle (VDN) pelo método de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Durante o experimento, aos 7 dias de idade, todas as aves foram vacinadas contra o vírus da doença de Newcastle (VDN) seguindo recomendações sanitárias. Utilizou-se a vacina New Vac-B1 da Fort Dodge de vírus vivos atenuados do tipo B1, sendo a via ocular utilizada para vacinação. Tendo em vista a vacinação das aves, fez-se a quantificação dos anticorpos contra VDN como maneira de avaliar a imunidade humoral das aves em relação à alimentação com o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos ao longo do período de criação.

ELISA é um rápido teste imunoenzimático para a detecção de anticorpos específicos com reação produzindo cor, a qual pode ser mensurada e relacionada com a quantidade de anticorpos presentes na amostra. O soro das aves imunizadas contra VDN foi testado em placas de ELISA contendo o antígeno (vírus da doença de Newcastle) impregnado conforme metodologia oferecida pelo fabricante Synbiotics Corporation, sendo toda metodologia seguida de acordo com as instruções do mesmo.

As interações antígeno-anticorpo foram mostradas através de diferentes intensidades de cor comparadas com os grupos controle, diretamente proporcionais aos níveis de anticorpos específicos para VDN no soro, seguindo-se de leitura de densidade óptica em 405 nm das amostras em leitor de microplaca Bio-Tek LEX 0800. Os valores de densidade óptica foram transformados em títulos utilizando as recomendações do fabricante através das seguintes fórmulas:

$$A.C. = \frac{V_{\text{amostra}} - M_{\text{controle neg.}}}{M_{\text{controle pos.}} - M_{\text{controle neg.}}}$$

A.C.: valor de absorvância da amostra corrigido

V_{amostra} : valor de absorvância da amostra

$M_{\text{controle neg.}}$: média dos valores de absorvância do controle negativo

$M_{\text{controle pos.}}$: média dos valores de absorvância do controle positivo

Com os valores de absorvância das amostras corrigidos (A.C.) utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o título de anticorpos:

$$\text{Log}_{10} \text{TÍTULO} = (1,464 \times \text{Log}_{10} \text{A.C.}) + 3,740$$

4.3.3.3 Quantificação de óxido nítrico (NO)

Tendo em vista a capacidade dos quitooligossacarídeos de estimularem a produção de óxido nítrico por células do sistema imunológico, fez-se a quantificação do mesmo nas amostras de soro das aves.

Para estimativa da concentração de NO nas amostras, foi realizado o procedimento de Panis (2009) adaptado da técnica de determinação de nitrito em plasma humano descrita por Navarro-González *et al.* (1998). O método baseia-se na redução do nitrato presente no soro a nitrito, mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica, do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess, a 550 nm em leitor de microplaca.

O primeiro passo para estimativa de óxido nítrico nas amostras de soro foi a desproteinização do soro, pois as proteínas podem influenciar na técnica. Assim, as amostras previamente coletadas foram descongeladas em banho de gelo,

de onde se retirou 60 μL de amostra para tubo *ependorf*, 50 μL de ZnSO_4 75 mM e, após homogeneização em vórtex (30 segundos), as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10000 rpm a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 70 μL de NaOH 55 mmol/L e novamente homogeneizado em vórtex por 30 segundos. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm a 4 °C, com posterior recuperação de 250 μL do sobrenadante, adicionando-se 50 μL de tampão glicina-NaOH 45 g/L pH 9,7.

Em seguida procedeu-se com a ativação dos grânulos de cádmio, os quais estavam estocados em H_2SO_4 100 mM. Estes foram lavados com H_2O destilada três vezes e, após, deixados em contato com solução de CuSO_4 5 mM em tampão glicina-NaOH 15 g/L pH 9,7 por 5 minutos. Os grânulos ativos foram utilizados dentro de 10 minutos e aqueles que ficaram pretos após serem lavados com H_2SO_4 foram descartados. Após essa ativação dos grânulos adicionou-se 400 mg de grânulos de cádmio ativados ao sobrenadante recuperado em tampão, deixando a mistura sob agitação contínua por 10 minutos. Após este tempo transferiu-se 50 μL de cada amostra para cada poço de microplaca, adicionou-se 50 μL de reagente de Griess (Sulfanilamida 0,4 g em 20 mL de ácido fosfórico 5% - protegido da luz). Em seguida, a placa foi deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos, e medida sua absorbância a 550 nm em leitor de microplaca Multiskan FX.

4.3.3.4 Análise estatística do experimento

Todo experimento foi realizado de acordo com os conceitos da estatística, sendo inteiramente casualizado para avaliação do desempenho zootécnico e qualidade da carne, mas também em esquema fatorial 5 x 3 (5 níveis de produto fermentado rico em quitoooligossacarídeos e 3 idades das aves) para análise dos parâmetros imunológicos. As análises laboratoriais foram realizadas com repetições em triplicata. Os dados de desempenho dos animais, de qualidade da carne e dos parâmetros imunológicos foram submetidos à análise de variância e regressão com desdobramento de polinômios ortogonais para níveis de produto

fermentado rico em quitooligossacarídeos e idade das aves (apenas para análises dos parâmetros imunológicos). Além disso, foi feita análise de variância e teste de Tukey para se avaliar isoladamente as médias de cada tratamento nas idades estudadas (7, 21 e 42 dias), com relação às análises de quantificação do teor de óxido nítrico e título de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle (VDN).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

5.1.1 Composição do Produto Fermentado Rico em Quitooligossacarídeos

A Tabela 4 mostra os resultados da composição centesimal do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos com valores em base seca.

Tabela 4 – Composição centesimal (b.s) do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos

Proteína bruta (%)	12,20
Lipídeos totais (%)	5,10
Cinzas totais (%)	18,50
Carboidratos totais (%)	49,90
Fibra alimentar total (%)	14,30

Com base nos dados da tabela anterior pode-se observar que o principal constituinte do produto fermentado é carboidrato (49,90%). Se consideramos que estes carboidratos por sua natureza (derivados de exoesqueleto de insetos) são em sua maioria quitina, este resultado está de acordo Campana-Filho *et al.* (2007) que reportam um teor de quitina (carboidrato) de aproximadamente 42,00 % (b.s) na farinha de crisálida. Por outro lado, neste trabalho foi encontrado teor de 38,04 % de fibra alimentar total na farinha de crisálida, ficando no produto fermentado final 14,30 %. Tendo em vista que a quitina é uma fibra alimentar (PETROVSKA *et al.*, 2001; VETTER, 2007), provavelmente seu teor no produto fermentado (14,30 %) corresponde à presença de quitina não

hidrolisada da farinha de crisálida. Por outro lado, esta hidrólise ou diminuição do teor de fibra alimentar estaria indicando, entre outros, que produtos derivados da quitina estão presentes (quitoligossacarídeos). Isto é corroborado pelos resultados sobre atividade enzimática do produto fermentado que indicam a presença de quitinases (Item 5.1.2), o que permite afirmar que esta hidrólise trouxe como consequência a produção de quitoligossacarídeos (Item 5.1.3), e pelo processo de fermentação (condição de cultivo, composição de substrato e cepa microbiana) que foi definido por Itano (2006) especificamente para produzir quitinases promovendo a formação destes compostos. A utilização de farinha de ostra como veículo inerte no processo de desidratação do produto, justifica o teor de cinzas de 18,50% obtido no produto final. O teor de proteínas e lipídios são características próprias do produto fermentado em função da composição do substrato e a presença de massa celular bacteriana, os quais contribuem com a qualidade nutricional do produto.

Realizou-se também no produto fermentado a quantificação de alguns minerais, os quais são importantes para alimentação de aves e os resultados são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 5 – Teor de alguns minerais do produto fermentado

Mineral	Quantidade (g/kg)
Cálcio	177,400
Ferro	0,328
Fósforo	0,986
Magnésio	0,970
Potássio	1,000
Sódio	5,000
Zinco	0,130

Os resultados da Tabela 5 indicam a presença de quantidade relevante de vários minerais importantes, devido principalmente ao uso da farinha de crisálida (Item 4.2.1. Tabela 2) como ingrediente do substrato e à utilização da farinha de ostra como veículo inerte no processo de secagem.

A importância da fração mineral se deve principalmente à participação de alguns destes minerais no metabolismo e nutrição das aves. Assim, o sódio, potássio e cloro são responsáveis pela manutenção da pressão osmótica e regulam o balanço ácido-básico corporal. O magnésio, assim como o potássio, está concentrado no interior de células dos tecidos moles e sua deficiência na dieta de aves está relacionada com crescimento retardado, anorexia, convulsões dentre outros sintomas. O ferro e o zinco são microminerais essenciais na alimentação de aves por ambos estarem relacionados com vários sistemas enzimáticos do metabolismo. Além disso, o ferro é o responsável pelo transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina) e o zinco está intimamente ligado ao metabolismo da vitamina A e ao sistema imunológico. Não menos importante, o fósforo está presente em todas as reações do metabolismo de gorduras, carboidratos e proteínas com relação à transferência e acúmulo de energia, além de ser parte importante do DNA, RNA e componente de coenzimas. O cálcio é um constituinte essencial de todo sistema ósseo juntamente com o fósforo, mas é encontrado também em tecidos moles e fluidos, sendo responsável por várias atividades enzimáticas, contração dos músculos e transmissão dos impulsos nervosos (PALERMO-NETO *et al.*, 2005).

5.1.2 Perfil enzimático do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos

O perfil enzimático do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos é mostrado na tabela 6.

Tabela 6 – Perfil de atividades enzimáticas do produto fermentado

Atividade enzimática	Resultado (UA)*
Celulase-C _x	Ausente
Celulase-C ₁	Ausente
Lignolítica	Ausente
Amilolítica	7,56
Quitinolítica	87,83

*UA = Unidade de atividade

Nas condições de cultivo e pela composição do substrato, a bactéria *Bacillus* spp DP4 não apresentou atividades lignocelulolíticas. Segundo outros pesquisadores bactérias do gênero *Bacillus* não se caracterizam por serem produtoras deste tipo de enzimas (STAMFORD *et al.*, 1998).

Entretanto, como se verifica na tabela 6, o produto apresentou enzimas amilolítica e quitinolítica, corroborando os resultados de outros pesquisadores que verificaram produção destas por bactérias do gênero *Bacillus* (KONSULA; KYRIAKIDES, 2004; ITANO, 2006).

A presença de enzimas amilolíticas, tendo em vista as possibilidades de uso do produto fermentado em ração para aves, é importante porque pode melhorar a digestão e conseqüente absorção do amido presente em um dos principais ingredientes utilizado na alimentação de frangos, que é o milho (item 4.3. Tabela 3). Por outro lado, a atividade quitinolítica vai permitir transformar em quitooligossacarídeos a quitina presente na farinha de crisálida que, como verificaremos mais adiante, atuaram na modulação do sistema imunológico das aves.

5.1.3 Quantificação e Caracterização dos Quitooligossacarídeos do Produto Fermentado

O teor de quitooligossacarídeos encontrado no produto fermentado foi de 32,52%. Considerando que o substrato, condições de cultivo e o microrganismo utilizado na fermentação foram produtos de uma seleção baseada na máxima produção de quitinases (ITANO, 2006), o teor de quitooligossacarídeos encontrado no produto fermentado corresponde exclusivamente a hidrólise da quitina presente na farinha de crisálida pela enzima quitinase produzida pelo *Bacillus* spp DP4.

Uma análise qualitativa utilizando cromatografia em camada delgada permitiu confirmar novamente a existência dos quitooligossacarídeos no produto fermentado, além de verificar quais os tipos presentes. O resultado dessa cromatografia pode ser visualizado na figura abaixo:

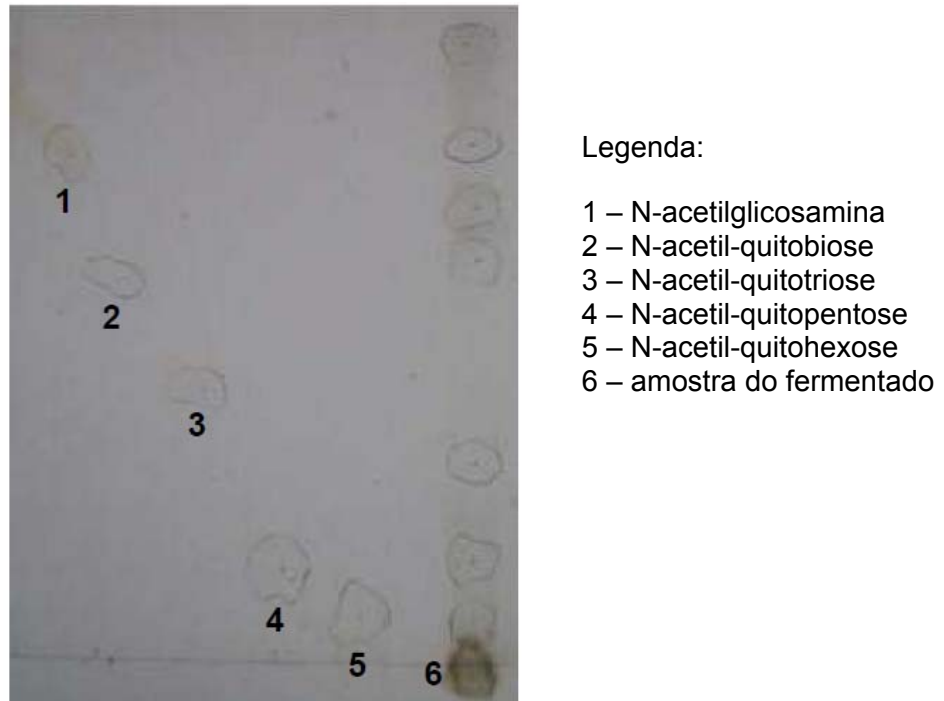


Figura 4 – Cromatografia em camada delgada do extrato do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos

A análise da cromatografia em camada delgada das amostras do produto fermentado se deu por comparação das diferentes manchas observadas com as de padrões de quitooligossacarídeos tais como o monômero N-acetilglicosamina (Sigma), o dímero N-acetil-quitobiose (Sigma), o oligossacarídeo derivado da quitina com 3 unidades N-acetil-quitotriose (Sigma), o de 5 unidades N-acetil-quitopentose (Sigma) e o hexâmero N-acetil-quitohexose (Sigma).

De acordo com as condições cromatográficas descritas no item 4.2.4.2., os padrões e a amostra utilizados apresentaram valores de fator de retenção (R_f) indicados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores do fator de retenção (Rf) da cromatografia em camada delgada para os padrões e amostra do produto fermentado

Padrões de Quitooligossacarídeos	Fator de Retenção (Rf)	
	Amostra	Padrão
Padrão não disponível	0,87	Não Identificado
(N-acetilglicosamina)	0,70	0,70
Padrão não disponível	0,63	Não Identificado
(N-acetilquitobiose)	0,53	0,53
(N-acetilquitotriose)	Não detectado	0,44
Padrão não disponível	0,27	Não Identificado
(N-acetilquitopentose)	0,13	0,12
(N-acetilquitohexose)	0,06	0,06

Assim, comparando-se os valores de Rf pode-se observar que o produto fermentado contém o monômero (N-acetilglicosamina) constituinte dos quitooligossacarídeos e da quitina, assim como as moléculas de quitobiose, quitopentose e quitohexose. Não se observou na amostra o equivalente à molécula de N-acetilquitotriose. Todavia, foi verificada uma mancha com valor de Rf de 0,27, a qual poderia ser o oligômero de 4 unidades N-acetilquitotetose (Padrão não disponível).

As manchas da amostra do produto fermentado com valores de Rf de 0,87 e 0,63 provavelmente constituem outro monômero e/ou dímero respectivamente, constituídos por outros açúcares ou por N-acetilglicosamina ligada a outras espécies químicas. Além disso, quitooligossacarídeos com maior número de unidades (7 ou mais) podem estar presentes com base à formação de uma grande mancha no local de aplicação da amostra. Contudo, as condições cromatográficas utilizadas não foram favoráveis à identificação de oligômeros maiores, mas favoreceram aos quitooligossacarídeos com menor número de unidades que apresentam melhores efeitos na modulação do sistema imunológico (ZHANG *et al*, 1999; DOU *et al*, 2007).

O uso de enzimas quitinolíticas para produção de quitooligossacarídeos é muito difundido (JUNG *et al*, 2007), devido a sua maior

especificidade, eficiência e produtos com melhores efeitos biológicos, quando comparado com métodos químicos (ZHANG *et al*, 1999; CABRERA ; CUTSEM, 2005). Todavia, na maior parte das pesquisas relacionadas à produção de quitooligossacarídeos se utiliza enzimas purificadas ou extratos enzimáticos e, ao final da reação, o produto obtido é purificado (JUNG *et al*, 2007; JEON *et al*, 2001). Entretanto, neste trabalho se objetivou fazer um processo simples, econômico, sem produção de efluentes ou resíduos. Para obter um produto rico em quitooligossacarídeos, se optou por um microrganismo selecionado para produzir quitinasases (*Bacillus* spp DP4) e uma de fonte de carbono (farinha de crisálida) rica em quitina, que induz a bactéria a sintetizar esta enzima que por sua vez promove a produção dos quitooligossacarídeos, como constatado nos resultados acima apresentados.

5.2. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO PRODUTO FERMENTADO RICO EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

5.2.1. Análise do Desempenho Zootécnico dos Animais

Os resultados da análise de desempenho zootécnico da fase pré-inicial (1 a 7 dias de idade) das aves está mostrado na tabela abaixo:

Tabela 8 -Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 7 dias de idade

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	Consumo de ração por ave (g)	Ganho de peso por ave (g)	Conversão alimentar	Viabilidade criatória (%)
0	182	116	1,57	98,07
154	175	114	1,54	100,00
461	166	111	1,51	98,07
769	164	107	1,55	100,00
1.080	170	104	1,64	98,07
Efeito	Quadrático¹	Linear²	Quadrático³	NS⁴
Coefficiente de variação (%)	5,73	4,01	4,37	3,01

$$^1 Y = 181,9841 - 0,1629996X + 0,000370904X^2$$

$$^2 Y = 116,0122 - 0,03445122X$$

$$^3 Y = 1,572351 - 0,0008734338X + 0,000003057098X^2$$

⁴ Não significativo ao nível de 5%

De acordo com a Tabela 8 pode-se verificar que as aves do grupo controle, ou seja, que não receberam o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na dieta, apresentaram maior consumo de ração (182 g), havendo a diminuição do mesmo paralelamente ao aumento da incorporação do produto na ração, exceto no grupo que recebeu o maior nível (1.080 ppm), onde o consumo de ração voltou a subir (170 g) porém, abaixo do grupo controle.

O consumo de ração está ligado ao ganho de peso, pois os grupos que ingeriram menor quantidade de ração apresentaram menor ganho de peso, com exceção novamente do grupo que recebeu o maior suplemento (1.080 ppm de produto fermentado) que, apesar do consumo de ração ter aumentado (170 g) em relação aos outros tratamentos, teve ganho de peso menor (104 g) em comparação com os outros grupos.

A divisão do consumo de ração pelo ganho de peso fornece o valor de conversão alimentar, de maneira que este último varia de acordo com a alteração dos outros dois índices. Entretanto, é importante ressaltar que apesar do menor consumo de ração e menor ganho de peso dos animais pertencentes aos grupos tratados com produto fermentado rico em quitooligossacarídeos, o valor de conversão alimentar nesses tratamentos foi melhor quando comparado ao grupo controle, exceto nas aves alimentadas com a maior concentração do produto (1.080 ppm). Desta maneira, os animais pertencentes a esses níveis de produto fermentado (154, 461 e 769 ppm) apresentaram melhor aproveitamento da ração consumida, transformando-a em ganho de peso de forma mais eficiente (melhor índice de conversão alimentar).

O baixo ganho de peso do nível maior de produto fermentado (1.080 ppm), trouxe como consequência conversão alimentar pior (1,64), que pode ser explicada pelo fato de que as aves na fase pré-inicial, ou seja, de 1 a 7 dias de idade, são mais suscetíveis aos efeitos de aditivos na alimentação (FLEMMING ; FREITAS, 2005), de maneira que a adição da maior concentração de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na ração não beneficiou as aves. A viabilidade criatória não diferiu entre os tratamentos indicando que o uso deste produto fermentado não é nocivo para as aves nas concentrações estudadas.

Os resultados do desempenho das aves no período de 1 a 21 dias estão na Tabela 9.

Tabela 9 -Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 21 dias de idade

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	Consumo de ração por ave (g)	Ganho de peso por ave (g)	Conversão alimentar	Viabilidade criatória (%)
0	1279	800	1,58	98,07
154	1235	761	1,67	100,00
461	1256	772	1,58	98,07
769	1256	805	1,59	96,15
1.080	1224	742	1,64	96,15
Efeito	NS¹	NS¹	NS¹	NS¹
Coefficiente de variação (%)	5,43	4,90	6,12	4,76

¹ Não significativo ao nível de 5%

O desempenho zootécnico das aves durante o período de 1 a 21 dias de idade, com relação a todas as variáveis (consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar e viabilidade criatória), não diferiu entre os tratamentos. Apesar do menor ganho de peso aliado ao menor consumo de ração das aves do maior nível de produto (1.080 ppm), este tratamento não apresentou diferença significativa com relação aos outros níveis, demonstrando que, apesar do desempenho pior durante a fase pré-inicial (1 a 7 dias de idade), as aves após esse período apresentaram desenvolvimento adequado.

A tabela abaixo apresenta os resultados do desempenho zootécnico das aves do período de 1 a 35 dias de idade:

Tabela 10 -Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 35 dias de idade

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	Consumo de ração por ave (g)	Ganho de peso por ave (g)	Conversão alimentar	Viabilidade criatória (%)
0	3483	2088	1,64	96,15
154	3275	2024	1,66	100,00
461	3319	2057	1,56	98,07
769	3537	2137	1,68	96,15
1.080	3403	2064	1,64	96,15
Efeito	NS¹	NS¹	NS¹	NS¹
Coefficiente de variação (%)	4,37	2,62	4,72	4,89

¹ Não significativo ao nível de 5%

Os dados com relação ao desempenho zootécnico dos frangos de 1 a 35 dias de idade não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em nenhuma das variáveis. Entretanto, é importante observar que os animais alimentados com 461 ppm de produto fermentado na ração apresentaram melhor valor de conversão alimentar (1,56) quando comparados tanto ao controle quanto aos demais tratamentos. Isso pode ser justificado pelo menor consumo de ração, cerca de 165 g menos que o controle, e ganho de peso semelhante aos demais grupos. Além disso, as aves alimentadas com 769 ppm de produto fermentado apresentaram o maior consumo de ração com conseqüente ganho de peso mais elevado, cerca de 50 g a mais que as aves do controle.

O desempenho zootécnico geral das aves (1 a 42 dias de idade) está apresentado na tabela a seguir:

Tabela 11 -Resultado do desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos no período de 1 a 42 dias de idade

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	Consumo de ração por ave (g)	Ganho de peso por ave (g)	Conversão alimentar	Viabilidade criatória (%)
0	4723	2715	1,74	96,15
154	4663	2667	1,74	100,00
461	4538	2675	1,69	98,07
769	4856	2721	1,78	94,23
1.080	4701	2712	1,73	96,15
Efeito	NS*	NS*	NS*	NS*
Coefficiente de variação (%)	4,41	3,29	3,11	6,31

* Não significativo ao nível de 5%

Ao final do experimento, 42 dias de criação das aves, os dados do desempenho zootécnico com relação a todos os índices estudados não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto, as aves alimentadas com 461 ppm de produto fermentado (150 ppm de quitooligossacarídeos) assim como no período anterior (período de 1 a 35 dias de criação), apresentaram melhor valor de conversão alimentar (1,69), ainda que o mesmo não tenha sido significativo estatisticamente. Isto pode ser explicado pelo menor consumo de ração (4538 g), ou seja, 185 g a menos que o consumo de ração do grupo controle, e ganho de peso

semelhante (2675 g). Contudo, apesar das aves não alimentadas com produto fermentado terem apresentado um pouco mais de peso, o nível com 461 ppm de produto fermentado converteu mais eficientemente a ração consumida em peso corporal (melhor índice de conversão alimentar), ou seja, cada animal do controle consumiu 185 g de ração a mais que os animais do nível intermediário (461 ppm de produto fermentado) para ganharem 40 g de peso corporal.

Em suma, a adição do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na alimentação de frangos de corte não influenciou significativamente as variáveis de desempenho zootécnico, exceto no período de 1 a 7 dias de idade (fase pré-inicial) onde todos os níveis de produto deprimiram o consumo de ração e o ganho de peso. Todavia, as aves alimentadas com 461 ppm de produto nesse mesmo período apresentaram o melhor índice de conversão alimentar, sendo este mantido até o final do experimento, de forma que esses animais consumiram menos ração para adquirir peso equivalente aos demais grupos.

5.2.2 Análises de Qualidade da Carne

Os resultados das análises de cor da carne do peito para os componentes L* (luminosidade), a* (verde -vermelho) e b* (azul -amarelo) estão exibidos na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados da coloração da carne do peito de frangos submetidos a dietas contendo diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos.

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	L*	a*	b*
0	53,08	2,66	13,65
154	53,87	2,25	12,72
461	52,31	2,23	11,42
769	53,61	2,35	13,15
1.080	52,87	2,80	12,16
Efeito	NS¹	NS¹	NS¹
Coefficiente de variação (%)	5,52	43,44	14,39

¹ Não significativo ao nível de 5%

Conforme os resultados de cor da carne mostrados na Tabela 12, verifica-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos não influenciou na cor da carne do peito dos frangos.

Os resultados das outras análises realizadas na carne do peito (pH, força de cisalhamento e perdas de peso por cozimento) são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 13 – Resultados das análises de pH, força de cisalhamento e perdas de peso por cozimento das amostras de carne do peito de frangos alimentados com diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos.

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	Força de cisalhamento na carne cozida (Newton/cm ²)	pH final da carne	Perdas de peso por cozimento (%)
0	23,397	6,00	23,425
154	28,080	5,89	24,487
461	32,730	6,05	23,889
769	31,093	6,00	22,827
1.080	23,196	6,00	25,098
Efeito	Quadrático¹	NS²	NS²
Coefficiente de variação (%)	25,20	2,48	8,36

$$^1 Y = 23,39717 + 0,1093678X - 0,0003143397X^2$$

² Não significativo ao nível de 5%

As análises de pH da carne e perdas de peso por cozimento não apresentaram diferenças significativas entre os níveis, demonstrando que o produto fermentado não influenciou nessas características da carne assim como na cor da mesma.

Com relação à força de cisalhamento das amostras de carne do peito, houve diferença significativa entre os níveis. As aves do grupo controle e as que foram submetidas ao maior nível (1.080 ppm de produto fermentado) apresentaram as menores texturas (valores de força de cisalhamento) 23,397 e 23,196 Newton/cm², respectivamente. O nível de 461 ppm de produto fermentado adicionado à ração, exibiu o maior valor (32,730 Newton/cm²) e as aves alimentadas com os níveis de 154 ppm e 769 ppm de produto fermentado rico em

quitoligossacarídeos apresentaram valores de textura intermediários, 28,080 e 31,093 Newton/cm² respectivamente.

A textura em carnes é um parâmetro influenciado pela composição e pelo método de conservação da mesma. Assim, pesquisadores têm informado que a gordura na carne funciona como lubrificante diminuindo a resistência ao corte e, além disso, sob refrigeração os lipídeos impedem o encurtamento das fibras musculares, o que auxilia na manutenção de valores menores de textura da carne (FERNANDES *et al.*, 2009). Frangos de corte alimentados com quitoligossacarídeos apresentaram menor teor de gordura abdominal como reportado por Zhou *et al.* (2009) e, segundo Bihan-duval *et al.* (1999) carcaças com menor teor de gordura abdominal também apresentam menor quantidade de gordura na carne.

Portanto, de forma geral, as análises das características da carne do peito das aves não indicaram diferenças importantes com relação à cor, pH e perdas de peso por cozimento. Entretanto, a adição do produto fermentado na ração das aves nos níveis abaixo de 1.080 ppm de produto fermentado (350 ppm de quitoligossacarídeos), acarretou aumento na textura das amostras que, pode ter sido causada pela diminuição da gordura na carne (ZHOU *et al.*, 2009).

5.2.3 Parâmetros Imunológicos das Aves

Os resultados obtidos nas análises imunológicas realizadas em relação aos níveis de produto fermentado rico em quitoligossacarídeos suplementados na ração e à idade das aves, estão exibidos na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultado das análises imunológicas de frangos alimentados com diferentes níveis do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos.

	Título de anticorpos contra Newcastle	Óxido nítrico (μM)	Linfócitos (%)	Células fagocíticas (%)
Níveis (ppm de Prod. Ferm.)				
0	2081,32 \pm 1960,77	4,42 \pm 2,35	79,20 \pm 3,34	20,80 \pm 3,34
154	1988,09 \pm 1869,76	4,46 \pm 1,79	80,05 \pm 3,66	19,95 \pm 3,66
461	2182,64 \pm 1594,85	7,29 \pm 3,45	79,05 \pm 7,33	20,95 \pm 7,33
769	1999,28 \pm 1288,55	9,20 \pm 4,30	79,42 \pm 6,36	20,58 \pm 6,36
1.080	2341,57 \pm 1428,68	10,21 \pm 6,22	79,67 \pm 7,17	20,33 \pm 7,17
Efeito	NS¹	Linear²	NS¹	NS¹
Idade das aves (dias)				
7	3914,25 \pm 685,81	6,18 \pm 3,18	84,25 \pm 3,46	15,75 \pm 3,46
21	733,01 \pm 292,82	7,72 \pm 1,71	77,15 \pm 4,45	22,85 \pm 4,45
42	1708,48 \pm 1330,96	9,09 \pm 6,63	77,02 \pm 5,58	22,97 \pm 5,58
Efeito	Quadrático³	Linear⁴	Quadrático⁵	Quadrático⁶
Média Geral	2118,58 \pm 1596,98	7,12 \pm 4,50	79,48 \pm 5,64	20,52 \pm 5,64
Coefficiente de variação (%)	42,73	48,80	5,88	22,76
Médias Iniciais (1 dia de idade)	6476,34	11,63	84,00	16,00
Interação Níveis x Idade	NS¹	NS¹	NS¹	NS¹

¹ Não significativo ao nível de 5%

² $Y = 4,56854 + 0,0159271X$ (Figura 5)

³ $Y = 6654,45 - 446,191X + 7,81976X^2$ (Figura 8)

⁴ $Y = 5,06524 + 0,0879269X$ (Figura 6)

⁵ $Y = 89,9052 - 0,908122X + 0,0143202X^2$ (Figura 10)

⁶ $Y = 10,0948 + 0,908122X - 0,0143202X^2$ (Figura 11)

De acordo com os resultados pode-se verificar que o título de anticorpos contra VDN não diferiu significativamente entre os tratamentos, assim como a porcentagem de linfócitos e células fagocíticas. Contudo, o teor de óxido nítrico apresentou efeito linear em relação aos tratamentos, de maneira que, com o aumento do teor de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos incorporado na ração, houve aumento na concentração de óxido nítrico no soro sanguíneo das aves, como se pode verificar no gráfico abaixo (Figura 5) obtido através da equação do modelo obtido da análise dos dados:

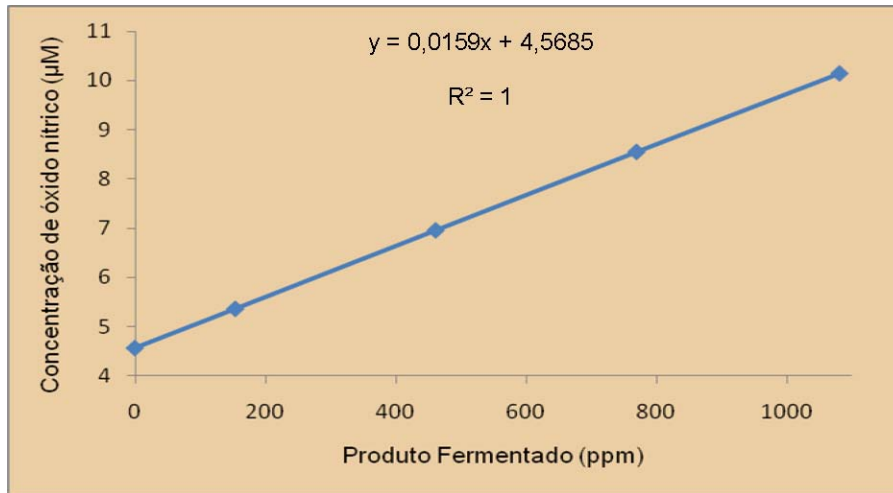


Figura 5 – Concentração de óxido nítrico (NO) em relação aos níveis de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos

O teor de óxido nítrico do soro sanguíneo dos animais com relação à idade das aves apresentou efeito linear como exibido na Figura 6 construída a partir da equação do modelo obtido da análise dos dados.

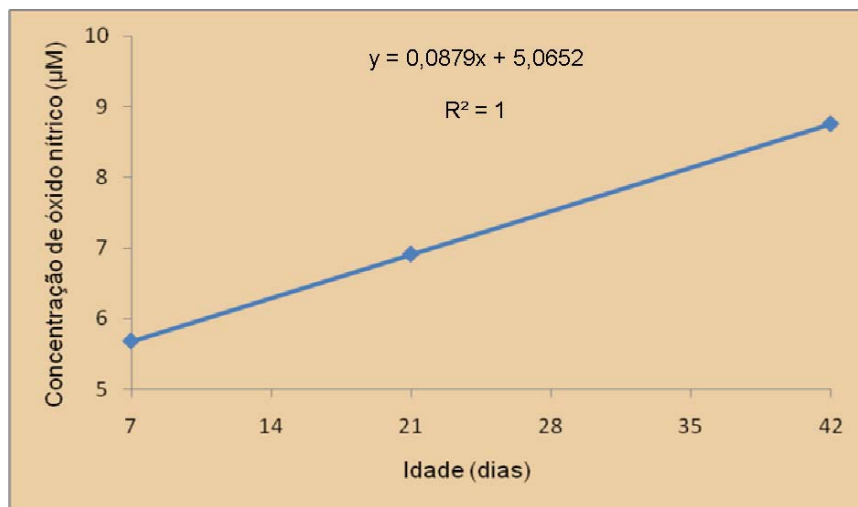


Figura 6 – Concentração de óxido nítrico (NO) em relação aos dias de idade das aves

Desta forma, pode-se verificar aumento no teor de óxido nítrico das aves com envelhecimento das mesmas. Entretanto, esse aumento acontece apenas para as aves tratadas com o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na ração, pois nos animais do grupo controle o comportamento é o inverso, ou seja, ao longo dos 42 dias o teor de óxido nítrico diminuiu, como se observa na tabela abaixo:

Tabela 15 – Análise estatística do teor de óxido nítrico no soro das aves de acordo com cada tratamento nas diferentes idades estudadas

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	Teor de óxido nítrico (μM)		
	7 dias	21 dias	42 dias
0	4,80 ^b	3,77 ^c	2,92 ^b
154	5,08 ^b	5,75 ^{bc}	6,34 ^{ab}
461	6,41 ^{ab}	7,08 ^{abc}	10,61 ^a
769	6,82 ^{ab}	8,15 ^{ab}	11,48 ^a
1.080	9,49 ^a	10,45 ^a	12,28 ^a

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Este resultado pode ser melhor visualizado na Figura 7, a qual apresenta um gráfico construído com as médias obtidas do teor de óxido nítrico no soro das aves de cada tratamento nas diferentes idades.

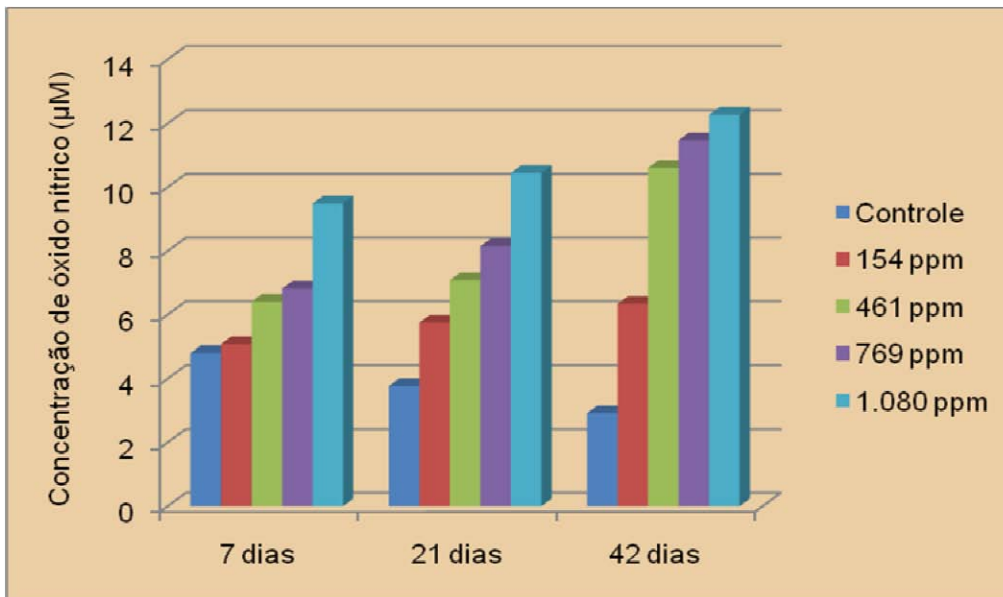


Figura 7 – Médias observadas do teor de óxido nítrico (NO) em cada nível do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos nas diferentes idades das aves

Portanto, fica claro ao se observar o gráfico anterior que o comportamento do teor de óxido nítrico no soro das aves é diferente nos animais tratados com o produto fermentado comparados àqueles que não foram tratados. Isto mostra que a suplementação da ração das aves com o produto fermentado rico

em quitooligossacarídeos fez com que a concentração de óxido nítrico aumentasse no soro dos animais com o passar do tempo, ao contrário do grupo que não recebeu o produto fermentado, onde foi observada uma diminuição do mesmo com aumento da idade.

De acordo com Bowen *et al.* (2007), a concentração de óxido nítrico encontrada em frangos foi cerca de 4,0 μM , valor similar ao encontrado nas aves do grupo controle deste trabalho nas diferentes idades. Todavia, não há trabalhos na literatura sobre a relação do teor dessa substância ao longo do tempo de criação das aves. De qualquer maneira, Dou *et al.* (2007) constataram que quitooligossacarídeos possuem a capacidade de estimular a produção de óxido nítrico *in vitro*, sendo este efeito também confirmado por Wu e Tsai (2007). Tendo em vista que o produto fermentado adicionado na ração é rico em quitooligossacarídeos isso pode explicar o aumento do teor de óxido nítrico nas aves tratadas com o produto, sendo este efeito diretamente proporcional à adição do mesmo na ração.

Óxido nítrico é um composto com atividade citotóxica produzido por heterófilos e monócitos além de ser um sinalizador intracelular (CRIPPEN *et al.*, 2003) e com atividade vasodilatadora (BOWEN *et al.*, 2007). Desta forma, o aumento do teor desse composto no sangue de frangos é algo interessante, primeiramente por sua atividade citotóxica, o que torna o indivíduo com teor mais elevado dessa substância circulante mais apto para reagir contra possíveis infecções, podendo essa eficiência ser refletida no desempenho zootécnico do animal. Além disso, o fato do óxido nítrico ter a capacidade vasodilatadora pode auxiliar na redução da pressão arterial do indivíduo. Segundo González *et al.* (2001) a síndrome de morte súbita em frangos está diretamente relacionada com a incidência de problemas cardíacos nos animais, incluindo estresse e hipertensão arterial. Assim, o aumento de óxido nítrico (vasodilatador) na circulação do animal pode contribuir para reduzir a probabilidade do animal desenvolver problemas cardíacos oriundos da hipertensão arterial, bem como morrer em decorrência da síndrome da morte súbita tanto durante o período de criação quanto no transporte até o abatedouro (estresse).

Com relação ao título de anticorpos contra VDN e a idade das aves houve efeito quadrático mostrado na Figura 8, obtido através da equação do modelo obtido da análise dos dados.

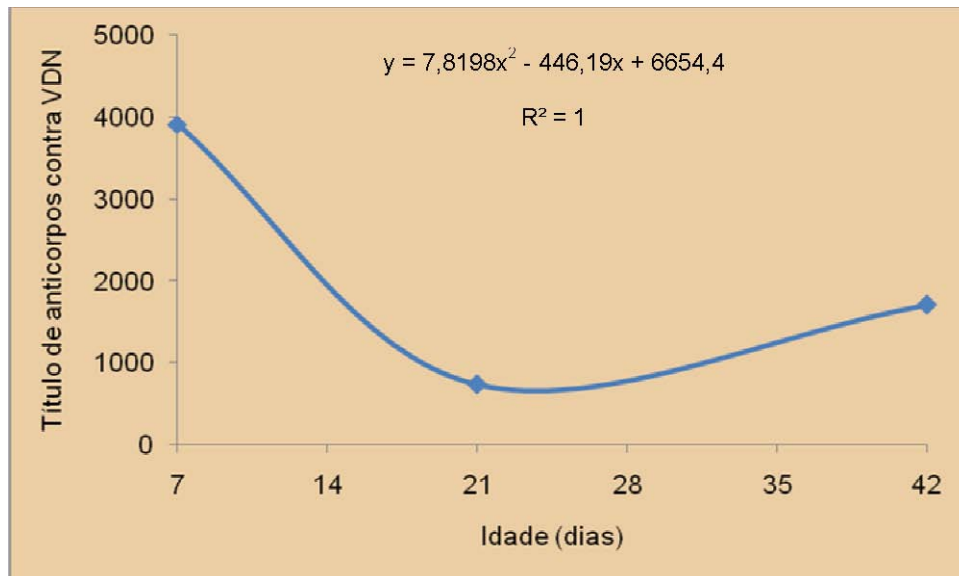


Figura 8 – Título de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle (VDN) em relação aos dias de idade das aves

Pode-se verificar o valor de título de anticorpos de 3914 aos sete dias de idade, com a redução desse valor (733) no vigésimo primeiro dia e aumento novamente do título aos 42 dias de idade (1708). Esse comportamento do título de anticorpos era esperado tendo em vista a imunidade materna, ou seja, a passagem de anticorpos das matrizes imunizadas através do ovo para os pintainhos. Assim, no início da vida dos pintainhos se encontra os maiores níveis de título de anticorpos contra VDN oriundos das matrizes, e com passar do tempo há redução desses níveis (FILHO *et al.*, 2006). Para manutenção do nível elevado do título de anticorpo contra VDN é preciso realizar a imunização dos animais, a qual gera melhor resultado se realizado entre os 7 e 14 dias de idade das aves. Isso porque o indivíduo imunizado leva cerca de 2 a 3 semanas para apresentar no sangue elevação no título dos anticorpos, período em que os anticorpos maternos chegam ao nível mais baixo (ISLAM *et al.*, 2008).

Portanto, este comportamento do título de anticorpos encontrado no presente trabalho, onde há redução do nível entre os 7 e 21 dias de idade e aumento aos 42 dias, demonstra que no início o decréscimo se deve a perda dos anticorpos maternos e, com a vacinação feita aos 7 dias de idade, pode-se observar o aumento no título a partir do vigésimo primeiro dia. Comportamento similar foi encontrado por Tessari *et al.* (2003) analisando anticorpos contra doença de Gumboro em aves vacinadas contra esta enfermidade.

Contudo, apesar do título de anticorpos contra VDN ter apresentado na análise estatística fatorial apenas efeito significativo da idade, pode-se verificar na Tabela 16, que com passar do tempo as aves tratadas com o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos apresentaram aumento mais acentuado que os animais do grupo controle, principalmente aos 21 dias de idade das aves, sendo esse aumento diretamente proporcional ao nível de incorporação do produto fermentado na ração.

Tabela 16 – Análise estatística do título de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle (VDN) no soro das aves de acordo com cada tratamento nas diferentes idades estudadas

Níveis (ppm de Prod. Ferm.)	Título de anticorpos contra VDN		
	7 dias	21 dias	42 dias
0	3844,2*	442,0 ^b	1089,4*
154	4108,3*	531,6 ^{ab}	1498,6*
461	3692,6*	819,6 ^{ab}	1845,7*
769	3855,1*	888,6 ^{ab}	1866,6*
1.080	3741,2*	955,3 ^a	2655,4*

* Não significativo ao nível de 5%

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Esse resultado da produção mais acentuada de anticorpos contra vírus da doença de Newcastle pelas aves tratadas com produto fermentado rico em quitooligossacarídeos, pode ser melhor visualizado na Figura 9.

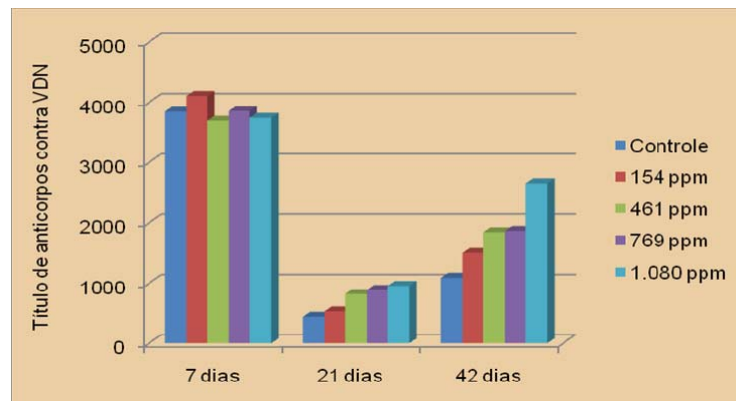


Figura 9 – Médias observadas do título de anticorpos contra vírus da de Newcastle (VDN) em cada nível de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos nas diferentes idades das aves

Assim, pode-se verificar ao observar a Tabela 16 e a Figura 9 que a adição do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na ração das aves, melhorou a produção desses anticorpos específicos, demonstrando maior capacidade dessas aves em controlar possíveis infecções de forma mais eficiente.

A percentagem de linfócitos também apresentou efeito quadrático significativo com relação à idade das aves, como mostra o gráfico a seguir construído através da equação do modelo obtido da análise dos dados:

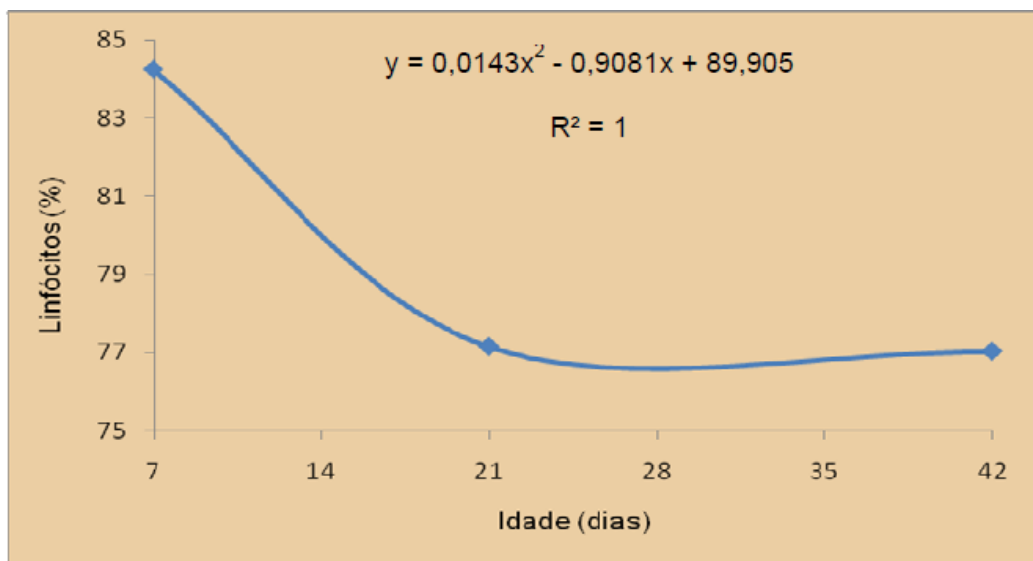


Figura 10 – Percentagem de linfócitos em relação aos dias de idade das aves.

O gráfico anterior mostra que aos 7 dias de idade as aves, segundo a contagem diferencial leucocitária, apresentaram 84,25 % de linfócitos, com redução para 77,15 e 77,02 % aos 21 e 42 dias, respectivamente. Esses resultados indicam o comportamento contrário da percentagem de células fagocíticas, as quais passaram de 15,75 % aos 7 dias de idade para 22,85 e 22,97 % aos 21 e 42 dias de idade respectivamente, como mostra a Figura 11

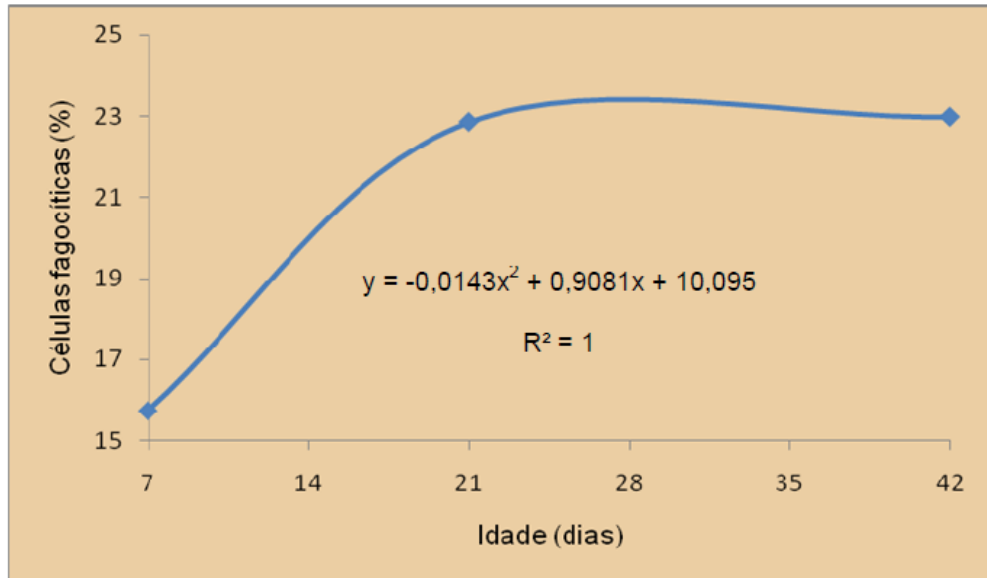


Figura 11 – Percentagem de células fagocíticas em relação aos dias de idade das aves

Esse comportamento de aumento da porcentagem de células fagocíticas já era esperado tendo em vista a diminuição da porcentagem de linfócitos, isso porque esses dois dados somados devem atingir 100%, de maneira que a diminuição de um acarreta no aumento proporcional do outro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além disso, Cardoso e Tessari (2003), analisando vários parâmetros hematológicos de frangos de corte, encontraram resultados semelhantes aos deste trabalho, onde a porcentagem de linfócitos diminuiu com o aumento da idade do animal.

Portanto, a influência do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos administrado na alimentação para aves mostrou influência significativa apenas no teor de óxido nítrico, fazendo com que este aumentasse em concentração no soro sanguíneo com aumento da concentração do produto fermentado na ração. Esses resultados mostram o efeito benéfico causado pela adição do produto na ração, tendo em vista que o óxido nítrico, além de ser importante no sistema imunológico também tem capacidade vasodilatadora, o que pode diminuir a pressão arterial prevenindo problemas cardíacos nas aves e conseqüentemente a probabilidade dos animais sofrerem da síndrome da morte súbita.

Assim, o efeito do produto fermentado em aumentar o nível de óxido nítrico, além de poder diminuir as mortes de aves tanto durante a criação como no

transporte, pode estar relacionado a um bom desempenho zootécnico. Isto porque o aumento deste composto no sangue, tendo em vista sua importância no sistema imunológico, torna o animal melhor preparado contra possíveis enfermidades.

6 CONCLUSÕES

A utilização de meio de cultivo à base de farinha de crisálida se mostrou eficiente como fonte de quitina para produção de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos utilizando o microrganismo *Bacillus* spp DP4;

O produto fermentado apresentou um teor de quitooligossacarídeos de 32,52%, sendo identificados os compostos N-acetilglicosamina, N-acetilquitobiose, N-acetilquitopentose, N-acetilquitohexose e provavelmente N-acetilquitotetrose;

Produto fermentado rico em quitooligossacarídeos apresentou atividade amilolítica e quitinolítica;

O uso do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na alimentação de frangos influenciou o desempenho zootécnico dos animais, entretanto, do ponto de vista estatístico, isto não foi significativo;

Mesmo não significativo, durante o período de criação (42 dias), o valor de conversão alimentar nas aves tratadas (1,69) foi melhor com a suplementação de 461 ppm de produto fermentado (150 ppm de quitooligossacarídeos) em comparação com o grupo controle (1,74).

Apesar da diferença em consumo de ração não ser significativa, cabe mencionar que a utilização do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na alimentação de aves no nível de 461 ppm (150 ppm de quitooligossacarídeos) diminuiu o consumo de ração em 185 g/ave, quando comparado com o grupo controle;

A incorporação do produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na ração para frangos não influenciou na cor e pH da carne do peito assim como nos valores de perdas de peso por cozimento;

A carne do peito (*Pectorales major*) das aves tratadas com 461 ppm de produto fermentado (150ppm de quitooligossacarídeos) na ração apresentou maior valor de textura (força de cisalhamento $-32,730 \text{ Newton/cm}^2$) em relação ao controle ($23,397 \text{ Newton/cm}^2$);

A suplementação de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos na ração para aves não influenciou as percentagens de linfócitos e células fagocíticas no sangue dos animais;

A produção de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle (VDN), após a vacinação das aves, foi proporcionalmente mais acentuada nos grupos tratados com o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos de acordo com o aumento da incorporação do mesmo na ração;

O teor de óxido nítrico (NO) no soro do sangue das aves tratadas com o produto fermentado rico em quitooligossacarídeos aumentou com o passar da idade, diferentemente do grupo controle, o qual teve um comportamento contrário (diminuição de NO ao longo da idade);

Este produto se mostrou eficiente na estimulação do sistema imunológico de frangos de corte (produção de anticorpos contra VDN e óxido nítrico), o que poderia ser traduzido em melhor desempenho zootécnico.

REFERÊNCIAS

ALBINO, L. F. T. et al. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. **R. Bras. Zootec.**, v. 35, n. 3, p. 742 -749, 2006.

ANGELO, E. A. **Otimização de meio de cultivo para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* empregando resíduos agroindustriais**. 2009.83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF). **Exportação Mundial de Carne de Frango**. Disponível em <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 14 de Junho de 2009.

Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF). **Produção Mundial de Carne de Frango**. Disponível em <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 14 de Junho de 2009.

BALA, M. Q. et al. Novel peptidomimics as angiotensin-Converting enzyme inhibitors: A combinatorial approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3685 – 3691, 2002.

BIHAN-DUVAL, E.; MILLET, N.; REMIGNON, H. Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. **Poultry Science**, v. 78, p. 822 – 826, 1999.

BOWEN, O. T. et al. Plasma nitric oxide concentrations in broilers after intravenous injections of lipopolysaccharide or microparticles. **Poultry Science**, v. 86, p. 2550 – 2554, 2007.

BRUNIERA, L. B. **Determinação das condições de cultivo de *Pleurotus ostreatus* em meio líquido visando à produção de enzimas lignolíticas: caracterização da enzima obtida**. 1992. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1992.

BYUN, H. G. et al. Chitooligosaccharides as a novel β -secretase inhibitor. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 198 – 202, 2005.

CABRERA, J. C.; CUTSEM, P. V. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. **Biochemical Engineering Journal**, n. 25, p. 165 – 172, 2005.

CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169 – 173, 2001.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644 – 650, 2007.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 419 – 424, 2003.

CASON, J. A.; LYON, C. E.; PAPA, C. M. Effect of muscle opposition during rigor on development of broiler breast meat tenderness. **Poultry Science**, v. 76, p. 785 – 787, 1997.

CASTRO-GOMEZ, R. J. H. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1992. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

CHAKRABARTI, S.; PATEL, K. D. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. **Exp. Lung Res.** v. 31, p. 599 – 621, 2005.

CHEN, A. S. et al. Antioxidant activities of chitobiose and chitotriose. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 9, p. 1326 – 1330, 2003.

CRIPPEN, T. L. et al. Nitric oxide production by chicken immune cells. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 603 – 610, 2003.

DIONIZIO, M. A. et al. Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte – Desempenho e rendimento da carcaça. **Ciênc. Agrotec.**, ed. esp., p. 1580 - 1587, 2002.

DOU, J. et al. Effects of chitooligosaccharides on rabbit neutrophils in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 209 – 213, 2007.

- FARIA, D. E. et al. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. Probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 18 -28, 2009a.
- FARIA, D. E. et al. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 2. Ácidos orgânicos e probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 29 -39, 2009b.
- FERNANDES, A. R. M. et al. Composição em ácidos graxos e qualidade da carne de tourinhos Nelore e Canchim alimentados com dietas à base de cana-de-açúcar e dois níveis de concentrado. **R. Bras. Zootec.**, v. 38, n. 2, p. 328 – 337, 2009.
- FILHO, J. L. C. A. et al. Níveis de anticorpos contra doença de Newcastle mediante a imunização com vacinas associadas com os vírus da bronquite infecciosa e da infecção da bursa de Fabrícus. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 13, n. 1, p. 58 – 62, 2006.
- FLEMMING, J. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 41 – 47, 2005.
- GAO, F. et al. The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 142, p. 173 – 184, 2008.
- GARCIA, E. R. .M. et al. Efeito da suplementação enzimática em rações com farelo de soja e soja integral extrusada sobre a digestibilidade de nutrientes, o fluxo de nutrientes na digesta ileal e o desempenho de frangos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, n.5, p.1414-1426, 2000.
- GATTASS, C. B. A. et al. Efeito da suplementação com cultura de levedura na fermentação ruminal de bovinos de corte. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 37, n. 4, p. 711 - 716, 2008.
- GONZÁLEZ, F. H. D.et al. Incidência de doenças metabólicas em frangos de corte no sul do brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 3, n. 2, 2001.
- GRIGGS, J. P.; JACOB, J. P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 14, p. 750 – 756, 2005.

GUO, F. C. et al. Effects of Mushroom and Herb Polysaccharides, as Alternatives for an Antibiotic, on the Cecal Microbial Ecosystem in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 83, p. 175 – 182, 2004.

HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 35 – 39, 2004.

HUANG, R.; MENDIS, E.; KIM, SE-K. Improvement of ACE inhibitory activity of chitooligosaccharides (COS) by carboxyl modification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 3649 – 3655, 2005.

HUANG, R. et al. Strong eletronic charge as na important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). **Life Sciences**, v. 78, p. 2399 – 2408, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: O Instituto, 1985. v. 1.

ISLAM, M. S. et al. Determination of immune response of imported Newcastle disease virus vaccines in broiler chickens. **Bangl. J. Vet. Med.**, v. 6, n. 2, p. 139 – 144, 2008.

ITANO, F. H. **Otimização da produção de quitinases de *Bacillus* spp.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

JEON, Y. J.; KIM, S. K. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 133 – 141, 2000.

JEON, Y. J.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 71 – 76, 2001.

JUNG, W. J. et al. Enzymatic production of N-acetyl chitooligosaccharides by crude enzyme derived from *Paenibacillus illioisensis* KJA-424. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 256 – 259, 2007.

JUNG, W. K.; MOON, S. H.; KIM, S. K. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. **Life Sciences**, v. 78, p. 970 – 976, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases : regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 809 – 824, 2003.

KIM, M. M.; KIM, S. K. Chitooligosaccharides inhibit activation and expression of matrix metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2661 – 2666, 2006.

KIM, Se-K. ; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 357 – 358, 2005.

KITTUR, F. S. et al. Chitooligosaccharides: preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1239 – 1245, 2005.

KONSULA, M.; KYRIAKIDES, M. L. Hydrolysis of starches by the action of an α -amilase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1745 – 1749, 2004.

KUMAR, A. B. V. et al. Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **Biochemical Journal Immediate Publication**, 2005.

LIN, C. W.; LIN, J. C. Characterization and blood coagulation evaluation of the water soluble chitooligosaccharides prepared by a facile fractionation method. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1691 – 1697, 2003.

LIN, C. W. et al. The inhibition of TNF- α -induced E-selectin expression in endothelial cells via the JNK/NF- κ B pathways by highly N-acetylated chitooligosaccharides. **Biomaterials**, v. 28, p. 1355 – 1366, 2007.

LODDI, M. M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Rev. Brás. Zootec.**, v. 29, n. 4, p. 1124 -1131, 2000.

LOREÇON, L. et al. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v.29, n. 2, p. 151 – 158, 2007.

MAIORKA, A. et al. Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 3, n. 1, p. 75 – 82, 2001.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Resanim. Sci.**, v. 42, n. 6, p. 465 – 470, 2005.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Mol. Aspects Med.** v. 26, p. 33 – 65, 2005.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. A.; BENAYAS, C. G.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p.679–681, 1998.

PADILHA, M. T. S. et al. Efeito de promotores de crescimento na biota digestiva de frangos de corte. **Magistra**, v. 18, n. 1, p. 07 – 13, 2006.

PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos.** São Paulo, Roca, 2005.

PANIS, C. **Papel antagônico das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS) em camundongos nocautes para 5lipoxigenase infectados com *Trypanosoma cruzi*.** 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4930 – 4934, 2003.

PELICANO, E. R. L. et al. Productive traits of broiler chickens fed diets containing different growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 3, p. 177 – 182, 2004.

PETROVSKA, B. B. et al. Investigation of dietary fibre in some edible mushrooms from Macedonia. **Journal: Nutrition & Food Science**, v. 31, n. 5, p. 242 – 246, 2001.

PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1722, p. 22 – 29, 2005.

RAJAPAKSE, N. et al. Inhibition of free radicalmediated oxidation of cellular biomolecules by carboxylated chitoooligosaccharides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 997 – 1003, 2007.

RIBEIRO, A. M. L. et al. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. **R. Bras. Zootec.**, v. 37, n. 4, p. 636 – 644, 2008.

ROSSETTO, M. R. M.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 076 – 081, 2004.

ROUSSEAU-PLASSE, A.; LENFANT, M.; POTIER, P. Catabolism of the hemoregulatory peptide N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro: a new insight into the physiological role of the angiotensin-I-converting enzyme N-active site. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 1113 – 1119, 1996.

RUTZ, F. et al. Desempenho e características de carcaças de frangos de corte recebendo extrato de leveduras na dieta. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 349 – 345, 2006.

SARTORI, J. R. et al. Enzima e simbiótico para frangos criados nos sistemas convencional e alternativo. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 235 – 240, 2007.

SILVA, E. N. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com rações contendo probióticos, antibióticos e duas fontes de fósforo. **Ciênc. Agrotec.**, ed. esp., v. 24, p. 225 -232, 2000.

SILVA, H. O.; FONSECA, R.A.; FILHO, R.S.G. Características produtivas e digestibilidade da farinha de folhas de mandioca em dietas de frangos de corte com e sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.823-829, 2000b.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 4, 1998.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. Avaliação de “kits” comerciais de teste ELISA para a detecção de anticorpos contra o vírus da doença de gumboro em plantéis avícolas vacinados. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n.1, p.419 – 424, 2003.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p.61 – 87, 2003.

TOLEDO, G. S. P. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1760 -1764, 2007.

VETTER, J. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. **Food Chemistry**, v. 12, p. 6 – 9, 2007.

VIOLA, E. S. et al. Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos láctico, fórmico, acético, e fosfórico no alimento ou na água. **R. Bras. Zootec.**, v. 37, n. 2, p. 296 – 302, 2008.

WANG, Y. et al. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 16, p. 174 – 177, 2007.

WEISBURG, W. G. et al. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697 – 703, 1991.

WU, G. J. ; TSAI, G. J. Chitooligosaccharides in combination with interferon- γ increase nitric oxide production via nuclear factor- κ B activation in murine RAW264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 250 – 258, 2007.

YUSUPOVA, Z. R. et al. The effect of chitooligosaccharides on hydrogen peroxide production and anionic peroxidase activity in wheat coleoptiles. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, n. 2, p. 238 – 242, 2005.

ZHANG, H. et al. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 257 – 260, 1999.

ZHOU, T. X. et al. Effects of chitooligosaccharide supplementation on performance, blood characteristics, relative organ weight, and meat quality in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 8, p. 593 – 600, 2009.