

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ÁCIDO BENZÓICO E ÓLEOS ESSENCIAIS COMO
ALTERNATIVA AOS PROMOTORES DE
CRESCIMENTO PARA FRANGOS DE CORTE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patricia Cruz Aristimunha

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**ÁCIDO BENZÓICO E ÓLEOS ESSENCIAIS COMO
ALTERNATIVA AOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO
PARA FRANGOS DE CORTE**

Patricia Cruz Aristimunha

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Avicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia.**

Orientador: Alexandre Pires Rosa

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cruz Aristimunha, Patricia

Ácido benzóico e óleos essenciais como alternativa aos promotores de crescimento para frangos de corte / Patricia Cruz Aristimunha.-2013.

90 p.; 30cm

Orientador: Alexandre Pires Rosa

Coorientadores: Irineu Zanella, Marcos Martinez do Vale

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2013

1. Ácido benzóico 2. Aditivos fitogênicos 3. Promotor de crescimento alternativo 4. Produção avícola I. Pires Rosa, Alexandre II. Zanella, Irineu III. Martinez do Vale, Marcos IV. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ÁCIDO BENZÓICO E ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA
AOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO PARA FRANGOS DE
CORTE**

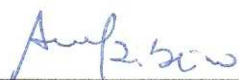
elaborada por
Patricia Cruz Aristimunha

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia


COMISSÃO EXAMINADORA



Alexandre Pires Rosa, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Andréa Machado Leal Ribeiro, Dra. (UFRGS)



Maristela Lovato, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a graça de viver a todo instante a minha vocação. Por me mostrar o caminho certo para ser feliz, sem trair meus ideais;

Ao meu grande mestre, a quem dedico esta Dissertação, meu pai Jorge Luiz Aristimunha, meu exemplo de vida e profissional, o exemplo que me fez chegar até aqui;

A minha mãe Fátima e meu irmão Jorge Junior, pelo apoio quando tive que tomar a decisão mais importante da minha vida até o momento: largar tudo para voltar a estudar. E por entenderem os meus momentos de ausência em suas vidas;

Aos mestres da UFSM, responsáveis por minha formação, em especial à professora Maristela Lovato Flôres, com quem aprendi a gostar do trabalho com aves, ao professor Irineu Zanella e Jânio Santurio pelos ensinamentos e apoio durante a pós-graduação. Ao professor Alexandre Pires Rosa, meu orientador, pela oportunidade de me tornar mestre.

A toda equipe do LAVIC pela acolhida, amizade, incentivo, apoio, confiança e por superarem minhas expectativas em relação ao convívio e trabalho durante este período;

Ao Eduardo Muliterno: sem seu apoio e companherismo esse mestrado não seria possível.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

ÁCIDO BENZÓICO E ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO PARA FRANGOS DE CORTE

AUTORA: PATRICIA CRUZ ARISTIMUNHA

ORIENTADOR: ALEXANDRE PIRES ROSA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013.

Os antimicrobianos (antibióticos) promotores de crescimento vêm sendo utilizados há mais de 50 anos na produção de frangos de corte para melhorar o desempenho zootécnico e prevenir doenças. Porém, devido às diversas discussões sobre a possibilidade de resistência bacteriana pelo uso destes antimicrobianos e às limitações internacionais de aquisição de produtos cárneos oriundos de países onde ocorre o uso destes promotores, tem-se buscado produtos alternativos para a substituição dos mesmos. O objetivo deste estudo foi avaliar a adição do produto CRINA[®] Poultry Plus (CPP), uma combinação de compostos de ácido benzóico e óleos essenciais, em dietas de frangos de corte e sua ação como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento. Mil quinhentos e cinqüenta pintos de corte Cobb 500, machos, foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado composto por 5 tratamentos com 10 repetições de 31 aves por repetição. As dietas foram: CN – controle negativo, dieta sem promotor de crescimento; CP – controle positivo, dieta com 10 ppm de Avilamicina (AVI); DCPP - dieta com 300 ppm de CPP de 1-42 dias; AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d) - dieta com 10 ppm de AVI de 1-21 dias e 300 ppm de CPP de 22-42 dias e AVI+CPP_(1-42d) – dieta com 10 ppm de AVI e 300 ppm de CPP de 1-42 dias. Todas as dietas possuíam os mesmos níveis nutricionais. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey. Aos 42 dias de idade, aves do CN apresentaram menor ($P=0,0001$) peso corporal que os outros tratamentos, e aves do tratamento DCPP tiveram melhor peso quando comparadas ao CP. No período de 1-42 dias, a dieta DCPP aumentou ($P=0,0001$) o ganho de peso das aves em relação ao CN e CP. Em relação às aves do CN, todas as outras apresentaram melhores conversão alimentar no período de 1-42 dias ($P=0,0001$) e Índice de Eficiência Produtiva ($P=0,0030$). Aves alimentadas com DCPP, AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d) e AVI+CPP_(1-42d) apresentaram maior ganho de peso médio diário ($P=0,0001$) que as aves alimentadas com CN e CP. As aves do CN obtiveram menor resultado na aviação de comprimento intestinal ($P=0,0223$) que aves do CP e AVI + CPP_(1-42d). Os escores de lesão por *E. acervulina* foram maiores nas aves do CN ($P=0,0050$) e as aves dos demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si. Para *E. maxima* e *E. tenella* não foram encontradas diferenças significativas. Os resultados sugerem que o CRINA[®] Poultry Plus pode ser utilizado como uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte, sem prejuízos no desempenho das aves.

Palavras-chave: Aditivos fitogênicos. Ácido benzóico. Promotor de crescimento alternativo. Produção avícola

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

BENZOIC ACID AND ESSENTIAL OIL COMPOUNDS AS AN ALTERNATIVE TO ANTIBIOTIC GROWTH PROMOTERS IN BROILER DIETS

AUTHOR: PATRICIA CRUZ ARISTIMUNHA

ADVISER: Dr. ALEXANDRE PIRES ROSA

Presentation Place and Date: Santa Maria, 27 February, 2013.

In the last 50 years the antibiotic growth promoters have been used in feed to improve the performance and prevent diseases in broilers. However, due to several discussions about the possibility of bacterial resistance induction and to the international limitations of meat purchase from countries where these promoters are used, some alternative products has been searched in order to substitute those ones. This study aimed to evaluate the addition of CRINA[®] Poutry Plus (CPP), a blend of benzoic acid and essential oil compounds, in broiler diets and its action as an alternative to antibiotic growth promoters. One thousand five hundred fifty one-day old Cobb 500 males were used in a randomly assigned in 5 treatments with 10 replicate pens of 31 birds each. The diets were: NC-without growth promoters; PC-with 10 ppm of Avilamycin (AVI); CPPD-with 300 ppm of CPP from 1-42 days; AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d)- with 10 ppm AVI from 1–21 days and 300 ppm of CPP from 22-42d and AVI+CPP_(1-42d) -with 10 ppm AVI and 300 ppm of CPP from 1-42d. All the diets had the same nutrient levels. The data were submitted to ANOVA and Tukey's test. At 42 days the NC group had lower ($P=0.0001$) body weight than others treatments, and CPPD had better weight than PC. CPPD diet increased ($P<0.001$) body weight gain in 1-42d period compared to birds fed on NC diet and PC diet. In relation to NC, all other groups showed better feed conversion rate ($P<0.001$) on 1-42 period and European Productive Efficiency Index ($P<0.001$). Birds fed with CPPD, AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d) and AVI+CPP_(1-42d) presented higher average daily gain than birds fed with NC and PC diets. The NC birds showed lower result in gut lenght ($P=0.022$) than PC and AVI + CPP_(1-42d). The lesion scores by *E. acervulina* was highest in the NC ($P=0.005$) and other treatments didn't show significant differences. For *E. maxima* and *E. tenella*, no significant differences were found. The results suggest that CRINA[®] Poutry Plus can be used as an alternative product to antibiotic growth promoters in broiler diets without losses in productive performance.

Key words: Alternative growth promoters. Poultry. Benzoic Acid. Animal performance. Plant extracts.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
1. ESTUDO BIBLIOGRÁFICO	9
1.1 Antimicrobianos promotores de crescimento	9
1.1.1 As restrições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento	11
1.2 Ácidos orgânicos	14
1.2.1 Ácido benzóico	15
1.3 Óleos essenciais	18
1.3.1 Os princípios ativos eugenol, timol e piperina	22
1.4 Estudos anteriores com a combinação de ácido benzóico e óleos essenciais (CRINA® Poutry Plus)	26
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS	28
2.1 Hipóteses	28
2.2 Objetivos	28
2.2.1 Geral	28
2.2.2 Específicos.....	28
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MATERIAIS E MÉTODOS	30
CAPÍTULO 2	34
CRINA® POULTRY PLUS IN BROILER DIETS	34
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	37
MATERIAL AND METHODS	38
<i>Experimental design</i>	39
<i>Statistical analysis</i>	40
RESULTS AND DISCUSSION	40
ACKNOWLEDGMENTS	46
REFERENCES	46
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA	56
ANEXOS	65
Anexo A- Instrução aos autores para publicação na Revista Poultry Science	65

INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira destaca-se como uma das atividades mais dinâmica, avançada tecnologicamente, competitiva e fortemente consolidada nos mercados interno e externo. A atividade absorve uma porcentagem expressiva da produção nacional de grãos, possibilita o desenvolvimento de novas regiões, o aumento da produção agrícola, a fixação do agricultor no campo e conseqüente geração de riquezas. Além disso, tem se destacado cada vez mais pela capacidade de alta e rápida produção de alimentos de excelente qualidade e de baixo custo, permitindo à população de todas as rendas terem acesso à proteína animal, prova disso é o alto consumo nacional *per capita* da carne de frango que, em 2010, alcançou 44 kg (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2011).

A carne de frango representa um dos principais produtos que compõem a balança econômica do país, sendo que no primeiro trimestre de 2011 as exportações deste produto chegaram a 893,9 mil toneladas, gerando uma receita de US\$ 1,744 bilhão. Estes resultados corresponderam a 69% do volume de carnes exportadas (quatro carnes), gerando 52% da receita cambial de carnes (AVISITE, 2011).

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

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

Por estas razões, a indústria avícola tem buscado alternativas ao uso dos antimicrobianos, objetivando manter a mesma eficiência produtiva proporcionada pelos promotores antimicrobianos tradicionais e sem o perigo de induzir a resistência microbiana. Faz-se necessário continuar o desenvolvimento de novas tecnologias e pesquisas para possibilitar

alternativas de substituição aos antibióticos promotores de crescimento, dando-se foco ao uso de combinações dos pró-nutrientes disponíveis, como os probióticos, prebióticos, leveduras e derivados de parede de leveduras, ácidos orgânicos, extratos vegetais e enzimas, que modificam de uma maneira menos agressiva a flora intestinal promovendo um melhor equilíbrio desta (MCCARTNEY, 2008).

Devido às lacunas ainda existentes acerca de quais produtos são realmente eficientes ao substituírem os antibióticos promotores de crescimento, este estudo objetivou testar a combinação de ácido benzóico e óleos essenciais, denominada CRINA[®] Poutry Plus¹, como aditivo alternativo, através da experimentação animal. O problema de pesquisa e as questões a serem respondidas são apresentados nesta dissertação através de um estudo bibliográfico, um artigo científico, e conclusões.

¹ Aditivo zootécnico formulado com ácido benzóico e óleos essenciais com conteúdo mínimo de 80% ácido benzóico, 1% timol, 0,5% eugenol e 0,05% piperina. DSM Nutritional Products Ltd., P.O. Box 3255 CH-4002 Basel, Switzerland

CAPÍTULO 1

1. ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

1.1 Antimicrobianos promotores de crescimento

O efeito de antibióticos como promotores de crescimento foi descoberto em 1940, quando se observou melhora de crescimento em animais alimentados com micélios de *Streptomyces aureofaciens* contendo clortetraciclina. A partir de então, os antibióticos vêm sendo utilizados como promotores de crescimento na avicultura (CASTANON, 2007).

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

O uso dos antibióticos é estritamente regulado pelas agências internacionais *Food and Drug Administration* (FDA) e *U.S. Department of Agriculture* (USDA), sendo a FDA responsável por aprovar o uso de antibióticos na produção avícola (DONOGHUE, 2003).

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

Segundo Santana et al. (2011) os antibióticos promotores de crescimento são utilizados para controlar ou equilibrar a proliferação de bactérias gram-positivas que podem liberar metabólitos tóxicos que comprometem o ganho de peso, e que causam competição por nutrientes com o hospedeiro e estímulo excessivo do sistema imune local.

Lillehoj e Lee (2012) relatam que esta hipótese de ação antimicrobiana direta dos APC sobre a microflora intestinal é suportada por observações que demonstraram maior crescimento

de frangos criados em ambientes com desafios sanitários suplementados com APC e a falta deste efeito potencializador de crescimento em frangos criados em ambientes livres de patógenos ou extremamente limpos.

Dibner e Richards (2005) relatam que o mecanismo de ação dos antibióticos promotores de crescimento é no intestino, já que alguns antibióticos não são absorvidos. Os efeitos diretos dos APC na microflora são o decréscimo da competição por nutrientes, redução dos metabólitos microbianos responsáveis por deprimir o crescimento das aves e redução da espessura da parede intestinal e vilosidades. Essa redução de espessura ocorre em parte pela redução na proliferação celular da mucosa que ocorre na ausência de produtos derivados da fermentação microbiana. Esta redução na espessura de parede pode explicar o aumento na digestibilidade dos nutrientes observada com o uso de APC.

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

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

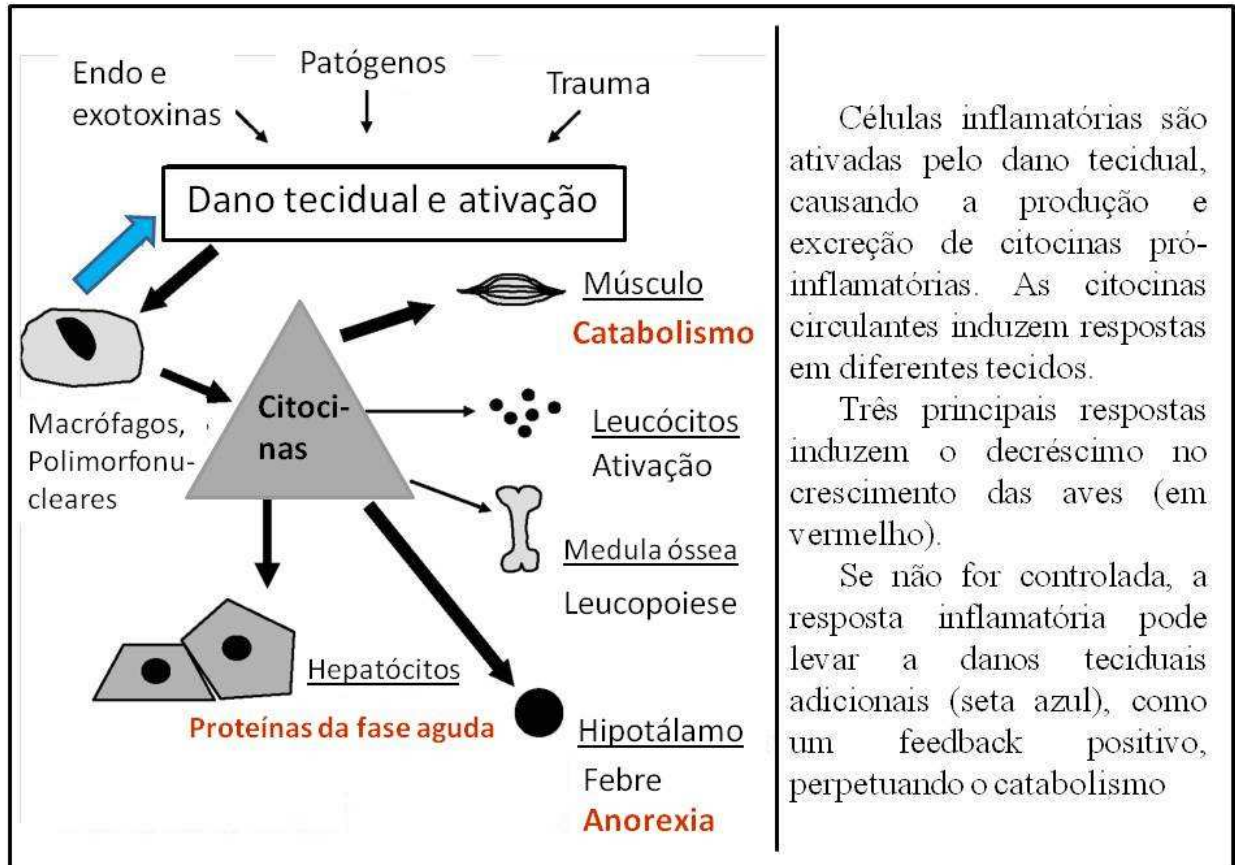


Figura 1 – Respostas inflamatórias das aves perante o dano tecidual

Fonte: adaptado de Niewold (2007)

1.1.1 As restrições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação animal tem sido questionado em função do desenvolvimento de bactérias resistentes. Um dos primeiros relatos desta resistência na produção animal foi realizado por Elliott e Barnes (1959), que observaram resistência à tetraciclina em frangos de corte. Outros pesquisadores, como Collignon (1999) relataram a resistência de *Enterococcus spp.* associada ao uso de avoparcina como promotor de crescimento em animais de produção.

Segundo Kelley et al. (1998), em uma população de bactérias, em um ambiente natural, aproximadamente 2% são resistentes a qualquer tipo de antibiótico. No entanto, em uma

população bacteriana isolada de animais expostos regularmente ao uso de antibióticos, mais de 10% têm sido identificadas como resistentes. Estas bactérias resistentes são eliminadas nas fezes, onde podem trocar plasmídios extracromossomais resistentes a antibióticos (r-plasmídios) com as bactérias nativas, que se disseminam para outros animais. *Salmonella spp.* e seus r-plasmídios têm sido estudados nos resíduos de produção avícola, e têm se mostrado capazes de transmitir resistência para outras espécies, incluindo *E. coli*.

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

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

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

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

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

É pois necessário estabelecer uma data após a qual seja proibida a utilização de antibióticos ainda autorizados como *fatores* de crescimento, prevenindo simultaneamente um período suficiente para o desenvolvimento de produtos alternativos para substituir esses antibióticos. Deverão tomar-se medidas para proibir a autorização de novos antibióticos para utilização como aditivos na alimentação animal (...) (PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, 2003)

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

De acordo com Dibner e Richards (2005) nos Estados Unidos tem havido poucas atividades regulatórias em relação ao uso de APC. Recomendações para reduzir ou eliminar o uso de antibióticos na alimentação animal foram feitas em relatórios dos *Institute of Medicine* (1980, 1989), *Council for Agricultural Science and Technology* (1981), *World Health Organization* (1997) e *Committee on Drug Use in Food Animals* (1998). Em 2000, a WHO sugeriu que os APC que estão na mesma classe dos antibióticos utilizados em humanos sejam rapidamente retirados da produção animal. Também sugeriu que os antibióticos na produção animal sejam utilizados apenas de forma terapêutica e por prescrição.

Apesar das poucas regulações nos Estados Unidos, os consumidores americanos vêm pressionando a indústria e comércio a remover os APC da alimentação animal. Exemplo disso é que os web sites do *McDonald's Corporation* e da *KFC Corporation* possuem declarações de que não aceitam carne de frango que utilizaram APC (DIBNER; RICHARDS, 2005)

Após a proibição dos APC na Dinamarca, segundo os registros, as mortalidades devido à enterite necrótica não aumentaram. Deve ser observado, no entanto, que o consumo do ionóforo anticoccidiano salinomicina, que tem atividade contra *Clostridium perfringens*, tem aumentado na Dinamarca desde a proibição dos APC (DIBNER e RICHARDS, 2005). No Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho consta que o uso de substâncias coccidiostáticas como aditivos para alimentação animal deveria ser gradualmente suprimida até 31 de dezembro de 2012, o que efetivamente não ocorreu.

Segundo o relatório da Comissão das Comunidades Europeias ao Conselho e ao Parlamento Europeu sobre a utilização de coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados à alimentação animal, de 05 de maio de 2008, o uso profilático de coccidiostáticos será mantido, porém a Comissão Europeia continuará a acompanhar a criação de novas substâncias e de técnicas de prevenção das doenças (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2008).

Estas regulamentações têm forçado os países que tem interesse em exportar produtos de origem animal a buscar alternativas que garantam o crescimento dos animais sem afetar a qualidade do produto final (SANTURIO et al., 2007). É também relevante o fato de que estudos e experiências práticas de retirada gradativa dos antibióticos como promotores de crescimento de dietas de frangos têm demonstrado redução no desempenho das aves e na lucratividade do setor avícola (CASTANON, 2007).

1.2 Ácidos orgânicos

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

Após sua ingestão, os ácidos orgânicos tem sua atividade antimicrobiana direta mais elevada no papo e moela das aves, que possuem uma capacidade limitada de modificar o pH da digesta (DIBNER; BUTTIN, 2002). Segundo Partanen e Mroz (1999), os ácidos orgânicos podem influenciar a morfologia da mucosa do trato gastrointestinal, bem como estimular a secreção pancreática e servir como substrato no metabolismo intermediário. Esses possíveis benefícios podem resultar na melhoria do metabolismo gastrointestinal, favorecendo o processo de digestão, absorção e retenção de nutrientes.

De acordo com Dahiya et al. (2006) o princípio chave do modo de ação dos ácidos orgânicos nos microorganismos é que os mesmos, em sua forma não dissociada (não ionizada, mais lipofílica), conseguem penetrar a parede celular deste microorganismos e alterar sua fisiologia. Nas bactérias, eles reduzem o pH interno, e como as bactérias não toleram grandes variações de pH entre o meio externo e interno, as obriga a gastarem energia e, eventualmente, pararem seu crescimento ou morrerem tentando trazer seu pH interno aos níveis normais.

Corroborando estas afirmações, Viola e Vieira (2007) afirmam que a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos está relacionada à redução do pH e à capacidade de dissociação de suas carboxilas. Quando estão em sua forma não dissociada estes ácidos penetram passivamente na célula microbiana, liberando prótons e ânions, o que resulta em redução do pH intracelular, inibindo a ação de enzimas e podendo levar o microorganismo à morte. Esta ação depende do acúmulo de ânions no conteúdo intracelular do microorganismo.

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

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

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

1.2.1 Ácido benzóico

Entre os ácidos orgânicos, o ácido benzóico (ácido benzeno carboxílico ou carboxilbenzeno) é um dos mais importantes ácidos carboxílicos aromáticos. Esse ácido foi obtido pela primeira vez no começo do século XVII por Scheele, por meio da sublimação da goma de benzoína (*Styrax benzoin*) (GHELER et al., 2009). Há mais de 100 anos é conhecido o poder de inibição fúngica deste ácido, e por causa desta propriedade, vem sendo usado para preservação de alimentos como sucos de frutas, pickles, vinho e preparações farmacêuticas (KREBS et al., 1983).

Em termos de uso internacional dos ácidos orgânicos, McCartney (2008) afirma que o formato de potássio e ácido benzóico são dois produtos pioneiros aprovados na União Européia como aditivos zootécnicos (promotores de desempenho) em suínos, em dosagens de 5 a 18 kg/t de ração.

A taxa de absorção dos ácidos orgânicos depende de seus pKa (potencial de dissociação = $-\log K_a$) e do pH intestinal. Ácidos graxos de cadeia curta são rapidamente absorvidos quando o pH do lúmen está abaixo de seus pKa. Embora o pH do conteúdo de íleo, ceco e cólon estejam geralmente acima dos valores do pKa dos ácidos (o que os manteria quase que totalmente na sua

forma ionizada e pouco absorvida), ocorre uma queda no valor do pH na superfície absorptiva devido à troca iônica (Na-H) exercida pelas células do epitélio, transformando-os na forma não-ionizada e absorvível, devido ao gradiente eletroquímico constante estabelecido entre o lúmen e a célula epitelial (PARTANEN; MROZ, 1999).

Como as medidas do pH dos segmentos intestinais das aves apresentam valores de 6,4 no duodeno, 6,6 no jejuno e 7,2 no íleo, determinados acidificantes agirão melhor em uma porção do sistema digestivo e outros em outras porções. O ácido benzóico, com o pKa de 4,19 possui ação bactericida em pH mais elevado do que outros ácidos, como o láctico (pKa 3,82); ou seja, age melhor do que outros ácidos em todas as porções do trato gastrointestinal, incluindo a posterior (FRANCO, 2009).

Estudos demonstram que o ácido benzóico tem propriedades antimicrobianas principalmente por seu efeito inibitório sobre diversas enzimas microbianas, em particular a alfa-cetoglutarato desidrogenase e succinato desidrogenase (KLUGE et al., 2006), inibindo a sequência do Ciclo de Krebs, como apresentado na figura 2.

O ácido benzóico tem sido identificado como um eficiente aditivo alimentar para promover a melhora no desempenho zootécnico, na digestibilidade dos nutrientes e no balanço de nitrogênio, assim como reduzir a população de bactérias gram-negativas no trato gastrintestinal de suínos. Também se encontrou redução do número de coliformes nos cecos de pintos de corte, indicando que a atividade antimicrobiana do ácido benzóico pode influenciar benéficamente a saúde do intestino das aves (WEBER et al. 2012).

Viola e Vieira (2007) avaliaram o efeito da suplementação de acidificantes (mistura de ácidos láctico, fórmico, cítrico, acético, ortofosfórico e benzóico) na dieta sobre o desempenho zootécnico e a morfologia intestinal de frangos de corte, através da comparação de aves que receberam antibióticos promotores de crescimento, acidificantes ou nenhum aditivo. Houve um benefício geral do uso de acidificantes sobre a conversão alimentar, na manutenção do desempenho e das condições morfológicas do intestino delgado das aves, respostas similares aos benefícios obtidos com o uso de antibióticos.

No experimento de Rocha (2008) com frangos de corte desafiados com *Salmonella Typhimurium*, observou-se que a mistura de ácidos orgânicos (ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metil-tio-butanóico), utilizada na dosagem de 0,4%, potencializou o desempenho zootécnico, foi eficaz no controle de *Salmonella Typhimurium* e protegeu contra lesões hepáticas quando as aves foram inoculadas experimentalmente com este patógeno.

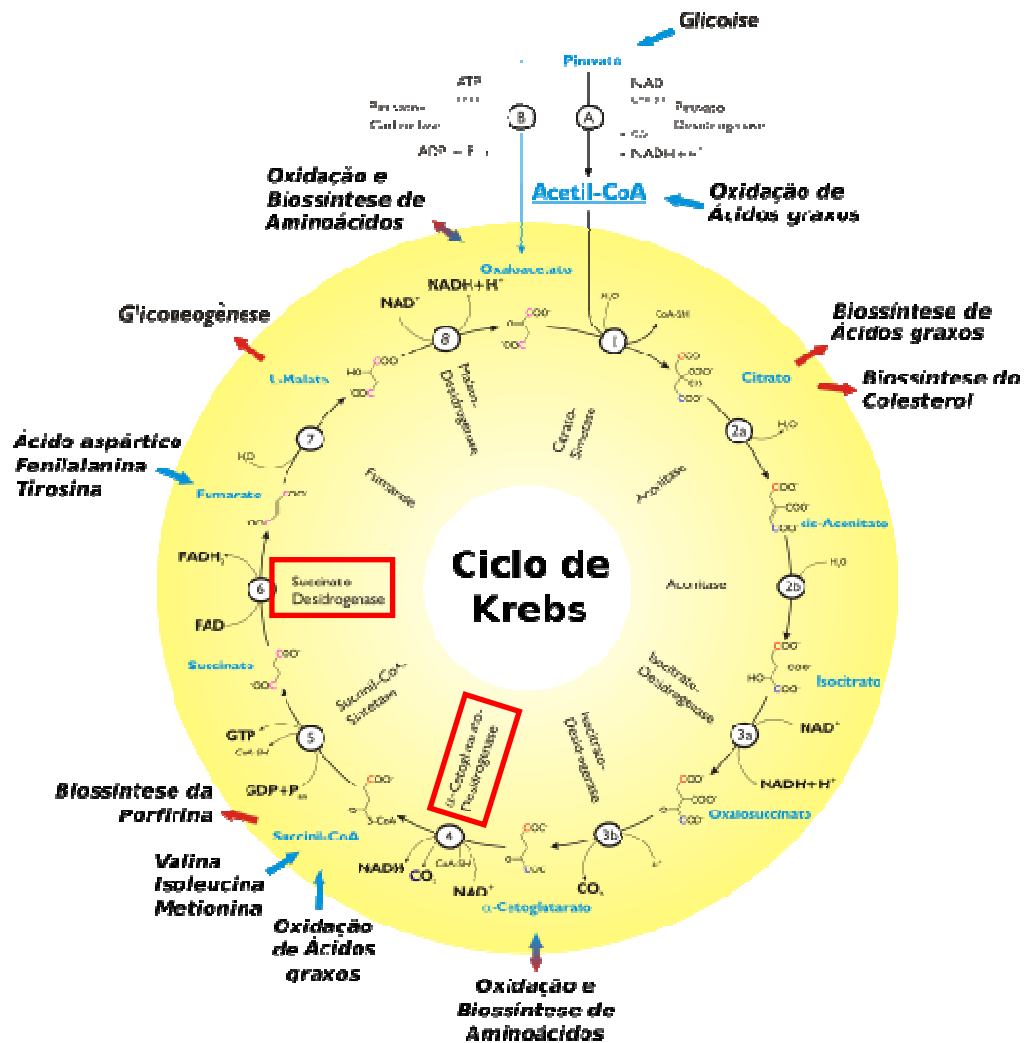


Figura 2 – Participação das enzimas cetoglutarato desidrogenase e succinato desidrogenase no Ciclo de Krebs

Józefiak et al. (2007) conduziram um experimento com 400 frangos de corte para avaliar a eficiência de diferentes níveis de suplementação de ácido benzóico na dieta. Segundo os autores a suplementação com 2,5g/kg de ácido benzóico na dieta não melhorou os resultados de desempenho em relação às aves não suplementadas. Já Józefiak et al. (2010) afirmam que em seu experimento a suplementação das dietas de frango com 0,1g/kg de ácido benzóico aumentou a quantidade de matéria seca da digesta, reduziu o pH e o número de bactérias ácido lácticas no ceco e reduziu a população de coliformes no íleo. No mesmo estudo, a adição na dosagem de 0,2g/kg deprimiu o crescimento das aves, o que, segundo aos autores, pode ocorrer por este ácido

se conjugar com a ornitina para ser excretado, sendo que elevadas doses de suplementação podem resultar em deficiência de arginina, que é fonte de ornitina nas aves.

1.3 Óleos essenciais

O uso dos óleos essenciais é conhecido desde a Antiguidade. Os árabes na Idade Média utilizavam os óleos no embalsamamento de corpos, para a conservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, antiinflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais (BAKKALI et al., 2008). O uso de plantas e óleos aromáticos na terapêutica pelos chineses é muito antigo, tendo relatos em obras de 2700 a.C. O livro de medicina interna do antigo Imperador Amarelo da China fala sobre o uso de plantas aromáticas, muitas destas empregadas também em cerimônias religiosas (DE LA CRUZ, 2011)

Segundo Menten (2002), os aditivos fitogênicos, extratos herbais ou extratos vegetais podem vir a substituir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento. Eles contêm misturas de substâncias, algumas das quais, princípios ativos com efeito de promotor de crescimento em aves e outros animais. Os óleos essenciais são extraídos por destilação a vapor de diferentes partes das plantas, como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes. Muitos produtos são produzidos comercialmente com propriedades terapêuticas e aromatizantes.

Diferentes propriedades e atividades dos óleos essenciais têm sido reportadas na literatura (BRENES; ROURA, 2010; ERTAS et al., 2005; HERNÁNDEZ et al., 2004; TOLEDO et al., 2007; WILLIAM; LOSA, 2001). Os óleos essenciais, também chamados óleos voláteis ou óleos etéreos, são uma mistura complexa de metabólitos secundários das plantas, como os terpenóides, fenilpropenos de baixa ebulição, alcoóis, aldeídos, ésteres cíclicos, etc. Vários dos componentes possuem um amplo espectro de propriedades antimicrobianas, encontrando-se inibição de crescimento de leveduras, fungos e bactérias. Eles têm atividades biológicas como antioxidantes, hipocolesterolêmicos, estimulam o sistema digestivo, aumentam a produção de enzimas digestivas e melhoram as funções do fígado. Também estimulam a circulação sanguínea, reduzem os níveis de bactérias patogênicas e melhoram o estado imunitário das aves.

Applegate et al. (2010) definem os óleos essenciais como substâncias odoríferas contendo a maior parte dos princípios ativos das plantas como hidrocarbonos (terpenos, sesquiterpenos), compostos oxigenados como alcoóis, aldeídos e cetonas, e uma pequena porcentagem de

resíduos não voláteis (como a parafina). De acordo com esses autores, os modos de ação destes óleos, para melhorar o desempenho das aves e substituir os promotores de crescimento, são:

- **Efeito antimicrobiano:** diferentes óleos essenciais têm demonstrado efeito contra bactérias, coccídios e fungos. Apresentam caráter lipofílico e capacidade de penetrar ou desintegrar a membrana celular de bactérias. Segundo os autores, os estudos conduzidos in vivo com óleos essenciais em frangos de corte demonstram que não há uma erradicação total de eimerias com o uso destes aditivos, e sim, uma redução na severidade das lesões. Assim, os efeitos in vivo não devem ser atribuídos a uma ação anticoccidiana direta e sim na atenuação dos mecanismos de resposta intestinal aos coccídios.
- **Estimulação de enzimas digestivas:** os óleos essenciais são capazes de estimular a produção de enzimas digestivas como lipase, amilase ou carboidrases, o que beneficia a utilização dos nutrientes. Segundo os autores, o mecanismo de ação que leva a esta estimulação ainda não está esclarecido.
- **Alterações na morfologia gastrointestinal:** mudanças nas características morfológicas, como altura das vilosidades, profundidade das criptas ou número de células caliciformes, foram obtidos em diversos estudos com aves alimentadas com aditivos fitogênicos.
- **Digestibilidade:** os aditivos fitogênicos tem impacto positivo na digestibilidade devido à redução na competição por nutrientes entre as aves e sua flora, por estimular a ação enzimática e provocar modificações na morfologia gastrointestinal. Este impacto é variável, dependendo da composição e dosagem dos aditivos fitogênicos utilizados.

Estudos prévios confirmam que o produto CRINA[®] Poultry² (uma mistura de componentes de óleos essenciais) e outros óleos essenciais exibem atividade antimicrobiana contra bactérias intestinais como *Clostridium perfringens* (MITSCH et al., 2004), *Salmonella typhimurium* e *E. coli* (HAMMER et al., 1999; HELANDER et al., 1998). Tem sido relatado que esta atividade é mediada por propriedades lipofílicas destes óleos que os capacitam a perfurar a membrana bacteriana, liberando componentes celulares para o meio externo (HELANDER et al., 1998), pela capacidade de estabilização da flora intestinal e pela inativação de toxinas liberadas pelo *C. perfringens* (MITSCH et al., 2004).

² DSM Nutritional Products Ltd., P.O. Box 3255 CH-4002 Basel, Switzerland

Alguns óleos essenciais também apresentam boa atividade fúngica, sendo que o estudo conduzido por Tampieri et al. (2005) confirmou boa atividade contra *Candida albicans*. Também Rao et al. (2010) afirmam que os terpenóides fenólicos constituintes dos óleos essenciais exibem uma potente ação antifúngica contra vários patógenos, entre eles *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Relatam também que os óleos essenciais são capazes de romper a homeostase de íons nos microorganismos fúngicos, por suas propriedades hidrofóbicas e lipofílicas. A adição de terpenóides fenólicos causa um rápido aumento seguido de decréscimo da concentração de íons Ca^{2+} citosólico e dessensibilização dos canais destes íons. Além disso, aumentam o pH vacuolar pela perda de prótons do lúmen vacuolar, levando à acidificação em nível citosólico, o que causa perda da viabilidade celular.

Alguns óleos essenciais também apresentam a propriedade de agentes naturais com potencial redox, agindo como agentes quimiosensibilizantes na presença de antifúngicos como o itraconazol e anfotericina B. Estes compostos têm como alvo o sistema antioxidante dos fungos e leveduras, desestabilizando a homeostase redox dos mesmos, agindo de forma sinérgica aos antifúngicos tradicionais. Além disso, alguns destes aditivos fitogênicos atuam inibindo o complexo III da cadeia respiratória fúngica. Estes dois mecanismos inviabilizam o crescimento e sobrevivência fúngica, através do stress oxidativo (rápida produção de espécies reativas de oxigênio) (KIM et al. 2012).

Resultados positivos no desempenho de frangos de corte foram encontrados por Buchanam et al. (2008) que utilizaram aditivos fitogênicos em dois tipos de dietas (dieta de alto desempenho e dieta de baixo custo). Eles não encontraram diferenças significativas nos ganho de peso e mortalidade das aves, mas detectaram que a dieta formulada para desempenho máximo quando suplementada com um dos aditivos fitogênicos melhorou a conversão alimentar em relação à mesma dieta sem o aditivo.

Já os experimentos com frangos de corte conduzidos por Lee et al. (2003), Jang et al (2007) e Barreto et al. (2008), onde foram testados os efeitos da inclusão de diferentes aditivos fitogênicos, incluindo o CRINA® Poultry, não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos nas respostas de desempenho das aves, incluindo-se nestes o consumo alimentar, ganho de peso, peso corporal e conversão alimentar.

Também Hernández et al. (2004) testaram a influência de dois aditivos fitogênicos no desempenho, digestibilidade e peso de órgãos em frangos e não encontraram diferenças na conversão alimentar, peso corporal e peso de intestinos entre os tratamentos. Porém, houve uma redução na mortalidade das aves suplementadas com óleos essenciais em relação às aves do grupo controle negativo e positivo (com APC).

Quanto à associação de óleos essenciais e ácidos orgânicos, foi relatado que o uso do CRINA[®] Poultry associado com ácido láctico em dietas de frangos de corte, melhorou o peso corporal final e conversão alimentar em relação às aves que recebem o promotor de crescimento convencional (APC) (JANG et al., 2004). Vieira et al. (2008), testando a suplementação de frangos de corte com aditivos fitogênicos, uma mistura de ácidos orgânicos e a associação destes aditivos (fitogênicos + ácidos orgânicos), concluíram que os aditivos fitogênicos ou os ácidos orgânicos aumentaram o peso corporal aos 21 dias, e que a conversão alimentar do período total (1-42 dias) foi melhorada pelo uso dos aditivos fitogênicos, individualmente, e pela sua associação com ácidos orgânicos em relação ao grupo controle (sem aditivos).

Em relação ao impacto do uso de óleos essenciais nas lesões causadas por eimerias, Oviedo-Rondón et al. (2006a) concluíram que o uso de produtos como CRINA[®] Poultry e CRINA[®] Alternate³ em dietas de frangos de corte reduziram as lesões de eimerias no duodeno e ceco de aves vacinadas ou não contra coccidiose, mas não encontraram diferenças significativas em lesões localizadas no íleo e jejuno. Giannenas et al. (2003) relatam que os escores de lesões de *Eimeria tenella* em aves experimentalmente infectadas e suplementadas com óleos essenciais foram menores que no grupo controle infectado, apesar de serem maiores que os escores do grupo alimentado com lasalocida.

O oposto é mencionado por Oviedo-Rondón et al. (2005) que estudaram a resposta de frangos vacinados contra coccidiose à suplementação com óleos essenciais (CRINA[®] Poultry[®] and CRINA[®] Alternate) e encontraram que os escores de lesões por eimerias não foram afetados pelos tratamentos aos 37 dias de idade dos frangos.

O estresse das aves e a infecção por coccidiose resultam em drásticas mudanças na microbiota intestinal. O uso de óleos essenciais modula a microbiota em caso de desafio por coccidiose e reduz as mudanças na ecologia microbiana, causadas pela infecção, independente dos frangos serem vacinados ou não (OVIEDO-RONDÓN et al., 2006b).

Em relação à viabilidade econômica, Scheuermann et al. (2009) verificaram que a utilização de um aditivo fitogênico comercial possibilitou a redução do custo da ração necessária para produzir um frango ou uma tonelada de peso vivo. Essa vantagem econômica foi constatada quando o aditivo fitogênico foi usado em rações com níveis reduzidos de energia e nutrientes (Ca, P e aminoácidos), calculada com base nos dados de desempenho e preço comercial dos ingredientes da ração.

³ DSM Nutritional Products Ltd., P.O. Box 3255 CH-4002 Basel, Switzerland

1.3.1 Os princípios ativos eugenol, timol e piperina

Eugenol

O eugenol, um metoxifenol com uma cadeia curta de hidrocarbono, é encontrado em folhas de louro e óleos extraídos dos cravos e canela (ITO et al., 2005). O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) é utilizado como flavorizante, aromatizante e conservante natural de alimentos e demonstra a capacidade de inibir fungos e bactérias. Foram identificados 23 constituintes no óleo essencial obtido desta planta, sendo o eugenol a substância que apresentou maior percentual (60%) (ZAGO et al., 2009).

Zago et al. (2009) relatam que o cravo (*Syzygium aromaticum*), pertencente à família Myrtaceae, tem como principal constituinte o eugenol, sendo esta substância de reconhecida atividade antibacteriana e antifúngica, e também a mais ativa quando testada frente a linhagens de *E. coli*.

Outra propriedade do eugenol é o seu efeito antioxidante. Segundo Morais et al. (2009), antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes. Ito et al. (2005) relatam que a oxidação dependente de cobre das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são potencialmente inibidas pelo eugenol. Esta inibição da oxidação está intimamente ligada com as atividades de redução do cobre (formando complexos incapazes de reagir com o oxigênio) e eliminação de um radical estável, 1,10-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Em nível microsomal, o eugenol inibe a peroxidação lipídica através da inibição da formação de ácido barbitúrico reativo, produção esta que seria induzida por metais e pelo ácido ascórbico e que provoca a peroxidação.

Morais et al. (2009) conduziram um trabalho com o objetivo avaliar a ação antioxidante de uma variedade de chás e condimentos consumidos no Brasil, entre eles os de *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia aromatica* Baill e *Laurus nobilis*, cujo principal princípio ativo antioxidante é o eugenol. O método utilizado para avaliar a ação antioxidante foi o da atividade seqüestradora de radicais livres DPPH em solução metanólica. Todas as amostras analisadas demonstraram atividade antioxidante em suas diferentes concentrações, sendo que os condimentos mais ativos foram o chá verde (*Camelia sinensis* não-fermentada), a canela (*Cinnamomum zeylanicum*), o cravo (*Eugenia aromática* Baill, outra espécie de cravo, também da família Myrtaceae) e o louro *Laurus nobilis*.

De acordo com Buchbauer (2010) o extrato de folhas de *Laurus nobilis* (com alto teor de eugenol) demonstra alto poder antioxidante. Em um ensaio de DPPH o óleo essencial de *Laurus nobilis* exibiu uma atividade antioxidante de quase 90% a uma concentração de 20 g / L.

Em relação à atividade antimicrobiana do eugenol, Pauli (2001) afirma que os princípios ativos dos óleos essenciais com maior atividade antimicrobiana in vitro são o aldeído cinâmico (óleo de canela e de casca de cássia) e os compostos fenólicos eugenol (óleo da folha do cravo e da canela) e timol (óleo de tomilho). Estes óleos essenciais apresentam um amplo espectro de ação antimicrobiana em ensaios in vitro, devido à sua solubilidade em água e volatilidade.

O eugenol também pode ser uma boa alternativa de redução dos impactos ambientais associados à produção animal. Quando adicionado ao esterco animal, o eugenol reduz a produção de ácidos graxos voláteis (responsáveis pelo odor emitido a partir de resíduos animais) em 70 e 50% em dejetos bovinos e suínos respectivamente, armazenados em condições anaeróbicas. Além disso, suprime a atividade microbiana (coliformes fecais) e estimula o acúmulo de lactato, que por sua vez baixa o pH do esterco e conserva o nitrogênio amoniacal no resíduo (VAREL; MILLER, 2004).

Timol

O timol é um composto fenólico com propriedades antimicrobianas encontrado nos óleos de diferentes plantas, entre elas o tomilho (*Thymus vulgaris*) e outras espécies do gênero *Thymus*, as espécies dos gêneros *Ocimum* (e.g. manjeriçã) e *Monarda* (e.g. bergamota silvestre e bálsamo de abelha).

Por suas propriedades antissépticas é o principal ingrediente em fórmulas comerciais de bochechos para higiene bucal. Isto pode explicar o uso de tomilho em fitoterapia para tratar a cavidade bucal e infecções de garganta. É também muito utilizado como aditivo de uma série de alimentos e bebidas (JÄGER, 2010).

Geralmente é mais eficaz contra bactérias gram-positivas (e.g., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), porque, ao contrário de bactérias gram-negativas, estas não possuem a membrana externa. Apesar disso, em bactérias gram-negativas, tais como *Salmonella* e *E. coli*, os óleos essenciais são eficazes em penetrar a membrana externa, o que é essencial para sua atividade antimicrobiana (HOFFMAN-PENNESI; WU, 2010).

Um ensaio in vitro foi conduzido medindo a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Coridothymus capitatus*, *Satureja montana*, *Thymus mastichina*, *Thymus zygis* e *Origanum*

vulgare contra cepas aviárias de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella essen*, e cepas suínas de *Escherichia coli* (ETEC), *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella typhimurium*. O óleo de orégano (*Origanum vulgare*) mostrou o maior efeito antimicrobiano contra as quatro cepas de *Salmonella*, seguido do óleo de *Thymus zygis*. O óleo de *Thymus mastichina* foi capaz de inibir todos os microrganismos na concentração mais elevada (4%). Segundo os autores, os resultados confirmam o potencial de aplicação destes óleos no tratamento e prevenção de patologias intestinais de aves e suínos (PEÑALVER et al., 2005).

Hitokoto et al. (1980) testaram diferentes óleos essenciais para observar a inibição de três espécies toxigênicas de *Aspergillus*, sendo que o eugenol e o timol causaram inibição completa no desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e *A. versicolor*. Farag et al. (1989) obtiveram a seguinte seqüência decrescente de atividade antifúngica de óleos essenciais em *Aspergillus parasiticus* e inibição de produção de suas aflatoxinas: tomilho, cominho, cravo, alcaravia, alecrim e sálvia.

A ação antibacteriana de diferentes óleos essenciais, incluindo o timol, foi testada contra 25 diferentes gêneros de bactérias por Dorman e Deans (2000). Todos os óleos apresentaram uma considerável inibição contra os organismos testados, sendo que o óleo oriundo do *Thymus vulgaris* apresentou a maior atividade antibacteriana.

Assim como o carvacrol, o timol protege as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da oxidação, sendo esta atividade antioxidante dependente da concentração deste princípio ativo: concentrações entre 2,5 e 5,0 mM demonstram uma boa atividade antioxidante (PEARSON et al., 1997). Hoffman-Pennesi e Wu (2010) relatam que a elevada capacidade antioxidante do óleo de tomilho e seus respectivos componentes fazem dele uma alternativa benéfica e natural para uso como aditivo para a nutrição animal. Estes compostos são reconhecidos como seguros como aditivos alimentares pela *Food and Drug Administration* e pela *Flavor and Extract Manufacturers' Association*.

Hoffman-Pennesi e Wu (2010) afirmam que o timol, quando suplementado na dieta de frangos de corte não afeta o desempenho das aves em relação ao grupo controle, porém afeta o *status* antioxidante do soro sanguíneo, aumentando a abundância de antioxidantes hidrofílicos. Este aumento de antioxidante hidrofílicos no soro é importante na melhoria do *status* imunitário das aves: um alto nível de antioxidantes reduz a quantidade de radicais livres, o que diminui o risco de estresse oxidativo e suas patologias associadas.

Em relação ao desempenho de frangos de corte suplementados com timol, o estudo de Cross et al. (2007), testando o efeito da suplementação de dietas com 5 aditivos fitogênicos (tomilho, orégano, manjerona, alecrim e milefólio), demonstrou que a suplementação da dieta

com o óleo de tomilho (1g/kg) aumentou a massa corporal, ganho médio de peso, o consumo e conversão alimentar das aves em relação aos demais tratamentos com óleos essenciais e ao grupo controle negativo.

Piperina

A piperina é o alcalóide presente na pimenta preta ou pimenta do reino, e é responsável pela característica de pungência deste tempero. Além da alimentação humana, a pimenta preta é utilizada com uma variedade de outros propósitos como medicinais, preservantes e perfumaria.

Quando utilizada na alimentação, a piperina traz uma série de benefícios, tendo ações antiinflamatórias (modifica as respostas inflamatórias agudas e crônicas), antioxidante, estimulante da produção de enzimas digestivas e da digestibilidade, redutora do tempo de trânsito intestinal e protetora contra aflatoxinas (SRINIVASAN, 2007).

Estudos utilizando ratos foram conduzidos por Platel e Srinivasan (1996, 2000) para analisar a influência da piperina nas enzimas digestivas pancreáticas e da mucosa do intestino delgado. Segundo os autores, a ingestão de piperina aumenta a atividade da lipase e amilase pancreática e da tripsina.

Segundo Srinivasan (2007) por seu princípio de pungência, a piperina aumenta a secreção salivar e gástrica e a atividade da amilase salivar em humanos. Além disso, o efeito estimulante na digestão provavelmente também é promovido por uma benéfica estimulação no fígado para produzir e secretar suco biliar rico em ácidos, que desempenha um importante papel na digestão e absorção de gorduras.

Foi relatado que a piperina pode interagir com o ambiente lipídico e levar ao aumento da permeabilidade das células intestinais. Baseada em estudos com ratos, a hipótese levantada é que ela aumenta a absorção dos nutrientes, devido à alteração na dinâmica da membrana lipídica e na conformação das enzimas do intestino. Além disso, é capaz de induzir a síntese de proteínas associadas ao citoesqueleto, resultando num aumento na superfície de absorção do intestino, elevando a eficiência da permeabilidade através da barreira epitelial (KHAJURIA ET AL., 2002).

De acordo com Srinivasan (2007) os óleos essenciais contendo piperina reduzem significativamente o tempo de trânsito do alimento em ratos. Essa redução está relacionada com a influência benéfica deste princípio nas enzimas digestivas e secreção biliar citadas anteriormente.

In vitro, este princípio ativo tem demonstrado características de proteção contra danos oxidativos, através da inibição de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica além de influenciar benéficamente as moléculas e enzimas antioxidantes em diferentes situações de stress oxidativo (MITTAL; GUPTA, 2000). Segundo Srinivasan (2007), a suplementação oral de ratos com piperina reduz o grau de peroxidação lipídica mitocondrial e concomitantemente aumenta a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido, dismutase, catalase, e glutathione peroxidase) e antioxidantes não enzimáticos (glutathione reduzida, vitamina E, e vitamina C).

O estudo conduzido por Cardoso et al. (2008) com frangos de corte, inoculados aos 7 dias de idade com aflatoxina, demonstrou que a suplementação com piperina na dosagem de 2,25mg/kg foi capaz de reduzir as lesões histopatológica causadas pela intoxicação, e revelou efeitos positivos sobre as características hematológicas dos frangos intoxicados por aflatoxinas.

1.4 Estudos anteriores com a combinação de ácido benzóico e óleos essenciais (CRINA[®] Poultry Plus)

De acordo com os estudos apresentados por Sanz et al. (2009) através de uma combinação de compostos de óleos essenciais com ácido benzóico pode-se diminuir significativamente a proliferação de bactérias gram-positivas, como o *Clostridium perfringens* e bactérias gram-negativas, tais como *E. coli*, *Salmonella sp.* e *Campylobacter*, não afetando a multiplicação de bactérias benéficas ao processo digestivo, como lactobacilos. Com uma dosagem de 300 ppm do produto CRINA[®] Poultry Plus (CPP) na alimentação dos frangos, aplicada desde o primeiro dia de vida até o abate, alcançou-se um aumento de 44g no peso médio final e melhora de 1% na taxa de conversão dos lotes de frango.

Quanto à modulação microbiana pelo produto CPP, dois experimentos consecutivos foram realizados por Oviedo-Rondón et al. (2010) com frangos de corte (alimentados com ração à base de milho e farelo de soja) para determinar os efeitos de diferentes aditivos (antibióticos, probióticos, CRINA[®] Poultry Plus e CRINA[®] Poultry AF⁴) na população microbiana ileal e cecal, pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). O tratamento com antibiótico afetou a população microbiana no íleo, mas não no ceco. As mudanças mais pronunciadas na

⁴ DSM Nutritional Products Ltd., P.O. Box 3255 CH-4002 Basel, Switzerland

microbiota ileal e cecal foram observadas nos frangos de 43 dias suplementados com probióticos e com as formulações contendo óleos essenciais.

No estudo conduzido por Hume et al. (2011) frangos suplementados com antibióticos, probióticos, CRINA[®] Poutry Plus e CRINA[®] Poultry AF foram infectados com *Eimeria spp.* para determinar os efeitos destes aditivos no desempenho das aves e na comunidade microbiana ileal e cecal. Para esta avaliação utilizaram pirosequenciamento (para sequenciar as bactérias cecais) e DGGE. Os autores também encontraram que os probióticos e as formulações com óleos essenciais modificaram de forma significativa a microflora ileal e cecal. Ao final do período experimental as aves não infectadas e não medicadas obtiveram o maior ganho de peso entre os tratamentos, sendo que as aves infectadas que receberam os aditivos apresentaram ganho de peso superior às infectadas não suplementadas.

Juin e Weber (2010), analisando a eficácia da suplementação com CPP, em dietas de frangos à base de trigo, em diferentes inclusões (0, 200, 300 e 400 ppm), não encontraram diferenças entre tratamentos na conversão alimentar, contagem de microorganismos cecais e rendimento de carcaça. A suplementação com 300 ppm de CPP aumentou o peso corporal de fêmeas e machos, em relação ao grupo controle, no período inicial (1-23 dias), porém, somente os machos mantiveram essa superioridade ao final do período experimental (43 dias).

Uma meta análise foi realizado com base nos dados de quatro experimentos de frangos de corte suplementados com 300 ppm de CPP em comparação a frangos não suplementados. A suplementação com CPP aumentou significativamente o peso corporal aos 21 e 42 dias. As aves do tratamento CPP expressaram maior ganho de peso diário e melhor conversão alimentar durante todo o período experimental e a mortalidade não foi afetada pelos tratamentos. O trabalho sugere que há um efeito aditivo entre o ácido benzóico e os óleos essenciais e, que as enzimas digestivas têm maior eficiência no ambiente ácido proporcionado pelo produto (WEBER et al., 2012).

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

- A suplementação de dietas de frango de corte com a combinação de ácido benzóico e óleos essenciais (CRINA[®] Poutry Plus) melhora o desempenho das aves no período de 1 a 42 dias de idade.
- A combinação de ácido benzóico e óleos essenciais (CRINA[®] Poutry Plus) serve como substituto do antibiótico promotor de crescimento, em dietas de frangos de corte.

2.2 Objetivos

2.2.1 Geral

O estudo teve por objetivo avaliar a eficiência da combinação de ácido benzóico e óleos essenciais como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento na produção de frangos de corte de 1-42 dias de idade.

2.2.2 Específicos

- Verificar a eficiência da combinação de ácido benzóico e óleos essenciais na melhoria do desempenho zootécnico de frangos de corte;
- Comparar a eficiência da combinação de ácido benzóico e óleos essenciais com o promotor tradicional (antibiótico) e também da associação desta combinação com o promotor tradicional em suas atividades como melhoradores de desempenho;

- Verificar a influência dos diferentes tratamentos na umidade de cama, escores de lesões de pata e peito, no comprimento intestinal e na resposta das aves aos desafios de campo por coccidiose.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de testar a eficiência da combinação de ácido benzóico e óleos essenciais como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento na produção de frangos de corte foi conduzido um experimento no Laboratório de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Foram utilizados 1550 pintos de 1 dia de idade, machos, da linhagem Cobb, provenientes do incubatório do referido laboratório. Algumas considerações complementares a respeito da metodologia serão aqui descritas, as demais e os resultados obtidos estão descritos no Capítulo 2 desta dissertação.

Para que fosse possível avaliar a eficácia de um promotor de crescimento alternativo, e compará-lo, em sua eficiência, com o promotor tradicional (antibiótico), fez-se necessário submeter às aves a desafios sanitários. Para isso, algumas práticas foram adotadas:

Desafio por coccidiose via vacinação

Aos 14 dias de idade do lote, foi administrada, via água, vacina⁵ viva atenuada, na dosagem recomendada pelo fabricante para 1550 aves. O objetivo foi desafiar as aves para coccidiose, pela ingestão de oocistos de linhagem atenuada de *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. necatrix*.

Uso de cama reutilizada

As aves foram alojadas em cama reutilizada (Figura 3), de maravalha, provinda de um lote de matrizes em produção no Laboratório de Avicultura da UFSM. Estas matrizes foram recriadas comercialmente, previamente vacinadas contra coccidiose. Esta prática de tentativa de desafio é semelhante às utilizadas por Vieira et al. (2008) e por Viola e Vieira (2007).

⁵ Livacox® Q - BIOPHARM. Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, 254 49 Jílové near Prague – República Tcheca. Resp. técnica: Dr. Petr Bedrník



Figura 3 – Visão da cama aviária (reutilizada) no alojamento dos pintinhos

Administração de caldo de cama

No 16º dia de experimento, foi acrescido à água de bebida das aves um preparado contendo 15 kg de cama reutilizada (provinda de um lote de matrizes em produção) dissolvidos em água (Figura 4). As aves consumiram esta mistura por um período de 48 horas ininterruptas.

Más condições de manejo e higienização

A higienização dos bebedouros aconteceu com menor frequência da que é utilizada como padrão no Laboratório de Avicultura da UFSM (frequência diária), prática que se assemelha a utilizada por Godoi et al. (2008). A frequência de revolvimentos da cama aviária também foi reduzida, e só era realizada quando extremamente necessária.



Figura 4 – Cama aviária reutilizada diluída em água e misturada na caixa d'água

Além disso, foi estabelecida uma rotina diária de registro das temperaturas ambiente (mínima e máxima), em quatro horários distintos: 8, 11, 14 e 17h. Pode ser ressaltado que ocorreram grandes variações de temperatura como se observa na Tabela 1.

Alta proteína na dieta

Os níveis de proteína bruta permaneceram praticamente constantes em todas as fases do período experimental, com o propósito de aumentar o desafio sanitário para bactérias gram positivas, como demonstrado no estudo de Drew et al. (2004).

Tabela 1 – Temperaturas (°C) registradas no interior do aviário no período experimental

DATA	Temperaturas °C					
	8h		11h	14h	17h	
	Máx.	Min.	Atual	Atual	Atual	
28/07/11	21	16	17	18	20	19
29/07/11	23	14	14	15	16	15
30/07/11	24	10	12	15	16	15
31/07/11	25	10	12	13	14	13
01/08/11	25	10	14	15	15	15
02/08/11	20	11	11	10	10	10
03/08/11	25	9	10	16	15	14
04/08/11	17	9	10	14	17	17
05/08/11	17	6	8	14	20	20
06/08/11	22	12	13	14	22	24
07/08/11	24	12	13	20	23	24
08/08/11	24	14	21	25	25	25
09/08/11	25	21	21	22	22	22
10/08/11	33	17	18	22	25	25
11/08/11	25	19	20	25	30	29
12/08/11	30	21	21	31	31	30
13/08/11	31	11	27	28	29	25
14/08/11	31	15	15	16	17	17
15/08/11	18	14	17	21	24	27
16/08/11	29	17	29	30	31	30
17/08/11	32	18	19	21	24	24
18/08/11	25	17	20	21	20	20
19/08/11	23	19	22	17	17	15
20/08/11	23	10	10	12	17	16
21/08/11	23	6	11	12	16	15
22/08/11	17	7	9	13	14	14
23/08/11	15	8	13	15	18	18
24/08/11	19	13	17	21	23	24
25/08/11	26	17	21	24	24	24
26/08/11	24	14	16	21	25	22
27/08/11	23	16	16	21	23	25
28/08/11	30	19	26	24	22	22
29/08/11	27	17	17	28	18	19
30/08/11	31	16	21	21	21	20
31/08/11	23	15	21	19	20	20
01/09/11	23	8	15	17	20	20
02/09/11	20	10	13	22	20	26
03/09/11	21	13	14	18	29	30
04/09/11	31	20	28	29	32	30
05/09/11	33	20	20	20	21	20
06/09/11	25	8	11	17	27	21
07/09/11	28	14	21	23	25	24

CAPÍTULO 2

CRINA® POULTRY PLUS IN BROILER DIETS

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

CRINA® POULTRY PLUS IN BROILER DIETS**A blend of benzoic acid and essential oil compounds as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler diets¹**

P. C. Aristimunha*, A. P. Rosa*, L. S. Boemo*, D. C. Garcez†, D. P. Rosa*, V. Manfio*,

* Poultry Science Laboratory, Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, Brazil; and † DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil/

Corresponding author:

Alexandre Pires Rosa
Laboratório de Avicultura, Prédio 81
Avenida Roraima nº 1000, Campus Universitário
Camobi, Santa Maria, RS, Brasil.
CEP: 97105-900
Telephone: 55 55 3220 8269
Fax: 55 55 3221 4175
e-mail: alexandreprosa@gmail.com

Scientific Section
Metabolism and Nutrition

¹ Previous publications:

Boemo, L.S., Rosa, A.P., Aristimunha, P. C., Scher, A., Garcez, D., Rosa, D.P., Santos, C.B., Manfio, V., 2012. Crina Poultry Plus as an alternative feed additive to antibiotic growth promoters in broiler diets. In: 2012 International Poultry Scientific Forum. Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia. January 23-24.

Aristimunha, P. C., Boemo, L.S., Rosa, A.P., Garcez, D., Hermes, R.G., Santos, M. P., 2012. Effects of a combination of benzoic acid and essential oil compounds on broilers performance and health. In: XXIV Worlds Poultry Congress 2012, Salvador - Bahia. World's Poultry Science Journal 68.(Suppl. 1). Expanded Abstract (RE_NF_2012pc600_1).

1 **ABSTRACT.** An experiment was conducted to evaluate the addition of CRINA®
2 Poultry Plus (CPP), a compound with benzoic acid and essential oil compounds, to
3 broiler diets and its action as an alternative to antibiotic growth promoters. One
4 thousand five hundred fifty one-day old Cobb 500 males were used and randomly
5 assigned to 5 treatments with 10 replicate pens of 31 birds each. The diets were: NC-
6 negative control, without growth promoters; PC- positive control, with 10 ppm of
7 Avilamycin (AVI); CPPD- with 300 ppm of CPP from 1-42 days; AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d)-
8 with 10 ppm AVI from 1-21 days and 300 ppm of CPP from 22-42 days and AVI+CPP
9 (1-42 days) with 10 ppm AVI and 300 ppm of CPP from 1-42 days. All diets had the
10 same nutrient levels. The data were submitted to ANOVA and Tukey's test. The CPPD
11 diet increased ($P=0.0001$) body weight gain (2518.7g) in the 1-42 days period compared
12 to birds fed the NC diet (2383.9g) and PC diet (2439.6g). In relation to NC, all other
13 groups showed better feed conversion rates ($P=0.0001$) on the 1-42 days period and
14 better European productive efficiency index ($P=0.0003$). The NC group showed lower
15 result in gut length ($P=0.0223$) than PC and AVI + CPP (1-42 days). The lesion scores
16 by *E. acervulina* was highest in the NC ($P=0.0050$) group and other groups did not
17 show significant differences. No significant differences were found in relation to the
18 development of *E. maxima* and *E. tenella*. The results suggest that CRINA® Poultry
19 Plus can be used as an alternative product to antibiotic growth promoters in broiler diets
20 without losses in productive performance.

21

22 **Key words:** alternative growth promoters, poultry, organic acid, animal performance,
23 plant extracts.

24

INTRODUCTION

25

26 According to the World Health Organization (2000) an antimicrobial growth
27 promoter is an antimicrobial agent used for the purpose of increasing daily weight gain
28 or feed efficiency (feed-weight gain ratio) of food-producing animals. Castanon (2007)
29 reported that the growth promoter effect of antibiotics was discovered in the 1940s,
30 when it was observed that animals fed with mycelia of *Streptomyces aureofaciens*
31 containing chlortetracycline residues improved their growth. The mechanism of action
32 of antibiotics as growth promoters is related to interactions with the intestinal microbial
33 population.

34

35 However, the use of antimicrobials as growth promoters in animal nutrition has
36 been questioned in relation to the development of resistant bacteria. One of the first
37 reports of resistance in food of animal origin was reported by Elliott and Barnes (1959),
38 who observed tetracycline resistance in broilers fed with antibiotics. Other researchers,
39 such as Collignon (1999) reported the resistance of *Enterococcus spp.* associated with
40 the use of avoparcin as growth promoter in production animals.

41

42 The growing concern over the transmission and the proliferation of resistant
43 bacteria via the food chain has led to a complete ban of the feed use of antibiotic growth
44 promoters (**AGP**) in livestock by the European Union since 2006 (Brenes and Roura,
45 2010).

46

47 This regulation has forced the countries that are interested to export animal
48 products to the European Union to search for alternatives to ensure maximum animals
49 growth without affecting the quality of the final product. In this context, phytogetic
50 feed additives are discussed to be possibly added to the set of non-antibiotic growth
51 promoters, such as organic acids which are already well established in swine nutrition.

49 Since the Middle Ages, phytogenic products like essential oils have been widely
50 used for bactericidal, virucidal, fungicidal, antiparasitical, insecticidal, medicinal and
51 cosmetic applications, especially nowadays in the pharmaceutical, sanitary, cosmetic,
52 agricultural and food industries. Also called volatile or ethereal oils, the essential oils
53 are aromatic oily liquids obtained from plant material (flowers, buds, seeds, leaves,
54 twigs, bark, herbs, wood, fruits, and roots) and are complex mixtures of secondary plant
55 metabolites consisting of low-boiling-phenylpropenes and terpenes (Brenes and Roura,
56 2010; Bakkali et al., 2008).

57 Regarding organic acids, Dibner and Buttin (2002) reported that organic
58 carboxylic acid, with the general structure R-COOH, are weak acids and are only partly
59 dissociated. They refer that organic acids play a major role in reducing microorganisms
60 such as *Escherichia coli*, *Campylobacter* and *Salmonella*. These authors also stated that
61 their administration in the diet result in a reduction of subclinical infections in birds,
62 contributing with the increased absorption of nutrients and emphasize the digestive and
63 immune systems potentialities.

64 The CRINA® Poultry Plus⁷ product is a blend of benzoic acid and essential oil
65 compounds (including thymol, eugenol and piperine). The objective of this study was to
66 evaluate the addition of CRINA® Poultry Plus in broiler diets and its action as an
67 alternative to antibiotic growth promoters.

68

69

MATERIAL AND METHODS

⁷ DSM Nutritional Products Ltd., P.O. Box 3255 CH-4002 Basel, Switzerland

70 This study was conducted at the Poultry Science Laboratory – LAVIC –
71 Department of Animal Science of the Federal University of Santa Maria and was carried
72 out in accordance with Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in
73 Agricultural Research and Teaching (Federation of Animal Science Societies, 2010).
74 One thousand five hundred fifty day-old male broiler chicks Cobb 500, from the
75 LAVIC hatchery were used. The birds were vaccinated against Marek's disease,
76 Infectious Bursal Disease and Avian Pox virus. The birds used in the study had a range
77 of $\pm 2.5\%$ from the average weight.

78 They were housed in a building with 50 pens with 2.25m², equipped with a bell
79 drinker, a tray-type feeder for pre-initial phase and a tubular semi-automatic feeder
80 (metal with plastic tray, 20kg capacity) for the other phases. The heating during the
81 initial phase was accomplished with a 150W lamp per box. In order to submit the birds
82 to a sanitary challenge, birds were housed on reused litter and were fed with high levels
83 of crude protein, following the reasoning of Drew et al. (2004).

84 The experiment was divided into three phases: Initial Phase (1 to 21 days),
85 Growth Phase (22 to 35 days) and Final Phase (36 to 42 days of age). The birds were
86 fed with mash diet (Table 1), the water and feed being provided *ad libitum*.

87

88 ***Experimental design***

89 The experimental design was completely randomized, with five treatments and
90 ten replicate pens with 31 birds in each unit. The experimental diets were: NC - a basal
91 diet without growth promoters; PC - a basal diet with 10 ppm of Avilamycin (**AVI**);
92 CPPD - a basal diet with 300 ppm of CRINA® Poultry Plus (**CPP**) from 1-42 days;
93 AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d) - a basal diet with 10 ppm of AVI from 1-21 days and 300 ppm of
94 CPP from 22-42 days; and AVI + CPP (1-42 days) - a basal diet with 10 ppm of AVI

95 and 300 ppm of CPP from 1-42 days. All diets had the same nutrient levels. These diets
96 had no addition of coccidiostats or any type of enzyme.

97 Body weight gain (**BWG**), feed intake adjusted by the number of birds average
98 (**FI**), feed conversion rate (**FCR**), mortality (**MO**), and the European productive
99 efficiency index (**EPEI**) were evaluated in this experiment. FI, BWG, FCR and MO
100 were evaluated in each phase (1-21, 22-35, 36-42 and 1-42 days) and the EPEI was
101 calculated as follows: $ADG_{(g)} * (100 - MO) / FCR * 10$.

102 At 21 days of age, three birds per replicate were euthanized (by cervical
103 dislocation, performed by a properly trained professional) to determine the presence of
104 coccidiosis and lesion scoring (*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* and *Eimeria*
105 *tenella*). The lesion scores were evaluated according to Johnson and Reid (1970). The
106 development of the broilers intestines was assessed by the gut length. At 21 and 42
107 days, a sample of poultry litter was collected per experimental unit to measure the
108 humidity content. The samples were dried in a laboratory oven at 40°C for 96 hours.
109 The incidence of breast and foot pad lesions was evaluated at 42 days of age. The lesion
110 scores of breasts were evaluated according to Angelo et al. (1997) and of foot pads
111 according to Martrenchar et al (2002).

112

113 *Statistical analysis*

114 Data were subject to analysis of variance using the GLM procedure of SAS
115 (SAS Institute, 2009). Tukey's comparison of means test was applied when significant
116 differences occurred at the 0.05 level of significance.

117

118

RESULTS AND DISCUSSION

119

120 Body weight gain (Table 2) was affected by the inclusion of CRINA® Poultry
121 Plus in broiler diets. In all phases, the CPPD diet showed better results than the NC
122 group. On the 1-42 days period, the NC group had worse ($P=0.0001$) BWG and CPPD
123 had better results than PC. Diet supplemented with CRINA® Poultry Plus and/or
124 Avilamycin improved FCR ($P=0.0001$) (Table 2) on the 1-42 days period and the EPEI
125 ($P=0.0003$) (Table 3) when compared with the NC diet. No statistical differences
126 between treatments were observed for feed intake (Table 2) in the most phases; the PC
127 group had better result ($P=0.0323$) than NC just on the 36-42 days period and was not
128 significantly different in relation to the other treatments.

129 Buchanan et al. (2008) obtained positive results in growth performance when
130 phytogenic feed additives were added to a maximum yield diet. FCR was improved in
131 relation to the same diet without the additives, but the BWG was not altered. This last
132 result is not in agreement with the present study. Other studies reported that
133 supplementation with CRINA® Poultry (a blend of essential oils) and other essential
134 oils did not influence the FCR, BW, BWG and FI results (Lee et al., 2003; Hernández et
135 al., 2004; Jang et al., 2007; Barreto et al., 2008.).

136 As to the association of essential oils and organic acids, it was reported that the
137 use of CRINA® Poultry and lactic acid together in broiler feeds improved the final
138 body weight and FCR when compared to birds fed diets with AGP (Jang et al., 2004).
139 Vieira et al. (2008) tested the use of a phytogenic feed additive and of a blend of organic
140 acids and their interactions. They found that phytogenic feed additive or organic acids
141 improved the body weight at 21 d, and that the cumulative FCR (1-42 days period) was
142 improved by phytogenic additive and by phytogenic additive plus organic acid.

143 Our results are similar to those found by Weber et al. (2012). These authors
144 carried out a meta-analysis with data from four experiments comparing the use of 300

145 ppm of CPP with non-supplemented controls. They found that CPP significantly
146 improved BW on 21d and on 42 d. The birds on the CPP treatment showed a higher
147 average daily gain in the starter phase and over the entire experimental period. FCR was
148 better with CPP supplementation than control birds. Mortality was not affected by the
149 dietary treatment. These authors suggest that there is an additive effect between organic
150 acids and essential oils due to the fact that digestive enzymes work more efficiently
151 under acidic conditions.

152 The increase in growth performance of broilers fed diets with CRINA® Poultry
153 Plus, found in this study, could be explained by the properties of organic acids and
154 essential oils. The essential oils properties have been reported by several authors
155 (William and Losa, 2001; Hernández et al., 2004; Ertas et al., 2005; Brenes and Roura,
156 2010). They have biological activities acting as antioxidants and as hypocholesterolemic
157 drugs; they stimulate the animal's digestive system, increase production of digestive
158 enzymes and improve utilization of digestive products by enhancing liver functions.
159 Also stimulate blood circulation, reduce the levels of pathogenic bacteria and may
160 enhance the immune status. Moreover, Weber et al. (2012) report that essential oils
161 containing piperine significantly reduce the gastrointestinal transit time of feed.

162 Previous studies confirmed that CRINA® Poultry and other essential oils display
163 antimicrobial activity against intestinal bacteria such as *Clostridium perfringens* (Mitsch
164 et al., 2004), *Salmonella typhimurium* and *E. coli* (Helander et al., 1998; Hammer et al.,
165 1999). It has been reported that this activity is mediated by the lipophilic property that
166 leads to perforation of the bacterial membrane, releasing membrane components from
167 the cells to the external environment (Helander et al., 1998), and by stabilization of the
168 intestinal microflora and inactivation of *C. perfringens* toxins (Mitsch et al., 2004).

169 Tampieri et al. (2005) studied the efficacy of essential oils against different pathogenic
170 mycetes and found that some essential oils are active against *Candida albicans*.

171 Organic acids also have strong antimicrobial activities, can influence mucosal
172 morphology, stimulate pancreatic secretions, serve as substrates in the intermediary
173 metabolism, and improve digestion, absorption and retention of numerous dietary
174 nutrients (Partanen and Mroz, 1999). Dibner and Buttin (2002) reported that after
175 organic acids ingestion, direct antimicrobial activity is highest in the foregut of poultry
176 (crop and gizzard), which has a very limited ability to change the digesta pH. They
177 improve protein and energy digestibility by reducing microbial competition with the
178 host for nutrients and the endogenous nitrogen losses.

179 It has been reported that organic acids interfere with cytoplasmic membrane
180 structure and membrane proteins, uncoupling the electron transport and thus reducing
181 ATP production, and disrupt the normal physiology by decreasing the internal pH. The
182 dissipation of proton-motive force and inability (and energy consumption) to maintain
183 internal pH by bacteria are followed by denaturation of acid-sensitive proteins and DNA
184 (Rike, 2003; Dahiya et al., 2006). According to Weber et al. (2012), blends of various
185 organic acids induced a shift in the intestinal microbiota toward more homogenous and
186 distinct populations and increased *Lactobacillus* colonization of the chick ileum.
187 Supplemented at 0.1% in broiler diets, benzoic acid particularly increased the dry matter
188 digesta in the ceca; decreased the lactic acid bacterias in the ceca and coliform bacteria
189 populations in the ileum (Józefiak et al., 2010). Kluge et al. (2006) reported that benzoic
190 acid has antimicrobial properties, mainly because of its inhibitory effect on several
191 microbial enzymes, in particular α -ketoglutaric acid dehydrogenase and succinic acid
192 dehydrogenase.

193 Weber et al. (2012) report that benzoic acid has been identified as an efficient
194 feed additive to improve growth performance, nutrient digestibility, and nitrogen
195 balance as well as to reduce gram-negative bacteria in the gastrointestinal tract of
196 piglets. Coliform bacteria, however, were decreased in the ceca of chicks, indicating
197 that the considerable antimicrobial activity of benzoic acid could beneficially influence
198 gut health in poultry as well.

199 In the present study the gut length of the NC group showed lower values
200 ($P=0.0223$) than PC and AVI + CPP (1-42 days) (Table 3). By itself, however,
201 CRINA® Poultry Plus did not influence the gut length in comparison to the control
202 group. There were no significant differences in mortality (Table 3) between treatments.
203 These results are similar to those found by Jang et al. (2004), Barreto et al. (2008),
204 Buchanan et al. (2008) and Vieira et al. (2008), where mortality, villus height or crypt
205 depth, or intestine weight were not affected by the use of CRINA® Poultry or other
206 phyto-genic additives associated or not with organic acids.

207 Birds fed different treatments had the same lesion scores on breasts and foot
208 pads and litter humidity content (Table 3). These results are similar to the findings of
209 Buchanan et al. (2008), as they did not observe significant differences in foot pads.

210 The scores of lesion by *E. acervulina* were highest in the NC group birds
211 ($P=0.0050$), while the other treatment groups did not show significant differences
212 among them. No significant effects of the treatments were observed for *E. maxima* and
213 *E. tenella* lesions (Table 3). These results are similar to those described by Oviedo-
214 Rondón et al. (2006a), as they found that the use of CRINA® Poultry and CRINA
215 Alternate in broiler diets significantly reduced coccidiosis lesions in the duodenum, but
216 did not affect lesions in the jejunum-ileum. On the other hand, our results are different

217 from the findings of these authors as they found significant reductions of coccidiosis
218 lesion scores in the ceca.

219 Different findings were reported by Oviedo-Rondón et al. (2005) who found that
220 CRINA® Poultry and CRINA Alternate did not affect the coccidiosis lesion scores.
221 Giannenas et al. (2003) studied the influence of essential oils in broiler diets and found
222 that the lesion scores of *Eimeria tenella* in the infected (with *E. tenella*) group
223 supplemented with essential oils were significantly lower than in the infected control
224 group.

225 According to Oviedo-Rondón et al. (2006b), stress and coccidia infection result
226 in drastic shifts in the microbial communities. The use of essential oils modulates the
227 microbial communities in coccidial challenges and avoids drastic changes in the
228 intestinal microbial ecology after a coccidia infection, whether the birds were
229 vaccinated or not.

230 Regarding microbial modulation by CPP, two consecutive experiments were
231 carried out by Oviedo-Rondón et al. (2010) with broilers fed corn-soybean meal diets to
232 determine comparative effects of feed additives (antibiotic, probiotic, CPP and
233 CRINA® Poultry AF) on ileal and cecal microbial populations, by denaturing gradient
234 gel electrophoresis (DGGE). They found that antibiotic treatment affected the ileal but
235 not the cecal microbial population. More pronounced changes in ileal and cecal
236 microbial populations were seen in broilers at 43 days following treatment with
237 probiotic and with blends of essential oils.

238 Hume et al. (2011) carried out a study where broilers fed diets supplemented
239 with antibiotic, probiotic, CPP and CRINA® Poultry AF were infected with *Eimeria*
240 *spp.* to determine effects of performance enhancers on ileal and cecal microbial
241 communities. They used pyrosequencing and DGGE for sequencing individual cecal

242 bacteria. They also found that probiotics and essential oils blends modified broiler ileal
243 and cecal digestive microbial population. In the final period, however, none of the feed
244 additives reduced the negative effects of infection on BWG to levels seen in non-
245 medicated non-infected controls. On the other hand, all feed additives had some positive
246 effect on decreased weight gain. The debilitating effects of *Eimeria* infection were
247 lessened by these feed additives.

248 Our results showed that the supplementation of broiler diets with CRINA®
249 Poultry Plus increased performance and decreased lesion scores of *E. acervulina* in
250 relation to the broilers in the control group. Moreover, the diet with inclusion of only
251 this additive showed better results in body weight gain than the positive control diet.
252 These results suggest that CRINA® Poultry Plus can be used as an alternative product
253 to antibiotic growth promoters in broiler diets without losses in productive performance.

254

255

ACKNOWLEDGMENTS

256 We thank DSM Nutritional Products and the National Counsel of Technological
257 and Scientific Development (CNPq) for the financial support for this experiment.

258

259

REFERENCES

- 260 Angelo, J. C., Gonzales, E., Kondo, N., Anzai, N. H., and Cabral, M. M. 1997. Material
261 de cama: qualidade, quantidade e efeito sobre o desempenho de frangos de corte.
262 Revista Brasileira de Zootecnia. v.26 , n.1 , p. 121-130.
- 263 Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. 2008. Biological effects of
264 essential oils – a review. Food. Chem. Toxicol. v.46, Issue 2, p. 446-475.

- 265 Barreto, M. S. R., Menten, J. F. M., Racanicci A. M. C. Pereira, P. W. Z., and Rizzo, P.
266 V. 2008. Plant Extracts used as Growth Promoters in Broilers. Brazilian Journal of
267 Poultry Science., v.10 , n.2 , p. 109 - 115
- 268 Brenes, A., and Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and
269 modes of action. Anim. Feed Sci. Technol., v.158, Issue 1, Pages 1-14.
- 270 Buchanan, N. P., Hott, J. M., Cutlip, S. E., Rack, A. L., Asamer, A., and Moritz, J. S..
271 2008. The effects of a natural antibiotic alternative and a natural growth promoter
272 feed additive on broiler performance and carcass quality. J. Appl. Poult. Res.
273 17:202–210
- 274 Castanon, J. I. R. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in
275 European poultry feeds. Poult. Sci. 86:2466–2471
- 276 Collignon, P. 1999. Vancomycin-resistant enterococci and use of avoparcin in animal
277 feed: is there a link? Medical Journal of Australia, v. 171, p. 144-146.
- 278 Dahiya, J. P., Wilkie, D. C., Van Kessel, A. G., and Drew, M. D. 2006. Potential
279 strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic
280 era. Anim. Feed Sci. Technol. 129:60–88
- 281 Dibner, J. J., and Buttin, P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of
282 gut microflora on nutrition and metabolism. J. Appl. Poult. Res., v.11, p.453-463.
- 283 Drew, M. D., Syed, N. A., Goldade, B. G., Laarveld, B. and Van Kessel, A. G. 2004.
284 Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium*
285 *perfringens* in broiler chickens. Poultry Science 83:414–420.
- 286 Elliott, S. D., and Barnes, E. M. 1959. Changes in serological type and antibiotic
287 resistance on *Lancefield* group D *Streptococci* in chickens receiving dietary
288 chlortetracycline. J. Gen. Microbiol., v. 20, p. 426-433, 1959.

- 289 Ertas, O. N., Güler, T., Çiftçi, M., Dalkılıç, B., and Simsek, Ü. G. 2005. The effect of
290 an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance.
291 Int. J. Poult. Sci. 4:879–884.
- 292 Federation of Animal Science Societies, 2010. Guide for the Care and Use of
293 Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd ed. Fed. Anim. Sci. Soc.,
294 Champaign, IL 61822.
- 295 Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N.A.,
296 and Spais, A.B. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil
297 on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. Arch
298 Anim Nutr, v. 57(2), pp. 99 – 106
- 299 Hammer, K. A., Carson, C. F., and Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential
300 oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86:985-990.
- 301 Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.
302 J., Gorris, L. G. M., and Von Wright, A.. 1998. Characterization of the action of
303 selected essential oil components on gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem.
304 46:3590-3595.
- 305 Hernández, F., Madrid, J., García V., Orengo, J., and Megias, M. D. 2004. Influence of
306 two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size.
307 Poult. Sci. 83:169–174
- 308 Hume, M. E., Barbosa, N. A., Dowd, S. E., Sakomura, N. K., Nalian, A. G., Kley, A.
309 M., and Oviedo-Rondón, E. O. 2011. Use of pyrosequencing and denaturing
310 gradient gel electrophoresis to examine the effects of probiotics and essential oil
311 blends on digestive microflora in broilers under mixed eimeria infection.
312 Foodborne Pathog. Dis. 8(11):1159-1167

- 313 Jang, I.S., Ko, Y.H., Kang, S.Y., and Lee, C.Y. 2007. Effect of a commercial essential
314 oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora
315 population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134:304–315.
- 316 Jang, I. S., Ko, Y. H., Yang ,H. Y., Ha, J. S., Kim, J. Y., Kang, S. Y., Yoo, D. H., Nam,
317 D. S., Kim, D. H., and Lee, C. Y. 2004. Influence of essential oil components on
318 growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine
319 in broiler chickens. *Asian-australas. J. Anim. Sci.*, v. 17, n. 3:394-400.
- 320 Johnson, J., and Reid, W. M. 1970. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in
321 battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28:30-36.
- 322 Józefiak, D., Kaczmarek, S., and Rutkowski, A. 2010. The effects of benzoic acid
323 supplementation on the performance of broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim.*
324 *Nutr.* 94:29–34
- 325 Kluge, H., Broz, J. and Eder, K. 2006. Effect of benzoic acid on growth performance,
326 nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters
327 of microbial metabolism in piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal*
328 *Nutrition* 90: 316–324
- 329 Lee, K. W., Everts, H., Kappert, H. J., Frehner, M. ,Losa, R., and Beynen, A. C. 2003.
330 Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive
331 enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* v. 44, n.
332 3, p 450–457
- 333 Martrenchar, A., Boilletot, E., Huonnic, D., and Pol, F. 2002. Risk factors for foot-pad
334 dermatitis in chicken and turkey broilers in France. *Prev. Vet. Med.* 52:213-226.
- 335 Mitsch, P., Zitterl-Eglseer, K., Köhler, B., Gabler, C., Losa, R., and Zimpernik, I., 2004.
336 The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation

- 337 of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poult. Sci.* 83,
338 669–675.
- 339 Oviedo-Rondón, E. O., Clemente-Hernández, S., Salvador, F., Williams, P., and Losa,
340 R. 2006a. Essential oils on mixed coccidia vaccination and infection in broilers.
341 *Int. J. Poult. Sci.* 5 (8):723-730.
- 342 Oviedo-Rondón, E. O., Clemente-Hernández, S., Williams, P., and Losa, R. 2005.
343 Responses of coccidia-vaccinated broilers to essential oil blends supplementation
344 up to forty-nine days of age. *J. Appl. Poult. Res.* 14:657–664
- 345 Oviedo-Rondón, E. O., Hume, M.E., Barbosa, N. A., Sakomura, N. K., Weber, G., and
346 Wilson, J. W. 2010. Ileal and caecal microbial populations in broilers given
347 specific essential oil blends and probiotics in two consecutive grow-outs. *Avian.*
348 *Biol. Res.* 3 (4):157–169. doi: 10.3184/175815511X12919853724050
- 349 Oviedo-Rondón, E. O., Hume, M.E., Hernández, C., and Clemente-Hernández, S.
350 2006b. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with
351 mixed eimeria species, and supplemented with essential oil blends. *Poult. Sci.*
352 85:854–860
- 353 Partanen, K. H., and Mroz, Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig
354 diets. *Nutrition Research Reviews*. Wallingford, v. 12, n. 1, p. 117-145.
- 355 Ricke, S. C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as
356 antimicrobials. *Poult. Sci.* 82:632–639.
- 357 SAS Institute. 2009. *SAS User's Guide: Statistics. Version 9.2 Review Edition*. SAS
358 Institute Inc, Cary, NC. 2009.
- 359 Tampieri, M. P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M. S., Falcioni, L., Cioni, P. L.,
360 and Morelli, I. 2005. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils
361 and their major components. *Mycopathologia* 159:339-345

- 362 Vieira, S. L., Oyarzabal, O. A., Freitas, D. M., Berres, J., Peña, J. E. M., Torres, C. A,
363 and Coneglian, J. L. B. 2008. Performance of broilers fed diets supplemented with
364 sanguinarine-like alkaloids and organic acids. *J. Appl. Poult. Res.* 17:128–133
- 365 Weber, G. M., Michalczuk, M., Huyghebaert, G., Juin, H., Kwakernaak, C. and Gracia,
366 M.I. 2012. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on
367 performance of broiler chickens as revealed by a meta-analysis of 4 growth trials
368 in various locations. *Poult. Sci.* 91:2820-2828
- 369 William, P., Losa, R.. 2001. The use of essential oils and their compounds in poultry
370 nutrition. *World Poultry* 17(4):14-15
- 371 World Health Organization, 2000. WHO global principles for the containment of
372 antimicrobial resistance in animals intended for food.
373 http://www.who.int/emc/diseases/zoo/who_global_principles/index.htm. Accessed
374 Feb. 2012.
- 375

376 **Table 1.** Experimental basal diets

	PHASES		
	1-21d	22-35d	36-42d
INGREDIENTS (%)			
Corn	56.65	56.15	55.51
Soybean meal	34.28	34.15	34.44
Meat bone meal	4.88	5.27	4.77
Vegetable oil	2.68	3.48	4.37
Salt	0.39	0.39	0.39
Limestone 38% Ca	0.30	0.18	0.23
Dicalcium phosphate	0.23	0.00	0.00
Vitamin and Mineral Premix ¹	0.15	0.15	0.15
L-Threonine	0.05	0.05	0.00
DL-Methionine	0.294	0.193	0.137
L-Lysine 98%	0.107	0.000	0.000
NUTRIENTS			
Met. Energ.(kcal/kg)	3050	3100	3150
Crude Protein (%)	22.5	22.37	22.18
Calcium (%)	1.00	0.95	0.90
Available P (%)	0.45	0.43	0.40
Sodium (%)	0.22	0.22	0.22
Lysine (%)	1.300	1.198	1.195
Methionine (%)	0.617	0.517	0.460
Methionine + Cystin (%)	0.960	0.860	0.802
Thryptophan (%)	0.239	0.239	0.239
Threonine (%)	0.800	0.800	0.754

377 ¹ Vitamin-mineral premix (/kg of premix): Vit.A 9000000 UI; Vit D₃ 2500000 UI; Vit E 20000 mg; Vit
378 K₃ 2500 mg; Vit B₁ 1500 mg; Vit B2 6000 mg; Vit B6 3000.308 mg; Vit B₁₂ 12000 mcg; Pantothenic
379 Acid 12000 mg; Niacin 25000 mg; Folic acid 800 mg; Biotin 60 mg; Se 250 mg; Cu 20000 mg; Fe
380 100000 mg; Mn 160000 mg; Co 2000 mg; I 2000 mg; Zn 100000.100 mg; Mineral oil 10 mg

381

Table 2. One day body weight and effect of the treatments on the body weight gain, feed intake and feed conversion ratio in the experimental

382

period¹

Treatments ²	1 day body weight (g)	Body weight gain (g)				Feed intake (g)				Feed Conversion Ratio			
		1-21d	22-35d	36-42d	1-42d	1-21d	22-35d	36-42d	1-42d	1-21d	22-35d	36-42d	1-42d
NC	42.07	783.39 ^b	1054.69 ^b	545.03 ^b	2383.99 ^c	1163.58	2160.14	1306.27 ^a	4624.68	1.49 ^a	2.05	2.40 ^a	1.94 ^a
PC	42.10	806.97 ^a	1076.42 ^{ab}	553.35 ^{ab}	2439.62 ^b	1145.04	2157.53	1241.29 ^b	4535.52	1.42 ^b	2.00	2.25 ^b	1.86 ^b
CPPD	42.13	815.51 ^a	1108.53 ^a	594.61 ^a	2518.66 ^a	1162.33	2178.13	1271.89 ^{ab}	4608.88	1.43 ^b	1.97	2.14 ^b	1.83 ^b
AVI _(1-21d) /CPP _(22-42d)	42.10	800.92 ^{ab}	1064.02 ^{ab}	596.54 ^a	2461.48 ^{ab}	1151.68	2168.86	1274.57 ^{ab}	4579.10	1.44 ^{ab}	2.04	2.16 ^b	1.86 ^b
AVI + CPP(1-42d)	42.15	802.86 ^{ab}	1087.18 ^{ab}	568.38 ^{ab}	2458.43 ^{ab}	1152.41	2180.48	1299.91 ^{ab}	4617.52	1.44 ^{ab}	2.01	2.29 ^{ab}	1.88 ^b
SEM*	0.05	2.96	5.43	6.38	9.02	4.18	8.08	7.30	12.69	0.01	0.01	0.03	0.01
<i>P</i> -value	0.9898	0.0050	0.0122	0.0247	0.0001	0.6087	0.8719	0.0323	0.1523	0.0027	0.0870	0.0048	0.0001

383 ^{a-c} Means in a column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$)384 ¹ Data represents means from 10 replicates per treatment386 ² NC = diet without growth promoters; PC = diet with 10 ppm of Avilamycin; AVI = Avilamycin; CPP = CRINA® Poultry Plus (DSM Nutritional Products Ltd., P.O. Box
387 3255 CH-4002 Basel, Switzerland); CPPD = diet with 300 ppm of CPP from 1-42 days; AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d) = diet with 10 ppm AVI from 1 – 21 days and 300 ppm of CPP
388 from 22-42d; AVI + CPP(1-42d) = diet with 10 ppm AVI and 300 ppm of CPP from 1-42d

* Pooled SEM, n = 50

389

390

392

Table 3. Effect of the treatments on mortality, European Productive Efficiency Index, gut length, litter humidity content and lesions scores of breasts, foot pads and coccidiosis in the experimental period¹

Treatments ²	Mortality %				EPEI ³	Litter humidity (%)		Breast's scores	Foot pads' scores	Gut length	<i>E.acervulina</i> scores	<i>E. maxima</i> scores	<i>E.tenella</i> scores
	1-21d	22-35d	36-42d	1-42d		21 days	42 days						
NC	0.32	1.42	0.35	1.94	286.42 ^b	41.04	51.08	0.02	1.33	1.59 ^b	0.63 ^a	0.33	0.06
PC	0.64	1.08	0.71	2.26	306.51 ^a	41.03	49.18	0.03	1.27	1.67 ^a	0.13 ^b	0.36	0.00
CPPD	0.64	0.72	0.72	1.94	321.57 ^a	41.33	49.15	0.01	1.15	1.65 ^{ab}	0.23 ^b	0.26	0.00
AVI _(1-21d) /CPP _(22-42d)	0.00	1.42	1.79	2.90	307.09 ^a	43.31	49.74	0.03	1.29	1.65 ^{ab}	0.23 ^b	0.13	0.00
AVI + CPP(1-42d)	0.32	1.07	0.00	1.29	306.80 ^a	41.36	49.22	0.04	1.27	1.67 ^a	0.20 ^b	0.30	0.03
SEM*	0.15	0.26	0.23	0.32	2.64	0.57	0.52	0.01	0.03	0.01	0.05	0.04	0.01
<i>P</i> -value	0.6436	0.9150	0.1379	0.6169	0.0003	0.6946	0.6809	0.7041	0.4767	0.0223	0.0050	0.4389	0.2491

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

394 ¹ Data represents means from 10 replicates per treatment

396 ² NC = diet without growth promoters; PC = diet with 10 ppm of Avilamycin; AVI = Avilamycin; CPP = CRINA® Poultry Plus (DSM Nutritional Products Ltd., P.O. Box
397 3255 CH-4002 Basel, Switzerland); CPPD = diet with 300 ppm of CPP from 1-42 days; AVI_(1-21d)/CPP_(22-42d)= diet with 10 ppm AVI from 1 – 21 days and 300 ppm of CPP
398 from 22-42d; AVI + CPP(1-42d)= diet with 10 ppm AVI and 300 ppm of CPP from 1-42d

* Pooled SEM, n = 50

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a adição da combinação de ácido benzóico e óleos essenciais (associada ou não ao antibiótico promotor de crescimento) nas dietas melhorou o desempenho zootécnico dos frangos em relação ao controle negativo.

O produto CRINA[®] Poutry Plus pode ser usado como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento em dietas de frango de corte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

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

APPLEGATE T.J. et al. Probiotics and phytochemicals for poultry: Myth or reality?. **Journal of Applied Poultry Research** 19 :194–210, 2010

AVISITE. No 1º trimestre, frango respondeu por 69% do volume e por 52% da receita cambial das carnes. Campinas, 15 de abril de 2011. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/noticias/default.asp?codnoticia=12029>>. Acesso em 17 abr. 2011.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46,p. 446-475, 2008.

BARRETO, M. S. R. et al. Plant Extracts used as Growth Promoters in Broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.10 , n.2 , p. 109 – 115, 2008.

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

BUCHANAN, N. P. et al. The effects of a natural antibiotic alternative and a natural growth promoter feed additive on broiler performance and carcass quality. **Journal of Applied Poultry Research** 17:202–210, 2008.

BUCHBAUER, G. Biological Activities of Essential Oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.) **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 235-273.

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

CARDOSO, V. DA SILVA. Ação da piperina sobre os parâmetros hematológicos e histopatológicos de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Revista de Ciências da Vida**. Seropédica (RJ): Editora Universidade Rural, v. 28, suplemento, 2008.

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

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

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Relatório da comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu sobre a utilização de coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados à alimentação animal**. Bruxelas, 05 de maio de 2008. Disponível em <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2008:0233:FIN:PT:HTML>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

CROSS, D. E. et al. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. **British Poultry Science**, v. 48, n. 4, p. 496—506, 2007.

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

DE LA CRUZ, M. G. **O uso de óleos essenciais na terapêutica**. Disponível em: <http://www.aja.org.br/oleos/oleos_essenciais_terapias.pdf>. Acesso em 18 jun. 2011.

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

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

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

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology** 88, 308–316, 2000.

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

ERTAS, O. N. et al. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, 4:879–884, 2005.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; ABO-RAYA, S. H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus Parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal of Food Science** 54: 74–76, 1989. doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb08571.x

FRANCO, L. G. **Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador de desempenho em frangos de corte**. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

GASKILL, M. Strictly granola. **American Way** June 1:42–45, 2002.

GHELER, T.R. et al. Uso de ácido benzóico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2182-2187, 2009.

GIANNENAS, I. et al. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives of Animal Nutrition**, v. 57(2), pp. 99 – 106, 2003.

GODOI, M. J. S. Utilização de aditivos em rações formuladas com milho normal e de baixa qualidade para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.1005-1011, 2008

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

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. **Journal of Applied Microbiology** 86:985-990, 1999.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46:3590-3595, 1998.

HERNÁNDEZ, F. et al. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science** 83:169–174, 2004.

HITOKOTO, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n.4, p. 818-822, 1980.

HOFFMAN-PENNESI, D; WU, C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal *Salmonella* population in broilers. **Journal of Applied Poultry Research** 19 :432–443, 2010.

HUME, M. E. et al. Use of pyrosequencing and denaturing gradient gel electrophoresis to examine the effects of probiotics and essential oil blends on digestive microflora in broilers under mixed eimeria infection. **Foodborne Pathogens and Disease** 8(11):1159-1167, 2011.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology** 43: 461–466, 2005.

JÄGER, W. Metabolism of terpenoids in animal models and humans. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.) **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 209-232.

JANG, I.S. et al. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology** 134:304–315, 2007.

JANG, I. S. et al. Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. **Asian – Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 17, n. 3:394-400. 2004.

JÓZEFIAK, D. et al. A note on effect of benzoic acid supplementation on the performance and microbiota population of broiler chickens. **Journal of Animal and Feed Sciences** 16, p. 252–256, 2007.

JÓZEFIAK, D.; KACZMAREK, S.; RUTKOWSKI, A. The effects of benzoic acid supplementation on the performance of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 94:29–34, 2010.

JUIN, H.; WEBER, G. Dose response effects of a combination of essential oil compounds with an organic acid in broilers. In: XIIIth EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 2010, Tours, France. **Anais eletrônicos...World's Poultry Science Journal**, 2010. Disponível em: <<http://epc2010.org/cd/Abstracts/335.pdf>>. Acesso em 10 dez. 2012.

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

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure & enzyme kinetics. **Phytomedicine** 9:224–231, 2002.

KIM, J. H., et al. Targeting the oxidative stress response system of fungi with redox-potent chemosensitizing agents. **Frontiers in Microbiology** 3:88, 2012.

KLUGE, H. et al. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 90: 316–324, 2006.

KREBS, H. A. et al.: Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. **The Biochemical Journal** v.214, p. 657–663, 1983

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

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

LEE, K. W. et al. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**. v. 44, n. 3, p 450–457, 2003.

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

MCCARTNEY, E. O banimentos de antibióticos promotores de crescimento na EU: implicações globais para a nutrição animal. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 9. **Anais...Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**, 2008. p. 13 – 33.

MENTEN, J. F. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2, 2002. **Anais...** Uberlândia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 251-276.

MITTAL, R.; GUPTA, R. L. *In vitro* antioxidant activity of piperine. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology** 22 (5):271–274, 2000.

MITSCH, P. et al. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry Science** 83, 669–675, 2004.

MORAIS, S. M. de. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19(1B): 315-320, 2009.

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

OVIEDO-RONDÓN, E. O. et al. Essential oils on mixed coccidia vaccination and infection in broilers. **International Journal of Poultry Science** 5 (8):723-730, 2006a

OVIEDO-RONDÓN, E. O. et al. Ileal and caecal microbial populations in broilers given specific essential oil blends and probiotics in two consecutive grow-outs. **Avian Biology Research**. 3 (4):157–169, 2010. doi: 10.3184/175815511X12919853724050

OVIEDO-RONDÓN, E. O. et al. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed eimeria species, and supplemented with essential oil blends. **Poultry Science** 85:854–860, 2006b.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. et al. Responses of coccidia-vaccinated broilers to essential oil blends supplementation up to forty-nine days of age. **Journal of Applied Poultry Research** 14:657–664, 2005.

PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) n° 1831/2003 de 22 de Setembro de 2003. **Jornal Oficial da União Européia**, L 268 de 18/10/2003 p. 0029 – 0043. Disponível em <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1831:PT:HTML>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**. Wallingford, v. 12, n. 1, p. 117-145, 1999.

PAULI, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. **International Journal of Aromatherapy** 11: 126–133, 2001.

PEARSON, D. A. et al. Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, 1997.

PEÑALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica** 113: 1–6, 2005.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition** 47:55–59, 1996

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. **Nahrung** 44:42–46, 2000.

RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 5062–5069, 2010.

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

ROCHA, T.M. **Controle de *Salmonella Typhimurium* em frangos de corte utilizando composto com ácido benzóico, fumárico e 2-hidroximetiltiobutanóico**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2008.

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

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**. v.37, n.3, p. 803-808, 2007.

SANZ, R. M.; MEUTER, A.; PAULUS, C. Aceites esenciales y ácidos orgánicos para el control de patógenos aviáres. **MG Mundo ganadero**, n. 222, ano 20. p. 40-42, 2009

SCHEUERMANN, G.N. et al. Phytogetic additive as an alternative to growth promoters in broiler chickens. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.522-527, 2009

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 47:735–748, 2007.

TAMPIERI, M.P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v.159, n.3, p. 339-345, 2005.

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.

VAREL, V. H.; MILLER, D. L. Eugenol stimulates lactate accumulation yet inhibits volatile fatty acid production and eliminates coliform bacteria in cattle and swine waste. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p.1001–1005, 2004.

VIEIRA, S. L. et al. Performance of broilers fed diets supplemented with sanguinarine-like alkaloids and organic acids. **Journal of Applied Poultry Research** 17:128–133, 2008.

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

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

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

WILLIAM, P.; LOSA, R. The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. **World Poultry** 17(4):14-15, 2001.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Avicultura brasileira em 2010**: exportações e produção. São Paulo, 2011. Disponível em: <file:///C:/DOCUME~1/-uSUAR~1/CONFIG~1/Temp/Estatisticas_Ubabef_2010_Final.doc-1.htm>. Acesso em: 18 abr. 2011

ZAGO, J. A. A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19(4): 828-833, 2009.

ANEXOS

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

POULTRY SCIENCE INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Editorial Policies and Procedures

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

Contact Information for Journal Staff

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Colin G. Scanes, 335 Chapman Hall, 2310 East Hartford Ave., University of Wisconsin, Milwaukee, WI 53201; e-mail: scanes@uwm.edu (withcc to cscanes@wi.rr.com). For assistance with Manuscript Central, manuscript submission and copyright forms, or page charge and offprint orders, contact Jeremy Holzner, editorial assistant,

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

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

Care and Use of Animals

Authors must make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments shall be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in *Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*, 1st revised edition, 1999 (Association Headquarters, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822); and, if applicable,

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (United States Department of Human Health and Services, National Institutes of Health, Publication Number ISBN 0-309-05377-3, 1996); or *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 2nd ed. Volume 1, 1993 (Canadian Council on Animal Care). Methods of killing experimental animals must be described in the text. In describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified. Intra-abdominal and intrathoracic invasive surgery requires anesthesia. This includes castration.

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

Types of Articles

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

of experiments published in *Poultry Science* must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rapid Communications. We aim for receipt-to-decision times of a month or less, and accepted papers will have priority for publication in the next available issue of *Poultry Science*. These papers will present informative and significant new findings, such as tissue-specific gene expression profile data with full-length cDNA and genomic gene structure characterization. These papers will be short (2 to 4 published pages), adhere to journal format, and include references and an abstract. Rapid Communications should **not** be preliminary reports or incomplete studies. Authors will select Rapid Communications as the paper type when submitting the paper.

Book Reviews. *Poultry Science* publishes reviews of books considered to be of interest to the readers. The editor-in-chief ordinarily solicits reviews. Unsolicited reviews must be sent directly to the editor-in-chief for approval.

Book reviews shall be prepared in accordance to the style and form requirements of the journal, and they are subject to editorial revision. No page charges will be assessed.

Letters to the Editor. The purpose of letters will be to discuss, critique, or expand on scientific points made in articles recently published in *Poultry Science*. Introduction of

unpublished data will not be allowed, nor will material based on conjecture or speculation. Letters must be received within 6 months of an article's publication.

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

SUBMISSION OF ELECTRONIC

MANUSCRIPTS

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

Copyright Agreement

Authors shall complete the Manuscript Submission and Copyright Release form for each new manuscript submission; faxed copies are acceptable. The form is published in *Poultry Science* as space permits and is available online (<http://ps.fass.org>). The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release Form and must be completed by all authors before publication can proceed. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of coauthors. Persons unable to sign copyright agreements, such as federal employees, must indicate the reason for exemption on the form.

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

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

REVIEW OF MANUSCRIPTS

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

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

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

PRODUCTION OF PROOFS

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

Proofs

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

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

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

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

Offprints and Color Charges. Offprints may be ordered at an additional charge. Authors who submit articles containing color illustrations are responsible for paying the

additional charge for color printing, including the printing of any reprints they order, and must agree in writing prior to publication to pay the additional charges.

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

MANUSCRIPT PREPARATION:

STYLE AND FORM

General

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in *The American Heritage Dictionary*, *Webster's Third International Dictionary*, or the *Oxford American English Dictionary*. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 6th ed. Council of Biology Editors Style Manual Committee. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

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

Preparing the Manuscript File

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

Headings

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

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

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

Title Page

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

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

Under the title, names of authors should be typed with initial capital letters and a space between initials (e.g., T. E. Smith). Affiliations will be footnoted using the following symbols: *, †, ‡, §, #, □, and be placed below the author names. Do not give authors' titles, positions, or degrees. Numbered footnotes may be used to provide supplementary information, such as present address, acknowledgment of grants, and experiment station or journal series number. The corresponding author should be indicated with a numbered footnote (e.g.,¹Corresponding author: myname@university.edu). Note that there is no period after the corresponding author's e-mail address.

The title page shall include the name and full address of the corresponding author. Telephone and FAX numbers and e-mail address must also be provided. The title page must indicate the appropriate scientific section for the paper (i.e., Education and

Production; Environment, Well-Being, and Behavior; Genetics; Immunology, Health, and Disease; Metabolism and Nutrition; Molecular, Cellular, and Developmental Biology; Physiology, Endocrinology, and Reproduction; or Processing, Products, and Food Safety).

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

Abbreviations

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

Abstract

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

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

Key Words

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

Key words: . . .

Introduction

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

Materials and Methods

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

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

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

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

Vitamin A

1 IU = 0.3 µg of all-*trans* retinol

1 IU = 0.344 µg of retinyl acetate

1 IU = 0.552 µg of retinyl palmitate

1 IU = 0.60 µg of β-carotene

Vitamin E

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

1 IU = 0.91 mg of dl-α-tocopherol

1 IU = 0.67 mg of dl-α-tocopherol

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

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

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

When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately.

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

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

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

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

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

Standard deviation refers to the variability in a sample or a population. The standard error (calculated from error variance) is the estimated sampling error of a statistic such as the sample mean. When a standard deviation or standard error is given, the number of degrees of freedom on which it rests should be specified. When any statistical value (as mean or difference of 2 means) is mentioned, its standard error or confidence limit should be given. The fact that differences are not “statistically significant” is no reason for omitting standard errors. They are of value when results from several experiments are combined in the future. They also are useful to the reader as measures of efficiency of experimental techniques. A value attached by “ \pm ” to a number implies that the second value is its standard error (not its standard deviation). Adequate reporting may require only 1) the number of observations, 2) arithmetic treatment means, and 3) an estimate of experimental error. The pooled standard error of the mean is the preferred estimate of experimental error. Standard errors need not be presented separately for each mean unless the means are based on different numbers of observations or the heterogeneity of the error variance is to be emphasized. Presenting individual standard errors clutters the presentation and can mislead readers.

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

Unbalanced factorial data can present special problems.

Accordingly, it is well to state how the computing was done and how the parameters were estimated. Approximations should be accompanied by cautions concerning possible biases.

Contrasts (preferably orthogonal) are used to answer specific questions for which the experiment was designed; they should form the basis for comparing treatment means. Nonorthogonal contrasts may be evaluated by Bonferroni t statistics. The exact contrasts tested should be described for the reader. Multiple-range tests are not appropriate when treatments are orthogonally arranged.

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

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

Other probability (α) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled. Do not report P values to more than 3 places after the decimal. Regardless of the probability level used, failure to reject a hypothesis should be based on the relative consequences of type I and II errors. A “nonsignificant” relationship should not be interpreted to suggest the absence of a relationship.

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

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

Present only meaningful digits. A practical rule is to round values so that the change caused by rounding is less than one-tenth of the standard error. Such rounding increases the

variance of the reported value by less than 1%, so that less than 1% of the relevant information contained in the data is sacrificed. In most cases, 2 or 3 significant digits (not decimal places) are sufficient.

Results and Discussion

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

Acknowledgments

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

Appendix

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

Article:

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

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

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

Book:

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

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

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

Other:

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

Dyro, F. M. 2005. Arsenic. WebMD. http://www.emedicine.com/neuro/topic_20.htm Accessed Feb. 2006. El Halawani, M. E., and I. Rosenboim. 2004. Method to enhance reproductive performance in poultry. Univ. Minnesota, assignee. US Pat. No. 6,766,767.

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

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

Tables

Tables must be created using the MS Word table feature and inserted in the manuscript after the references section. When possible, tables should be organized to fit across the page without running broadside. Be aware of the dimensions of the printed page when planning tables (use of more than 15 columns will create layout problems). Place the table number and title on the same line above the table. The table title does not require a period.

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

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

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

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

Superscript letters shall be used for the separation of means in the body of the table and explanatory footnotes must be provided [i.e., “Means within a row lacking a common superscript differ ($P < 0.05$).”]; other significant P -values may be specified. Comparison of means within rows and columns should be indicated by different series of superscripts (e.g., a,b, . . . in rows; x-z . . . in columns). The first alphabetical letter in the series (e.g., a or A) shall be used to indicate the largest mean. Lowercase superscripts indicate $P \leq 0.05$. Uppercase letters indicate $P \leq 0.01$ or less.

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

Figures

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

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

- **Figure Size.** Prepare figures at final size for publication. Figures should be prepared to fit one column (8.9 cm wide), 2 columns (14 cm wide), or full-page width (19 cm wide).
- **Font Size.** Ensure that all type within the figure and axis labels are readable at final publication size. A minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.
- **Fonts.** Use Helvetica or Times New Roman. Symbols may be inserted using the Symbol palette in Times New Roman.
- **Line Weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long-dash, short-dash, and dotted lines. Avoid the use of color, gray, or shaded lines, as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.
- **Axis Labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses, and should be consistent within a manuscript.
- **Shading and Fill Patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed (e.g., black, white, gray, diagonal stripes). Avoid the use of multiple shades of gray, as they will not be easily distinguishable in print.
- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only: □, ■, ○, ●, ▲, ▼, n, ,, e, r, +, or ×. Symbols should be defined in a key on the figure if possible.
- **File Formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG. Avoid PowerPoint files and other formats. For the best printed quality, line art should be prepared at 600 ppi. Grayscale and color images and photomicrographs should be at least 300 ppi.
- **Grayscale Figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale.
Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.
- **Color Figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).
- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.

- **Caption.** The caption should provide sufficient information that the figure can be understood with excessive reference to the text. All author-derived abbreviations used in the figure should be defined in the caption.
- **General Tips.** Avoid the use of three-dimensional bar charts, unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and key are clear and easily readable at final publication size.

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

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

Miscellaneous Usage Notes

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

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

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

As a rule, author-derived abbreviations should be in all capital letters. Terms used less than three times must be spelled out in full rather than abbreviated. All terms are to be spelled out in full with the abbreviation following in bold type in parentheses the first time they are

mentioned in the main body of the text. Abbreviations shall be used consistently thereafter, rather than the full term.

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

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

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

A adenine

ADG average daily gain

ADFI average daily feed intake

AME apparent metabolizable energy

AMEn nitrogen-corrected apparent metabolizable energy

ANOVA analysis of variance

B cell bursal-derived, bursal-equivalent derived cell

bp base pairs

BSA bovine serum albumin

BW body weight

C cytosine

cDNA complementary DNA

cfu colony-forming units

CI confidence interval

CP crude protein

cpm counts per minute

CV coefficient of variation

d day

df degrees of freedom

DM dry matter

DNA deoxyribonucleic acid

EDTA ethylenediaminetetraacetate

ELISA enzyme-linked immunosorbent antibody assay

EST expressed sequence tag

g gram

g gravity

G guanine

GAT glutamic acid-alanine-tyrosine

G:F gain-to-feed ratio

GLM general linear model

h hour

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

HPLC high-performance (high-pressure) liquid chromatography

ICU international chick units

Ig immunoglobulin

i.m. intramuscular

i.p. intraperitoneal

IU international units

i.v. intravenous

kb kilobase pairs

kDa kilodalton

L liter*

L:D hours light:hours darkness in a photoperiod

m meter

μ_{micro}

M molar

MAS marker-assisted selection

ME metabolizable energy

ME_n nitrogen-corrected metabolizable energy

MHC major histocompatibility complex

mRNA messenger ribonucleic acid

min minute

mo month

MS mean square

n number of observations

N normal

NAD nicotinamide adenine dinucleotide

NADH reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NRC National Research Council
NS not significant
PAGE polyacrylamide gel electrophoresis
PBS phosphate-buffered saline
PCR polymerase chain reaction
pfu plaque-forming units
QTL quantitative trait loci
r correlation coefficient
r² coefficient of determination, simple
R² coefficient of determination, multiple
RFLP restriction fragment length polymorphism
RH relative humidity
RIA radioimmunoassay
RNA ribonucleic acid
rpm revolutions per minute
s second
s.c. subcutaneous
SD standard deviation
SDS sodium dodecyl sulfate
SE standard error
SEM standard error of the mean
SRBC sheep red blood cells
SNP single nucleotide polymorphism
T thymine
TBA thiobarbituric acid
T cell thymic-derived cell
TME true metabolizable energy
TMEn nitrogen-corrected true metabolizable energy
Tris tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSAA total sulfur amino acids
U uridine
USDA United States Department of Agriculture
UV ultraviolet

vol/vol volume to volume

vs. versus

wt/vol weight to volume

wt/wt weight to weight

wk week

yr year

*Also capitalized with any combination, e.g., mL.

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

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

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

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

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

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

National Laboratories, Los Alamos, NM 87545) nucleotide sequence database and have been assigned the accession number XNNNNN.”

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Supplemental Information (Online)

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

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

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

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

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