

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**O EFEITO DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA SOBRE O
DESEMPENHO E IMUNIDADE DE FRANGOS DESAFIADOS COM
Escherichia coli PATOGÊNICA**

Micaela Guidotti

Orientador: Marcos Barcellos Café – UFG

GOIÂNIA

2013



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Micaela Guidotti Takeuchi** E-mail: **micaelaguidotti@gmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento: CAPES

País: **Brasil** UF: **Goiás** CNPJ: Sigla:

Título: O Efeito do óleo-resina de copaíba sobre o desempenho e imunidade de frangos desafiados com *Escherichia coli* patogênica Palavras-chave: **Avicultura de corte, Copaifera sp., nutrição, óleo-resina, resposta imune**

Título em outra língua: **The effect of oil-resin from copaíba on performance and immunity of chicken challenged with pathogenic *Escherichia coli***

Palavras-chave em outra língua: **Broiler production, Copaifera sp., immune response, nutrition, oilresin**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data de defesa: (dd/mm/aaaa) **04/06/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal -Medicina Veterinária**

Orientador(a): **Marcos Barcellos Café** E-mail: **mcafe@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Ana Paula Junqueira Kipnis** E-mail: **anapaula@iptsp.ufg.br**

Co-orientador(2): **Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


Micaela Guidotti Takeuchi
Assinatura do(a) autor(a)

Goiânia 25 de junho de 2013

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MICAELA GUIDOTTI

**O EFEITO DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA SOBRE O
DESEMPENHO E IMUNIDADE DE FRANGOS DESAFIADOS COM
Escherichia coli PATOGÊNICA**

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal junto à Escola
de Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:

Etiopatogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle das doenças infecciosas dos
animais

Orientador:

Prof Dr Marcos Barcellos Café

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis
Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

Guidotti, Micaela.

G948e O efeito do óleo-resina de copaíba sobre o desempenho e imunidade de frangos desafiados com *Escherichia coli* patogênica [manuscrito] / Micaela Guidotti. - 2013.
xiii, 82 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café; Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis, Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Frango de corte – Nutrição – Copaifera. 2. Frango de corte – Óleo de copaíba – Resposta imune. I. Título.


CDU: 636.5.084.4

Micaela Guidotti

Dissertação defendida e aprovada em **04/06/2013**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Marcos Barcellos Café
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Taveira Rocha - UEG/GO



Prof. Dr. André Kipnis - IPTSP/UFG

Dedico este trabalho ao meu marido, Hidekazu,
meu maior incentivador, a minha
mãe Maria Alice, exemplo de força e persistência, aos
meus irmãos, Mirella e Matheus
que me apoiaram em todos os momentos
da minha trajetória profissional

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir confiar que as escolhas estão diante de nós, por me fazer acreditar todos os dias que tudo tem seu momento certo de acontecer e que independente dos momentos difíceis o melhor caminho é sempre aceitar que posso recomeçar.

Ao meu marido Hidekazu, meu amigo, meu companheiro. Muitos anos juntos ao seu lado me faz a cada dia me tornar uma pessoa melhor, você me ensinou a cultivar o otimismo e me faz acreditar que meus sonhos são possíveis e que juntos podemos realizá-los.

À minha mãe, Maria Alice, que me ensina a manter o equilíbrio, pelo amor incondicional demonstrado em cada minuto que estou ao seu lado, por não me deixar desistir e continuar nos momentos de incertezas, por ser o pilar da nossa família.

Aos meus irmãos Mirella e Matheus por enfrentarmos os desafios da vida com garra e disposição, mesmo que isso exija imensos esforços e árduas renúncias. Que possamos torcer pela felicidade uns dos outros mesmo que à distância.

A minha segunda família: Hideishi, Leonilde, Akikazu, Katiuchia e Kelly, pelas orações e auxílio durante estes anos de trabalho.

Ao meu orientador professor Dr. Marcos Barcellos Café, pela confiança depositada em mim desde o momento que realizei minha trajetória na UFG, por ter aceitado me orientar e pela disponibilidade em me atender em qualquer momento durante estes dois anos de trabalho juntos.

À minha co-orientadora Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, pela orientação nos conhecimentos de imunologia, fornecendo o aprendizado necessário para que a realização deste experimento fosse concluída e sobretudo pelo exemplo de educadora e cientista.

À co-orientadora professora Dra. Maria Auxiliadora Andrade, pelas orientações na área de microbiologia, incentivo na realização deste trabalho e confiança em mim depositada.

Aos amigos da pós graduação e do Laboratório de Imunologia Aplicada do IPTSP que mais do que me auxiliaram nas análises laboratoriais, discutiram,

deram sugestões: Monalisa Trentini, Bruna Daniella Souza, Alexsander, Duanne Alves da Silva, Abadio Costa Júnior, Joseane, Adeliane Castro da Costa, Danilo Resende, Fábio Muniz de Oliveira, Lázaro Moreira Marques Neto, Sarah Nogueira. Obrigada pelas horas que passamos juntos.

Aos amigos da pós graduação e do Laboratório de Bacteriologia da Escola de Veterinária que me auxiliaram no manejo dos animais e nas análises laboratorias: Gisele Nascimento, Angélica Ribeiro Araújo, Édilon Sembariski de Oliveira, Fernando Augusto Fernandes Correa, Fernanda Vieira Castejon, Raquel de Oliveira Santana, Candice Bergmann Tanure, Bruno Moreira dos Santos, Maria Eduarda Lemes Paniago, Cíntia, Dunia.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial aos amigos: Ana Caroline de Souza Barnabé e Abadio da Costa Júnior que foram essenciais na realização deste trabalho. Obrigada pelas muitas horas de trabalho juntos, pela dedicação e garra dispensadas na elaboração desta dissertação.

As técnicas Maria Auxiliadora Leão e Tânia Emos pelos auxílios no laboratório de bacteriologia e a disposição em ajudar.

A toda equipe do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, à CAPES por fornecer apoio financeiro necessário à realização deste trabalho e a todos aqueles que, de forma indireta também contribuíram para a concretização deste projeto.

Sê
Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.

Pablo Neruda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Sistema Imunológico das aves.....	16
2.2. Aditivos fitogênicos.....	19
2.3. Atividade imunomodulatória dos aditivos fitogênicos.....	23
2.4. Óleo de copaíba (<i>Copaifera</i> sp).....	25
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo Geral.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1. Local de realização do experimento.....	30
4.2. Alojamento das aves.....	30
4.3. Delineamento experimental.....	30
4.4. Rações experimentais.....	31
4.5. Preparação do inóculo de <i>Escherichia coli</i> e infecção experimental.....	32
4.6. Colheita de amostras.....	34
4.7. Determinação da concentração de <i>Escherichia coli</i> patogênica de aves para padronização do teste imuno-enzimático.....	35
4.8. Ensaio imuno-enzimático indireto para quantificação de imunoglobulinas isotipo IgA contra <i>E.coli</i> patogênica nas amostras de bile, soro e secreção lacrimal.....	36
4.8.1. Padronização de Ensaio Imuno-enzimático (ELISA) utilizando <i>Escherichia coli</i> patogênica.....	37
4.8.2. Titulação dos níveis de imunoglobulina IgA para a quantificação de anticorpos contra <i>E.coli</i> patogênica nas amostras de bile, soro sanguíneo e secreção lacrimal.....	39

4.9. Modelo de avaliação da resposta imune celular por meio da reação cutânea à fitohemaglutinina (PHA).....	40
4.10. Peso relativo dos órgãos linfóides.....	41
4.11. Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1. Parâmetros de desempenho zootécnico.....	42
5.2. Imunidade humoral de mucosas.....	46
5.3. Resposta imune celular.....	60
5.4. Peso relativo dos órgãos linfóides.....	58
6. CONCLUSÃO	62
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal e nutricional das rações experimentais (g/kg).....	34
Tabela 2 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 7 dias de idade em função dos diferentes níveis de inclusão de óleo-resina de copaíba.....	46
Tabela 3 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 14 dias de idade em função dos diferentes níveis de inclusão de óleo-resina de copaíba.....	47
Tabela 4 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 21 dias de idade em função dos diferentes níveis de inclusão de óleo-resina de copaíba.....	47
Tabela 5 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 28 dias de idade em função dos diferentes níveis de inclusão de óleo-resina de copaíba.....	48
Tabela 6 - Peso relativo dos órgãos linfóides de frangos de corte aos 35 dias de idade.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões onde o gênero <i>Copaifera</i> sp. é encontrado.....	26
Figura 2. Gel de poliacrilamida para verificação da concentração da amostra de <i>Escherichia coli</i> por meio da intercorrespondência com as concentrações decrescentes de soro albumina bovina (BSA).....	37
Figura 3 - Padronização do teste de ELISA indireto para avaliação da imunidade humoral utilizando concentrações de antígeno: 2,5µg/ml (vermelho); 5µg/ml (verde); 10µg/ml (azul); 15µg/ml (roxo) e nas diluições de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160.....	41
Figura 4. Níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de bile aos 28 dias de idade.....	50
Figura 5. Níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de bile aos 35 dias de idade.....	52
Figura 6. Comparação entre os níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de bile aos 28 e 35 dias de idade.....	53
Figura 7. Níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de secreção lacrimal aos 28 dias de idade.....	55
Figura 8. Níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de secreção lacrimal aos 35 dias de idade.....	56
Figura 9. Comparação entre os níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de secreção lacrimal aos 28 e 35 dias de idade.....	57
Figura 10. Níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de soro aos 28 dias de idade.....	58
Figura 11. Níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de soro aos 35 dias de idade.....	59
Figura 12. Comparação entre os níveis de imunoglobulinas isotipo IgA nas amostras de soro aos 28 e 35 dias de idade.....	60
Figura 13. Espessura (mm) dos espaços interdigitais após oito horas de aplicação da fitohemaglutinina em comparação ao momento anterior a inoculação.....	61
Figura 14. Espessura (mm) dos espaços interdigitais após 24 horas de	

aplicação da fitohemaglutinina em comparação ao momento anterior a inoculação.....	61
--	----

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do óleo-resina da planta *Copaifera sp.* como aditivo fitogênico sobre os parâmetros de desempenho e como agente imunomodulador. Foram utilizados 500 pintos de corte machos Cobb500, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2, composto por 10 tratamentos e cinco repetições com 10 aves por unidade experimental. Os tratamentos foram divididos em animais desafiados e não desafiados para todos os tratamentos: grupo controle com e sem desafio, grupo com nível de inclusão de óleo-resina de

0.2% com e sem desafio, grupo com nível de inclusão de óleo-resina de copaíba 0.4% com e sem desafio, grupo com nível de inclusão de óleo-resina de copaíba 0.6% com e sem desafio, grupo com promotor de crescimento colistina com e sem desafio. O desafio microbiano foi fornecido as aves aos quatro dias de idade e aos 22 dias de idade contendo $4,5 \times 10^9$ UFC/mL. O peso final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar foram mensurados semanalmente até os 28 dias de idade das aves. Foi realizado a padronização de um teste de ELISA indireto para pesquisa de imunoglobulinas da classe IgA e avaliação da imunidade celular por meio de teste de reação a fitohemaglutinina e ao peso relativo dos órgãos linfóides. Os dados de desempenho foram analisados por meio do teste de ANOVA e Turkey a 5% de probabilidade. Para avaliação estatística para os dados imunológicos foi utilizado teste múltiplos não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguidos de teste T para comparação entre os diferentes grupos. Os resultados demonstraram que a inclusão de diferentes níveis de óleo-resina de copaíba na dieta de frangos de corte apresentaram efeito semelhante ao promotor de crescimento antibiótico e apresentou efeito aditivo nos níveis de anticorpos ao final do período experimental no nível de 0.2% de óleo-resina.

Palavras-chaves: Avicultura de corte, *Copaifera sp.*, nutrição, óleo-resina, resposta imune.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of oil-resin from the plant *Copaifera* sp. as phytogetic additive on broiler performance and as immunomodulatory agent. Five hundred broiler chicks were used (Cobb500 males), distributed in a randomized design experiment in factorial 5 x 2, composed of 10 treatments and five replications with 10 birds per pen. The treatments were divided in animals challenged and not challenged for all treatments: control group with and without challenge, oil-resin from copaiba 0.2%, group oilresin from copaiba 0.4%, group of oil-resin from copaiba 0.6 and group with growth promoter colistin. The challenge with pathogenic *E. coli* (4.5×10^9 UFCmL) was realized at the age of four and 22 days old. The final weight, weight gain, feed intake and feed conversion were measured at weekly intervals until the age of 28 days. A in house indirect ELISA was standardized and immunoglobulin class IgA was evaluated. The cellular immunity was measured through skyn reaction test to phytohemagglutinin and analyzing the relative weight of the lymphoid organs. Performance data were analyzed through ANOVA and Turkey test with 5% of probability. For statistical evaluation of immunological data it was used multiple test non-parametric test, Kruskall-Wallis followed by T teste. The results showed that the inclusion of different levels of oil-resin from copaiba in broiler diet had similar performance when compared to the inclusion of antibiotic growth promoter. However it was observed an additive effect on antibody levels at the end of the trial period when oil-resin 0.2% was used.

Key words: Broiler production, *Copaifera* sp., immune response, nutrition, oilresin

1. INTRODUÇÃO

Os avanços na produção avícola devem-se principalmente ao aperfeiçoamento e as melhorias no controle sanitário que permitem ao Brasil tornar-se um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo. Para evitar problemas sanitários e mortalidade, a produção avícola faz-se a utilização de antimicrobianos melhoradores de desempenho (AMD) com a finalidade de aumentar a eficiência produtiva e os resultados zootécnicos (ALBUQUERQUE, 2005).

Não há dúvidas que a utilização destes antibióticos contribuiu de maneira acentuada na prevenção de doenças humanas e a sua utilização de maneira profilática é bem documentada na nutrição de aves de produção (BRENES & ROURA, 2010).

Contudo, os países importadores, principalmente o mercado europeu, utilizando-se do “princípio de precaução” baniram a utilização destes antimicrobianos devido a possibilidade de deixarem resíduos em produtos de origem animal e promoverem a seleção de bactérias resistentes, que poderiam causar danos a saúde humana (ALBUQUERQUE, 2005). Desta maneira, a União Europeia proibiu totalmente, no ano de 2006, a utilização de vários antimicrobianos na alimentação animal (MENDES, 2005).

O risco em potencial para a saúde pública promoveu a busca por estratégias alternativas que possam manter os ganhos zootécnicos (SANTURIO et al., 2007) e que resultem em um estímulo da resposta imune tornam-se ferramentas interessantes na produção animal (HASHEMI & DAVOODI, 2012).

A necessidade de se estabelecer alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento ideais para a otimização da produção faz com que a pesquisa de fitogênicos substitutos melhoradores de desempenho sejam amplamente intensificadas atualmente (SCHEUERMANN et al., 2009, TAHERI et al., 2005).

O bioma cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e é considerado como grande fornecedor de diversidade biológica. A preocupação de alguns pesquisadores com o potencial dessa diversidade

tem atualmente impulsionado a avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais do cerrado e de alguns de seus compostos (CARNEIRO, 2009).

Muito do conhecimento destas plantas dos biomas brasileiros são fornecidos pelas populações locais que utilizam essas plantas como fármacos naturais no tratamento de diversas doenças. A partir desta utilização muitos desses estudos comprovam a eficácia das propriedades de várias espécies vegetais estudadas (FERNANDES, et al., 2005).

Desse modo, como o sucesso na produção avícola depende da sanidade, deve-se buscar melhores resultados quanto ao funcionamento do sistema imune das aves, pois este é um indicador de impactos positivos e negativos na produção animal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Sistema imunológico das aves

O sistema imunológico das aves possui mecanismos semelhantes ao dos mamíferos, mas existem algumas diferenças importantes quanto a anatomia e a diferenciação dos órgãos linfóides (JEURISSEN et al., 1994). As aves diferem dos mamíferos quanto a precocidade na formação e maturação dos órgãos linfóides (CARON, 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células hematopoiéticas embrionárias imaturas migram do saco embrionário para a corrente sanguínea do embrião e deste para o baço, onde irão formar os glóbulos vermelhos e brancos. À partir disto, colonizam os órgãos primários (bursa e timo) por meio de fatores quimiotáticos que atraem as células e permitem a colonização destes órgãos por volta do sexto dia de incubação para o timo e na bursa, por volta do décimo dia de incubação (OLÁH & VERVELDE, 2008) até a terceira semana após a eclosão quando ocorre a maturação dos órgãos primários e secundários (JUUL-MADSEN, 2008)

Assim como classificado em outras espécies, pode-se definir a estrutura do sistema imune das aves em dois: sistema linfóide primário (bursa de Fabrícus e Timo) e sistema linfóide secundário (baço e tecidos linfóides associados a mucosas: glândula de Harder, intestino, brônquios, placas de Peyer, divertículo de Meckel, tonsilas cecais e pineal) (OLÁH & VERVELDE, 2008).

O bursa de Fabricius e o timo são considerados órgãos linfóides primários, mas são distintos quanto a sua morfologia e função (COOPER et al., 1965). São responsáveis pelo desenvolvimento e diferenciação de linfócitos B e T, respectivamente (COOPER et al., 1966). As aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) não apresentam linfonodos propriamente ditos (GLICK, 1995).

Os tecidos linfóides secundários ou periféricos como o baço e o sistema imunológico associado às mucosas (presentes nas superfícies das mucosas dos tratos respiratórios e gastrointestinais) ao contrário dos tecidos linfóides primários, não são locais de diferenciação e proliferação de linfócitos

(OLÁH & VERVELDE, 2008) mas são os responsáveis pela resposta aos antígenos (ABBAS, 2008). Nas aves, é encontrada uma concentração de tecido linfóide na região óculo nasal denominada glândula de Harder. Os linfócitos B presentes na glândula de Harder são bursa-dependente e migram para a glândula antes da eclosão (JALKANEN et al., 1983).

A bursa de Fabricius foi descrita pela primeira vez no final do século XVII e é um órgão exclusivo das aves. É um órgão localizado entre a cloaca e o osso sacro e alcança seu tamanho máximo por volta de 8 a 10 semanas de idade e a partir disso, assim como o timo sofre involução (CIRIACO, et al., 2003).

O timo apresenta-se como um órgão lobulado, na forma de dois cordões de sete a 8 lobos cada, dispostos paralelamente aos longo da veia jugular e nervo vago (OLÁH & VERVELDE, 2008).

Didaticamente a resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa (JEURISSEN et al., 2002). A principal diferença entre elas são os componentes celulares que as compõem: macrófagos, células polimorfonucleares como os heterófilos, trombócitos e células NK e as citocinas derivadas dos macrófagos representam a imunidade inata (JEURISSEN et al., 2002; ABBAS 2008; JUUL-MADSEN, et al. 2008) e a imunidade adaptativa envolve principalmente linfócitos T e B e as citocinas produzidas por estas células (ABBAS, 2008).

A imunidade inata é a primeira resposta a invasão e quebra da homeostasia por patógenos e esta é crucial na limitação da multiplicação destes microrganismos e na ativação da imunidade adaptativa em caso de persistência destes agentes (KAISER, 2012).

Embora, por diversas vezes, a resposta imune inata seja suficiente para debelar a invasão das barreiras naturais, em outras ocasiões a resposta imune adaptativa é requerida quando há persistência dos patógenos, resultando em células que irão promover a memória imunológica (JEURISSEN et al., 2002).

A resposta imune adaptativa pode ser humoral (com produção de anticorpos) e resposta imune celular (realizada pelos linfócitos T) e ambas atuam conjuntamente nas respostas à invasão microbiana (HOLT et al., 2005; JEURISSEN et al., 2002).

A resposta imune humoral, representada pela produção de linfócitos B, sintetizam anticorpos específicos, denominados também de imunoglobulinas. A resposta imune celular, representada pelos linfócitos T, regulam a síntese de anticorpos, bem como a atividade das células natural killer e a resposta inflamatória de hipersensibilidade do tipo tardia (HASHEMI & DAVOODI, 2012).

As imunoglobulinas são essenciais na eliminação de patógenos. São representadas como receptores de membrana do linfócito B ou são secretadas na circulação e superfícies mucosas (ROITT, 1993).

Existem três isotipos de imunoglobulinas que são produzidos pelas aves: imunoglobulinas A (IgA), imunoglobulinas M (IgM) e imunoglobulinas Y (IgY).

A imunoglobulina IgA é o principal anticorpo presente nas mucosas e IgY corresponde a 75% do total de imunoglobulinas no soro. A imunoglobulina Y (referente a “yolk”) corresponde a IgG dos mamíferos. São estruturalmente diferentes da IgG de mamíferos, porém evolucionariamente possuem características de IgG e IgE (TIZZARD, 2009).

As superfícies mucosas são importante porta de entrada para diversos patógenos (ŚMIATEK, 2011) e a proteção das superfícies mucosas pela IgA evita a aderência de bactérias no epitélio, prevenindo desta maneira, o desenvolvimento de doenças (TIZZARD, 2009).

Nas aves, mais de 75% da imunoglobulina IgA que é produzida migra para a circulação e pode ser transportada para o fígado e lançada no canículo biliar. Desta maneira, a bile é a principal via pela qual a IgA atinge o intestino nesta espécie (TIZZARD, 2009).

A diversidade e a quantidade de imunoglobulinas são importantes fatores na resistência ou na susceptibilidade a patógenos e a capacidade de produzir maiores quantidades de anticorpos são frequentemente correlacionados com uma melhor imunocompetência (BUTLER, 1998).

Desta maneira, a avaliação da imunidade humoral se baseia na análise da capacidade da ave em estabelecer uma resposta imunológica através de níveis de anticorpos no soro ou à sua presença nas mucosas (QURESHI, 1998).

Avaliar o estado imunológico das aves, principalmente das aves de produção são considerados tema central para encontrar soluções para o controle das doenças em frangos de corte e manutenção da saúde animal.

Nas últimas duas décadas a produção mundial de carne de aves cresceu mais de 33% e a expectativa é que este crescimento supere o consumo de carne de suínos em até 10 anos (KAISER, 2012), tornando essencial o controle de patógenos nos plantéis avícolas.

2.2. Aditivos fitogênicos

A utilização de promotores de crescimento na indústria avícola é uma prática frequente que proporciona melhorias de desempenho produtivo (TRAESSEL et al., 2011).

No Brasil, a utilização dos antimicrobianos melhoradores de desempenho são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e também seguem as normas do Codex Alimentarius. Os aditivos autorizados para serem utilizados como promotores de crescimento de frangos de corte são: avilamicina, colistina, flavomicina, lincomicina, tilosina, virginiamicina, bacitracina, espiramicina e enramicina (PALERMO, 2006).

Os produtos proibidos como aditivos de ração incluem: tetraciclina, penicilinas, clorafenicol, sulfonamidas sistêmicas, furazolidona, nitrofurazona e avorpacina (NUNES, 2008).

Entretanto, os constantes desafios impostos pelas doenças infecciosas, resultado da evolução dos patógenos na produção de frangos de corte (OZAKI, et al., 2011) resulta em mudanças nas legislações e consequentemente na percepção do mercado consumidor para determinado produto (KAISER, 2012).

Com a restrição ou a proibição de agentes antimicrobianos alimentares utilizados na produção animal, tornou-se necessário explorar novas maneiras de melhorar e proteger o estado de saúde dos animais, para promover a saúde e o desempenho animal (WENK, 2002).

Neste sentido, observa-se um avanço nas pesquisas que visam substituir os antimicrobianos melhoradores de desempenho (AMDs), principalmente por meio do uso de produtos alternativos viáveis (ALBUQUERQUE, 2005) oriundos de plantas como: óleos essenciais (TOLEDO et al., 2007) e extratos vegetais (FUKAYAMA et al., 2005) que tem demonstrado apresentar ação antimicrobiana, antioxidante e que promovem melhorias no desempenho e resposta imune animal (BRUGALLI, 2003; MELLOR, 2000).

As propriedades das plantas medicinais tem sido observadas desde a antiguidade (COSTA et al., 2007) e a primeira avaliação da utilização de extratos de plantas com atividade antibacteriana data de 1881 (RIZZO et al., 2008).

Embora, praticamente pouco explorada, essa alternativa tem recebido maior atenção na última década devido ao crescimento constante dos produtos fitofarmacêuticos comercializados, com estimativas comerciais de 124 bilhões de dólares em 1995 (HASHEMI & DAVOODI, 2011). O mercado para melhoradores de desempenho à base de plantas tem aumentado desde a década de 1990, com vendas de óleos essenciais para a UE que chegou a 90 toneladas em 1996 enquanto dez anos mais tarde teve um aumento expressivo de 600 toneladas (GREATHEAD, 2003).

Para compreender a justificativa da utilização destas plantas é necessário conhecer os componentes químicos produzidos por estas como parte do seu metabolismo. Os metabólitos primários (como a produção de açúcares e lipídios, por exemplo) são encontrados em todas as plantas, enquanto que os metabólitos secundários, que são componentes de defesa das plantas, são encontrados em alguns gêneros ou espécies (HASHEMI & DAVOODI, 2011).

Este tipo de resposta de defesa é devido à presença de uma variedade de compostos orgânicos que parecem não ter nenhuma função direta no crescimento e desenvolvimento da planta. Isto é evidenciado porque não se encontra nenhuma relação dos metabólitos secundários nas funções no processo de fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, assimilação de nutriente, diferenciação ou a formação de carboidratos, proteínas e lipídios. (HASHEMI & DAVOODI, 2012).

Estas moléculas oriundas do metabolismo secundário (princípios ativos) apresentam estruturas químicas diferentes e modos de ação diferentes que conferem características e efeitos biológicos diferenciados: efeitos anticarcinogênicos, antiinflamatório, antioxidante (WISEMAN et al., 1997) e imunoestimulante (GUO et al., 2004).

Recentemente, tem se demonstrado que muitos destes metabólitos secundários apresentam propriedades imuno-modulatórias em animais (HASHEMI & DAVOODI, 2011) e no Brasil, a diversidade de plantas encontradas são uma fonte em potencial para obtenção de novas moléculas (MELO et al., 2011).

Dentre os princípios ativos responsáveis por estas diferentes propriedades estão: saponinas, taninos, flavonóides, mucilagens, glucosídeos, alcalóides (alcoóis, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e lactonas); compostos fenólicos e polifenólicos (responsáveis pelas propriedades antibacterianas - quinonas, flavonas, taninos e cumarinas); substâncias sulfurosas; terpenos (divididos em monoterpenos: carvacrol, timol, mentol; sesquiterpenos e diterpenos, triterpenos e esteróides), saponinas, mucilagens e óleos essenciais (MARTINS et al., 2000; WENDLER, 2006). Estes compostos químicos estão diretamente relacionados com suas propriedades biológicas (HASHEMI & DAVOODI, 2011).

A formação destas substâncias de baixo peso molecular é influenciada por características do ambiente: tipo de solo, estação do ano (incidência de raios ultra violeta) e ciclo vegetativo da planta (FALEIRO et al., 2003). São produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa contra predadores e patógenos, estresse fisiológico e fatores ambientais (HUYGHEBAERT, 2003).

Evidências, sugerem que os princípios ativos dos extratos de plantas e óleos essenciais são absorvidos no intestino e rapidamente metabolizados pelos enterócitos (KOHLETT et al., 2000), biotransformados no fígado e posteriormente excretados pela urina e respiração (BHAT & CHANDRASEKHARA, 1986).

O principal benefício da utilização destes aditivos fitogênicos na alimentação animal envolve os impactos positivos que causam na saúde

animal: ação antimicrobiana e controle de microrganismos patogênicos, diminuição na produção de amônia, atividade antioxidante, maior produção de muco no intestino e melhora da capacidade digestiva (WINDISCH et al., 2007; HASHEMI & DAVOODI, 2011; BRUGALLI, 2003; DORMAN & DEANS, 2000).

As pesquisas atuais apontam resultados diferentes quanto a ação destes fitogênicos no crescimento e na saúde animal. Algumas destas, apontam resultados significativos quanto a inclusão dos aditivos fitogênicos no desempenho em frangos de corte (ERTAS et al., 2005; CROSS et al., 2007; PERIC et al., 2008) enquanto em outras pesquisas estes mesmos efeitos não foram observados (OCAK et al, 2008; KOIYAMA, 2012).

A aplicação prática e inclusão destes óleos na alimentação animal depende de diversos fatores como a espécie animal, a idade e o propósito da produção (LANGHOUT, 2005).

A utilização de plantas e de seus metabólitos secundários tem efeito bactericida e bacteriostático dose-dependente sobre os microrganismos (bactérias, vírus, fungos e protozoários) principalmente em estudos *in vitro* (SMITH-PALMER, 1998). De acordo com BRUGALLI (2003) a inclusão de doses elevadas de aditivos fitogênicos devem ser realizadas para obter os mesmos efeitos observados *in vitro*.

Estudos realizados *in vitro* sugerem que concentrações acima de 1% devem ser utilizadas contra bactérias gram-negativas, para que se obtenha uma ação inibitória contra estas bactérias em comparação com as bactérias gram-positivas que requerem menores concentrações (SMITH-PALMER, 1998).

Uma possível explicação para estas diferenças encontradas são atribuídas a parte da planta utilizada (óleo, folha, raiz) método de extração e compatibilidade com outros componentes da ração (YANG et al., 2009). Além disso, bactérias gram-negativas apresentam a membrana externa que funciona como uma barreira hidrofílica a passagem dos óleos (DORMAN & DEANS, 2000).

Desta forma, é essencial a estudar as interações entre patógenos e hospedeiros com relação a imunologia aviária, para que se possa manter e

melhorar a saúde das aves e obter soluções sustentáveis e economicamente viáveis para o futuro da produção avícola (KAISER, 2012).

2.3. Atividade imunomodulatória dos aditivos fitogênicos

A garantia do controle de doenças e a manutenção da função do sistema imune para obtenção de um desempenho zootécnico ótimo são requisitos fundamentais na produção avícola (AKHTAR et al., 2012). Com a restrição ou a proibição de agentes antimicrobianos alimentares utilizados na produção animal, tornou-se necessário explorar novas maneiras de melhorar e proteger o estado de saúde dos animais, para garantir a saúde e o desempenho animal (WENK, 2002).

Na produção avícola, os estudos se concentraram em melhorar a performance de crescimento e estas mudanças demonstram uma correlação negativa quando associadas aos parâmetros imunológicos (EMMERSON, 1997). Para prevenir as doenças infecciosas e minimizar o impacto da imunossupressão é essencial promover uma melhoria na resposta imune como estratégia na criação de aves comerciais (HASHEMI & DAVOODI, 2012).

Com relação a isto, na última década a procura por agentes imunoestimulantes que exercem uma atividade na resposta imune tem recebido maior atenção pela comunidade científica (HASHEMI & DAVOODI, 2012; KUMAR et al., 2011) e a utilização de compostos tornou-se foco como alternativa para a diminuição às doenças infecciosas e melhoria na imunidade dos animais (LIU, 1999).

Para diferenciar dos produtos utilizados como terapêuticos, a utilização destas plantas ou de seus produtos na alimentação dos animais foi definida como aditivos fitogênicos (SARTORI et al., 2009; WINDISCH & KROISMAYR, 2006).

A imunomodulação é conceituada como uma modificação da resposta imune por meio de agentes estimulantes ou supressores (HASHEMI & DAVOODI, 2012; PUNTUREE et al., 2004). Quando estimulada, resulta em aumento das respostas do sistema imune inato e do sistema imune adquirido,

incluindo aqui a resposta das imunoglobulinas e órgãos linfóides primários e secundários. Em contrapartida, a imunossupressão, resulta na diminuição da resposta imune e conseqüentemente na redução a agentes estressores, fatores ambientais e doenças infecciosas (MAKARE et al., 2001).

Dessa forma, diferentes atividades biológicas relacionadas as substâncias oriundas de plantas como óleos, saponinas, peptídeos, lectinas e polissacarídeos podem ser capazes de modular a resposta imune (SILVA, 2009).

Um dos principais mecanismos pelos quais os aditivos fitogênicos exercem efeitos úteis no desempenho dos animais e na saúde é por meio de propriedades imunoestimulatórias (YANG et al., 2009, HASEHMI & DAVOODI, 2010, 2011) indicando que os metabólitos secundários oriundos destas plantas sejam responsáveis por este efeito benéfico (HASHEMI et al., 2008). Supostamente, o mecanismo de ação destes "modificadores da resposta biológica" são complexos, mas parte de sua atividade pode ser por efeito direto sobre as células imunológicas (PELLISSARI, 2008).

Estudos com *Ganoderma lucidum* (cogumelo asiático), na menor dose utilizada (2mg/kg) resultou no reestabelecimento da imunossupressão causada pela ciclofosfamida, promovendo um efeito significativo na proliferação de linfócitos T e B (XIAO-LING ZHU et al., 2007).

SILVA & PARENTE (2001), verificaram que um polissacarídeo proveniente do Babaçu (*Orbignya phalerata*) apresentou atividade imunomodulatória na dose de 100 mg/kg por meio do aumento da atividade fagocítica em camundongos BALB/c.

Entretanto, estudos com extrato acetato de *Cocos nucifera* LINN. apresentou efeito imunossupressor na produção de anticorpos, mas não alterou a resposta celular em estudo com camundongos (SILVA, 2009).

Estudos com frações do óleo-resina de copaíba (*C. multijuga*) utilizando doses entre 100 e 200 mg/kg demonstraram que a copaíba exibiu efeito de inibição do tumor de Erlich em camundongos (GOMES et al., 2008), enquanto LIMA et al. (2003), verificaram a redução no crescimento de melanoma em camundongos.

Em estudo realizado com xiloglucanas, um polissacarídeo de *Copaifera langsdorffii*, foi verificado aumento do número de macrófagos

peritoneais de camundongos, maior produção de óxido nítrico (262%) comparado ao grupo controle (ROSÁRIO et al., 2008) e maior produção de interleucina 1- β e fator de necrose tumoral- α (ROSÁRIO et al., 2011).

Recentemente, diversos estudos descreveram os efeitos dos metabólitos secundários sobre a imunidade animal. Em revisão apresentada por HASHEMI & DAVOODI (2012), a atividade sobre a resposta imunológica foi demonstrada pela plantas: *Aloe vera*, *Angelica gigas*, *Astragalus membranaceus*, *Gonoderma lucidum*, *Panax ginseng* e *Zingiber officinale* foi demonstrada principalmente no que refere-se a estimulação e modulação de diferentes interleucinas e também na ativação de linfócitos, macrófagos e células natural killer.

Verifica-se, portanto, um interesse em explorar os efeitos destas plantas para frangos de corte em razão do potencial imunomodulatório descritos na literatura científica.

2.4. Óleo de Copaíba

As árvores do gênero *Copaifera* sp. (família Fabaceae, sub-família Caesalpinoideae) são árvores nativas da América Latina e África Ocidental (Figura 1) (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

São árvores que podem viver até 400 anos e atingir de 25 a 40 metros de altura (PIERI et al., 2009). Este gênero é representado por 72 espécies descritas, sendo que 16 destas são endêmicas no Brasil. Entre as espécies as mais comumente pesquisadas incluem: *C. langsdorfii*, *C. multijuga* Hayne, *C. martii*, *C. cearensis*, *C. paupera*, *C. officinalis*, *C. lucens* e *C. reticulata* (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

A origem tupi do nome Kupa'iwa e Kupa'u, que significa "árvore de depósito", fornece o conhecimento sobre a extração do bálsamo obtido do tronco destas árvores, denominado óleo-resina (PLOWDEN, 2004; VEIGA JR et al., 1997). Popularmente são denominadas como: copaíba, pau-de-óleo, copaíba-vermelha, oleiro, copaíba-da-varzea, copaúba, cupiúva, podoi e óleo-vermelho. É encontrada no Brasil na região amazônia, região sul, centro-oeste e nordeste. (VEIGA JR. & PINTO, 2002).



Figura 1 - Regiões onde o gênero *Copaifera* sp. é encontrado (VEIGA Jr & PINTO, 2002).

O óleo-resina é um líquido viscoso e transparente de coloração variada. Os principais constituintes descritos deste óleo são sesquiterpenos e diterpenos. Destes dois constituintes, os sesquiterpenos são apresentados com mais de 90% da composição do óleo. Devido a isto, muitas das propriedades biológicas apresentadas são atribuídas aos sesquiterpenos (LEANDRO et al., 2012).

Apesar da maioria dos efeitos serem atribuídos a esta substância, deve-se considerar que pode ocorrer uma interação sinérgica entre os demais constituintes do óleo e que são também responsáveis pelas atividades observadas (LEANDRO et al., 2012).

Em torno de 38 sesquiterpenos foram identificados. Dentre os sesquiterpenos descritos no óleo alguns apresentam-se em maiores quantidades: β -cariofileno, óxido cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, α -cadinol. A fração de sesquiterpenos também é responsável pelo aroma do óleo de copaíba (LEANDRO et al., 2012).

Historicamente o conhecimento do óleo de copaíba é descrita desde o século XVI, quando os colonizadores europeus chegaram ao Brasil (VEIGA Jr & PINTO, 2002). Em 1534, foi descrita pela primeira vez, a utilização deste óleo pelo papa Léo X (PLOWDEN, 2004) e em 1560 pelo padre jesuíta José de Anchieta, que mencionou sobre a ação cicatrizante do óleo de copaíba (PIERI et al., 2009).

Estudos químicos com o óleo-resina iniciaram-se em 1829, quando Schweitzer descreveu uma substância sólida e cristalizada, que denominou de ácido copaívico (VEIGA Jr & PINTO, 2002).

Economicamente e socialmente importante, principalmente na região amazônica, movimentou no ano de 2008, 514 toneladas de óleo de copaíba e cerca de R\$ 3,7 milhões de reais na economia Brasileira (PIERI et al., 2009).

O conhecimento popular desta planta, permitiu a divulgação de suas propriedades medicinais (LEANDRO et al., 2012). Dentre as propriedades medicinais atribuídas a copaíba foram estudadas: atividade antimicrobiana (PIERI et al., 2012), inibidor tumoral em cobaias (OHSAKI et al., 1994), analgésica (FERNANDES et al., 1992), antiinflamatória (PIERI et al., 2009), repelente de insetos (RIBAS & CARRENÕ, 2010). Também possui aplicações como componente de tintas e vernizes, perfumes e cosméticos (AZEREDO & SAMPAIO, 2010; VEIGA Jr. & PINTO, 2002).

Uma revisão de estudos com diferentes espécies de *Copaifera sp.*, realizada por LEANDRO et al. (2012), demonstra que o óleo apresenta propriedade diversas, que está diretamente relacionado com a espécie estudada. Entre estas propriedades relatadas neste estudo, verifica-se que o óleo-resina apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-leishmania, antiproliferativa, anti-mutagênica, analgésica, efeito de proteção gástrica, inibição tumoral, antinociceptiva, inseticida e cicatrizante.

Algumas patentes nacionais relacionadas ao óleo de copaíba foram descritas com fins terapêuticos (GEROLANO & GIMENEZ, 1988; HARGER, 2002;), assim como patentes internacionais relacionadas a produtos cosméticos e de perfumaria (KAO CORPORATION em 2002; KOSE CORPORATION em 2001, LION CORPORATION em 2000, AVEDA CORPORATION em 2000 e SHISEIDO CO, 1996) e outras referem-se a produtos repelentes e sanitários (HAYASE, et al., 2004; HAYASE, et al., 2002; RIFUSE:KK et al., 2001).

Grande parte dos estudos que utilizam óleo-resina de copaíba não identificam as espécies que os originaram. Estes óleos são obtidos comercialmente das regiões das quais são extraídos (LEANDRO et al., 2012).

São frequentes os estudos com este óleo na avaliação da atividade antimicrobiana, incluindo estudos com bactérias gram-positivas e gram negativas. Em relação a esta atividade, alguns estudos são

controversos: A avaliação do óleo-resina de copaíba (*C. multijuga*) demonstrou efeitos sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MENDONÇA & ONOFRE, 2009). Entretanto, PACHECO et al. (2006) utilizando estudos com *Copaifera spp.* não observaram a atividade para bactéria gram-negativas. Isto pode ser atribuído as diferentes composições do óleo, bem como da possibilidade de diferentes perfis de resistência ou susceptibilidade bacteriana (PIERI, et al., 2012).

Duas espécies de copaíba (*C. langsdorffii* e *C. officinalis*) foram testadas contra 27 isolados de *Escherichia coli* provenientes de mastite. A *C. langsdorffii* inibiu o crescimento bacteriano de 8 espécies de *E. coli* e a *C. officinalis* inibiu 7 isolados. O estudo sugeriu que estes óleos podem ser utilizados como fontes em potencial para o tratamento da mastite (PIERI et al., 2011).

Os estudos de atividade antimicrobiana também contemplam avaliação da atividade anti-fúngica contra *Aspergillus sp.* e *Candida sp.* comparados ao anti-fúngico Miconazol (DEUS et al., 2009; Deus et al., 2011).

Estes resultados demonstram que o óleo-resina possui atividade antimicrobiana sobre diferentes microrganismos, devendo ainda elucidar quais compostos presentes na sua composição são responsáveis por esta propriedade.

A atividade anti-carcinogênica de diferentes espécies de *Copaifera spp.* tem sido estudada utilizando diferentes técnicas e modelos experimentais (LEANDRO, et al., 2012). Utilizando as frações hexânica (CFCH-H) e clorofórmica (CFCH-C) do óleo-resina de *C. multijuga*, GOMES et al., (2008), demonstraram efeito inibitório sobre o tumor de Erlich em camundongos.

LIMA et al., (2003), demonstraram a redução de metástases e diminuição de crescimento de melanoma em camundongos tratados com óleo-resina de *Copaifera multijuga* na dose de 2g/kg. Estes autores verificaram também que a incubação em diferentes doses (0,5 e 1 mg/mL) deste óleo reduziu o número de células viáveis tumorais.

Pesquisa realizada com *Copaifera officinalis* verificou que o óleo estimulou o crescimento de tumor de Walker 256 (BRITO et al., 2010).

Muitas das atividades biológicas do óleo-resina de copaíba são atribuídas ao β -cariofileno que tem relatado propriedades biológicas diferentes: antimicrobiana (GOREN et al., 2011) e anti-carcinogênica (ZHENG et al., 1992; KUBO et al., 1996; LEGAULT et al., 2007 SILVA et al., 2007; DI SOTTO et al., 2010).

Estes sesquiterpenos, produtos do metabolismo secundário das plantas são encontrados também em outras espécies de plantas: *Cinnamom osmophloeum*, *Annona squamosa* L. bark, *Cordia verbenacea* (TUNG et al., 2008; CHAVAN et al., 2010; PARISOTTO et al., 2011).

A atividade antimicrobiana deste componente foi demonstrado com diversas bactérias: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* (GOREN et al., 2011) e a atividade anti-tumoral deste composto foi verificada em plantas da espécie *Zanthoxylum rhoifolium* (mamica-de-porca), também encontrada na região do cerrado, apresentou atividade antiproliferativa sobre o tumor de Erlich, responsável por promover alterações na resposta imune (SILVA et al., 2007).

Entretanto, poucos são os trabalhos que estudam os efeitos do óleo-resina de copaíba na produção de frangos de corte e nenhum estudo sobre a atividade imunomodulatória foi descrito nestas aves. Desta maneira, justifica-se a importância de se verificar a atividade deste óleo como aditivo promotor de crescimento e como ativador do sistema imunológico, com resultado sobre a saúde animal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial da utilização de óleo-resina de copaíba como melhorador de desempenho e sua influência sobre a imunidade humoral *in vivo* e imunidade celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

O protocolo experimental envolvendo a utilização de animais de experimentação nesta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob nº de protocolo 048/12 CEUA-UFG.

4.2 Alojamento das aves

As aves desafiadas e aves não desafiadas foram alojadas em salas isoladas que foram previamente desinfetadas. Os animais foram mantidos em baterias de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros lineares e bandejas para coleta de excretas. Para o aquecimento das baterias foram utilizadas lâmpadas incandescentes de 60 W até o sétimo dia de idade. A avaliação do desempenho zootécnico quanto ao peso final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar foram avaliados aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade.

4.3 Delineamento experimental

Foram utilizados 500 frangos de corte (machos) de um dia de idade, da linhagem Cobb 500, obtidos de incubatório comercial. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, distribuídos em 10 tratamentos e cinco repetições com 10 aves por unidade experimental em esquema fatorial 5 x 2. Os tratamentos foram dispostos da seguinte forma:

- Tratamento 1 (controle negativo): 50 frangos de um dia de idade, inoculados com *E.coli*, sem suplementação do fitogênico.

- Tratamento 2 (controle negativo): 50 frangos de um dia de idade, não inoculados com *E.coli*, sem suplementação do fitogênico.

- Tratamento 3: 50 frangos de um dia de idade, com nível de suplementação de óleo de copaíba de 0,2%, inoculados com *E.coli*.
- Tratamento 4: 50 frangos de um dia de idade, com nível de suplementação de óleo de copaíba de 0,2%, não inoculados com *E.coli*.
- Tratamento 5: 50 frangos de um dia de idade, com nível de suplementação de óleo de copaíba de 0,4%, inoculados com *E.coli*.
- Tratamento 6: 50 frangos de um dia de idade, com nível de suplementação de óleo de copaíba de 0,4%, não inoculados com *E.coli*.
- Tratamento 7: 50 frangos de um dia de idade, com nível de suplementação de óleo de copaíba de 0,6%, inoculados com *E.coli*.
- Tratamento 8: 50 frangos de um dia de idade, com nível de suplementação de óleo de copaíba de 0,6%, não inoculados com *E.coli*.
- Tratamento 9 (controle positivo): 50 frangos de um dia de idade, com antibiótico promotor de crescimento colistina (10 ppm), inoculados com *E.coli*.
- Tratamento 10 (controle positivo): 50 frangos de um dia de idade, com antibiótico promotor de crescimento colistina (10 ppm), não inoculados com *E.coli*.

4.4 Rações experimentais

Foi adotado um programa alimentar com 2 fases: inicial (1-14 dias) e crescimento (15 a 28 dias). As rações foram diferenciadas quanto ao nível de inclusão de óleo-resina de copaíba e ausentes de anticoccidianos e antibióticos, exceto os tratamentos controle negativo e controle positivo, que continham respectivamente, apenas a dieta basal sem qualquer aditivo fitogênico ou aditivo promotor de crescimento e os tratamentos nove e dez que receberam sulfato de colistina na dose recomendada pelo fabricante: 10 ppm em todas as fases.

Os níveis de inclusão de óleo-resina de copaíba realizados neste trabalho foram embasados em pesquisas realizadas com níveis crescentes de aditivos fitogênicos (NOBAKHT et al., 2012; ABDULKARIMI & ABDULLAHZADEH, 2011; GHAZALAH & ALI, 2008; JAFARI et al., 2008).

As exigências nutricionais utilizadas para a formulação das dietas foram baseadas nas recomendações das tabelas brasileiras para aves e suínos (ROSTAGNO et al., 2005). A dieta básica foi realizada com premix mineral e vitamínico sem a adição de promotor de crescimento nos tratamentos um a oito.

O óleo-resina de copaíba foi obtido comercialmente pela Faculdade de Farmácia da UFG no estado do Acre e este foi adicionado nas proporções de 0,2%, 0,4% e 0,6%, incorporado ao óleo vegetal, e em seguida homogeneizado aos demais ingredientes da ração.

Foi realizado o doseamento do sesquiterpeno, β -cariofileno, considerado como um dos marcadores do óleo-resina de copaíba pelo Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFG. A concentração apresentada pelo óleo-resina utilizado neste experimento foi de 21,31%.

A tabela 1 apresenta a composição percentual e nutricional das rações nas fases de criação.

4.5 Preparação do inóculo de *Escherichia coli* e infecção experimental

A cepa de *Escherichia coli* utilizada no desafio foi isolada de amostras de campo obtidas de coração de frangos de corte.

Realizou-se a preparação do inóculo 24 horas antes do início da inoculação para compor a “cultura mãe”. A semeadura de *Escherichia coli* foi realizada em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI), 24 horas antes de sua preparação, incubava-se por 18 horas em estufa a 37°C. Esta “cultura mãe” era utilizada para a preparação das diluições.

As diluições do inóculo foram realizadas por meio das linhas de diluições sucessivas, com fator logarítmico até a diluição 10^9 . No primeiro tubo contendo 9,5 mL de BHI (10^1 UFC/mL) adicionava-se 0,5 mL da cultura mãe e assim sucessivamente até o último tubo, com troca de ponteiras a cada passagem.

Tabela 1 - Composição centesimal e nutricional das dietas experimentais (g/kg)

Ingredientes	Ração inicial (%)	Ração crescimento (%)
Dieta basal		
Milho	58,60	62,76
Farelo de soja	36,23	32,7
Fosfato bicálcico	1,91	1,51
Óleo de soja	0,94	0,92
Calcário	0,81	0,85
Sal	0,44	0,42
Lisina	0,37	0,29
Metionina	0,36	0,29
Treonina	0,14	0,10
Suplemento Vitamínico ⁽¹⁾	0,10	0,10
Suplemento Mineral ⁽¹⁾	0,05	0,05
Aditivos		
Sulfato de colistina	0,001	0,001
Total	100	100

* Suplemento vitamínico e mineral para frangos de corte, níveis de garantia por quilograma de produto: 3.125.000 UI Vitamina A, 550.000 UI Vitamina D3, 3.750 mg Vitamina E, 625 mg Vitamina K3, 250 mg Vitamina B1, 1.125 mg Vitamina B2, 250 mg Vitamina B6, 3.750mg Vitamina B12, 9.500 mg Niacina, 3.750 mg Pantotenato de cálcio, 125 mg Ácido fólico, 350.000 mg DL- metionina, 150.000 mg Cloreto de colina 50%, 50 mg Selênio, 2.500 mg Antioxidante, 1.000 g Veículo q.s.p. **Suplemento mineral – Manganês 150.000mg, Zinco 100.000mg, Ferro 100.000mg, Cobre 16.000mg, Iodo 1.500mg.

Para uma estimativa aproximada da concentração, comparava-se a suspensão obtida pela suspensão preparada com os tubos de cloreto de bário por meio da escala Mac-Farland 0,5.

Para a contagem das unidades formadoras de colônia/mL dos inóculos, semeava-se 0,1mL do conteúdo dos tubos correspondentes as

respectivas diluições em superfície de placa de petri com ágar MaConckey. As placas eram inoculadas até 30 minutos após a padronização do inóculo para que a densidade celular não fosse alterada. Posteriormente, as placas eram incubadas a 37° C por 24 h e realizadas a contagem das colônias após este período.

As cepas de *E.coli* padronizadas na concentração de $4,5 \times 10^9$ UFC/mL foram inoculados na quantidade de 0,1 mL/ave nos tratamentos com aves desafiadas, via aerosol. Nas aves não inoculadas foi utilizada solução tampão fosfato salina (PBS) na mesma dose.

O método de inoculação aplicado neste estudo assemelha-se a rota de infecção natural e a utilização de repetidas exposições a *E.coli* mimetiza melhor a situação a campo em comparação a utilização de apenas uma dose. O primeiro desafio foi realizado no quarto dia de idade das aves e um segundo desafio foi realizado aos 22 dias de idade. A dose utilizada neste estudo foi adaptada do estudo realizado por Ginns et al., (1998).

4.6 Colheita de amostras

As amostras de secreção lacrimal foram colhidas por meio da estimulação da mucosa ocular com cloreto de sódio (GANAPATHY et al., 2005) em cada olho por cerca de 15 segundos, possibilitando o lacrimejamento e a colheita com uma micropipeta e ponteira de 200µL (AITKEN et al., 1975).

A coleta de sangue para verificação de anticorpos específicos para *E.coli* foi realizada por meio de punção da veia braquial, para obtenção do soro, sem EDTA aos 28 e 35 dias de idade. Os soros obtidos foram estocados em freezer a -20°C até a realização do teste de ELISA. Para estas amostras, foi realizada a padronização de teste de ELISA indireto.

A bile foi coletada após o sacrifício dos animais com seringa perfurando a vesícula biliar e coletando todo o conteúdo. Em seguida a bile foi centrifugada durante 10 minutos para retirada do conteúdo insolúvel e em seguida, foi coletado o sobrenadante. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a realização dos testes.

4.7 Determinação da concentração de *Escherichia coli* patogênica de aves para padronização do teste imuno-enzimático

Para a determinação da concentração de *E. coli*, duzentos mililitros de meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) foi colocado para crescimento durante 24 horas em estufa a 37°C. Após o crescimento a cultura foi centrifugada a 6000 rpm durante dez minutos e em seguida, foi ressuspensa em 15 mL de solução salina (PBS) 1x estéril. O sobrenadante foi desprezado o sedimento obtido foi ressuspensa em 1 mL de PBS estéril, totalizando 1,5 mL.

Para inativação da bactéria, o sedimento obtido na etapa anterior foi sonificado e colocado sobre fervura a 100°C durante 10 minutos e em seguida foi colocada em gelo durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido por sete vezes. Após este procedimento foi realizado teste de esterilidade do pellet inativado. Para isto, foi realizado o plaqueamento do pellet após a inativação em ágar MacConkey em duplicata.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 3 dias para verificação da ausência de crescimento bacteriano durante este período. A amostra foi armazenada a temperatura de -20 °C até a finalização do teste de esterilidade.

Após a verificação da ausência de crescimento bacteriano foi adicionado 10 µL de inibidor de protease em 1,5mL de amostra. Foram realizadas alíquotas de 100 µL cada e armazenadas em freezer a -80 °C para a realização dos ensaios.

Para determinação da concentração comparou-se a intensidade da banda (Figura 2) expressada como resultado do pellet obtido anteriormente com concentrações pré-estabelecidas de soro albumina bovina (BSA).

Concentrações decrescentes da amostra de *E.coli* foram colocadas no gel na seguinte proporção: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 e 1/32, conjuntamente com concentrações de BSA de 2 µg/mL; 1 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,25 µg/mL). Para a análise foi utilizada a técnica de eletroforese na qual as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida e em seguida reveladas com corante azul de comassie durante aproximadamente 1 hora e meia de incubação em

homogeinizador.

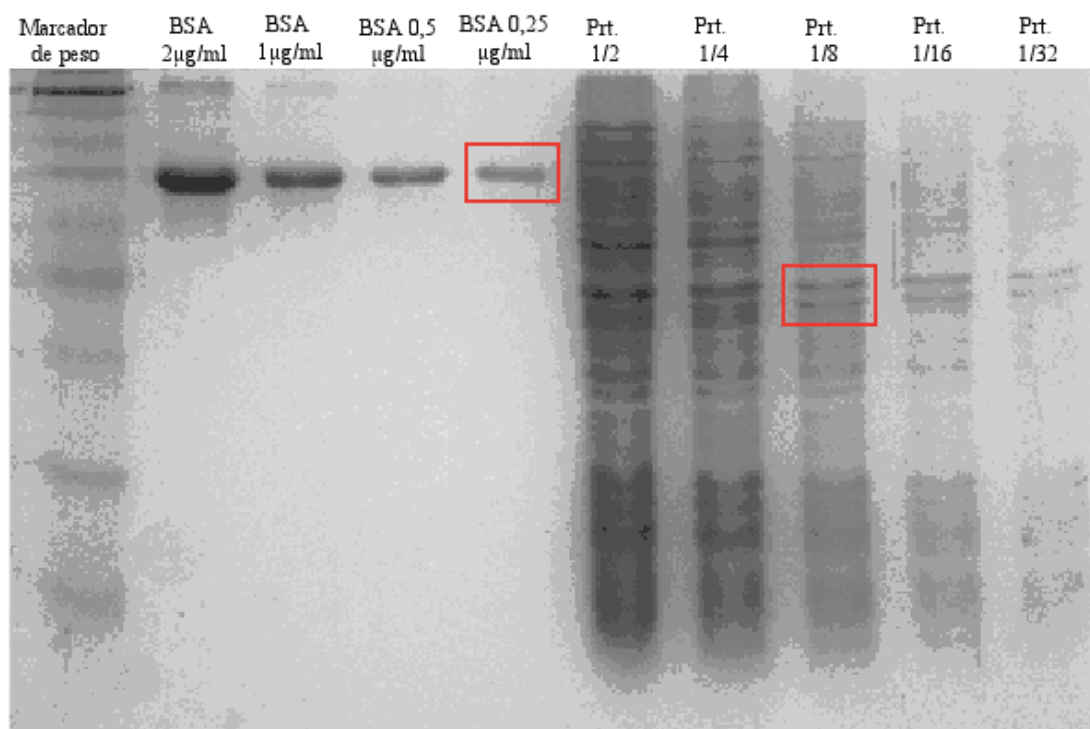


Figura 2 - Gel de poliacrilamida para verificação da concentração da amostra de *Escherichia coli* por meio da intercorrespondência com as concentrações decrescentes de soro albumina bovina (BSA).

Por meio da correspondência de intensidade entre uma banda definida do sedimento e a concentração de soro albumina bovina (BSA) determinou-se que a concentração do antígeno foi de 0,3 mg/ml.

4.8 Ensaio imuno-enzimático indireto para quantificação de imunoglobulinas isotipo IgA contra *E.coli* patogênica em bile, soro e secreção lacrimal.

A padronização das concentrações e diluições ótimas de uso da suspensão antigênica da bactéria, bem como das amostras de soro sanguíneo, bile e secreção lacrimal para determinação dos níveis de imunoglobulina IgA foram determinadas por meio do processo de titulação em placas de poliestireno de ELISA de 96 poços (Costar®).

Como anticorpo conjugado para esta análise foi utilizado anticorpo anti- IgA de galinha produzido em cabra conjugado com peroxidase (IgA-HRP, Biogen®) na concentração de 1/10.000.

4.8.1. Padronização de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) utilizando *Escherichia coli* patogênica

A padronização do ensaio imunoenzimático foi realizada com o intuito de obter a concentração do antígeno e a diluição ideal das amostras-teste e a melhor diluição do anticorpo conjugado. Desta maneira, foram realizados testes com diferentes concentrações de antígenos e diferentes diluições das respectivas amostras de bile, soro sanguíneo e secreção lacrimal. Estes testes foram realizados em duplicata. A primeira padronização foi realizada com as amostras de bile.

A suspensão antigênica de *Escherichia coli* patogênica previamente estabelecida foi diluída nas concentrações de 2,5 µg, 5 µg, 10 µg e 15 µg com tampão carbonato-bicarbonato (pH: 9,6). As diluições da bile foram: 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 em PBS com leite desnatado a 0,06% e o anticorpo conjugado foi testado nas concentrações de 1:5.000 e 1: 10.000.

Foi realizado um pool de bile de referência obtido de aves do tratamento 1 (desafiados e sem óleo-resina de copaíba) e outro pool referente as aves do tratamento 2 (não-desafiados e sem óleo-resina de copaíba). Estes tratamentos foram utilizados para permitir a melhor discriminação dos animais desafiados em comparação aos animais não-desafiados.

Para realização do ensaio imunoenzimático foram utilizados os seguintes controles do teste: o controle branco, que continha o antígeno; o conjugado, obtido comercialmente e substrato; controle do conjugado, que continha o antígeno, conjugado, substrato e solução de bloqueio e o controle do bloqueio, composto pela solução de bloqueio, amostras de referência (soro, bile ou secreção lacrimal), conjugado e substrato.

Foram utilizadas as mesmas concentrações de antígenos e a mesma diluição do pool de amostras de secreção lacrimal e soro sanguíneo. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Sucintamente, 50 µl de solução sensibilizadora (com as três concentrações de antígenos testadas) foram adicionadas nas cavidades da microplaca de poliestireno. Em seguida, as placas foram incubadas a 4°C durante 18 horas. Nesta etapa, apenas o controle do bloqueio não recebeu a

solução sensibilizadora e 50 µl de PBS foi adicionado nas cavidades da microplaca.

Finalizada a incubação, a placa foi invertida para retirada do excesso do conteúdo e 100 µl por cavidade de solução de bloqueio com tampão carbonato-bicarbonato acrescido de leite em pó desnatado a 1% foi adicionado aos poços seguidos de incubação em estufa a 37°C durante 2 horas, exceto no controle do branco, que foi preenchido com PBS. Posteriormente, as microplacas foram lavadas uma vez com PBS.

Em seguida, 50 µl das diferentes concentrações das amostras-teste foram diluídas em PBS e leite desnatado a 1% nas cavidades da microplaca, exceto no controle do branco e controle do conjugado, sendo esta etapa da reação incubada em estufa 37°C durante 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas seis vezes com PBS e Tween 20 a 0,05%, com intervalos de 5 minutos a cada lavagem.

Posteriormente, as microplacas receberam 50 µL de conjugado imunoenzimático de cabra anti- IgA de galinha conjugado a peroxidase em cada cavidade, nas diluições de 1: 5.000 e 1:10.000, seguindo o procedimento de duas horas de incubação e lavagem idêntica a etapa anterior.

Na última fase da reação foi adicionado o substrato peróxido de hidrogênio no volume de 20% e 10 µg do cromógeno Orto-Fenileno-Diamina (OPD) preparados em 10 mL de tampão citrato pH 5,0. Foram pipetados 50 µL desta solução em cada cavidade e em seguida, as placas foram incubadas em temperatura ambiente, por 15 minutos, fora do alcance da luz, para que a reação enzimática terminasse.

Após esta etapa, adicionou-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico H_2SO_4 , 4N por cavidade para bloquear a atividade enzimática. Foram registradas em seguida, as leituras das densidades ópticas (OD) em leitora de ELISA (Multiskan Plus) no comprimento de onda de 492 nm.

4.8.2 Titulação dos níveis de imunoglobulina IgA para a quantificação de anticorpos contra *E.coli* patogênica nas amostras de bile, soro sanguíneo e secreção lacrimal

Amostras de bile, secreção lacrimal e soro sanguíneo testes colhidos de grupos inoculados e controles aos 28 e 35 dias de idade foram utilizadas para verificação dos níveis de imunoglobulina isotipo IgA, de acordo com os parâmetros previamente padronizados.

Para avaliar a resposta imune pelo teste de ELISA indireto, a *E.coli* anteriormente cultivada em BHI e purificada por centrifugação foi adsorvida nas placas de polietileno contendo 96 poços (BD®). Os poços da placa foram preenchidos com 50 µL de antígeno puro com tampão bicarbonato (10,015 mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃), pH 9.6 e posteriormente foram incubadas a 4°C por 18 horas. Após esta etapa, foi desprezado o conteúdo da placa e adicionado a solução de bloqueio, seguido da incubação em estufa a 37°C por 2 horas.

A bile coletada de 5 aves por tratamento, foi adicionadas individualmente, em duplicata, em cada cavidade da microplaca sem diluição, totalizando 50 amostras por data testada (28 e 35 dias). Para as amostras-teste de secreção lacrimal, igualmente 5 amostras foram realizadas por tratamento. Para o soro-sanguíneo, 15 amostras por tratamento foram testadas, totalizando 150 amostras por data-teste (28 e 35 dias).

A partir desta etapa, os reagentes foram removidos dos poços da placa de poliestireno por meio de lavagem com solução de PBS e Tween 20 0,05% por 6 vezes.

A diluição do conjugado foi realizada no momento da sua utilização. Na etapa subsequente, 50 µL do conjugado anticorpo de cabra anti-IgA de galinha ligado a peroxidase diluído em PBS + leite em pó desnatado 0.06% (1: 10.000) foram adicionados e incubados novamente a temperatura de 37°C por 2 horas. Após nova lavagem, o substrato contendo 100 µL de peróxido de hidrogênio a 20%, 10 µg de OPD e 10 mL de tampão citrato pH 5.0 foi adicionado à reação que foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as

placas foram adicionadas solução de parada que continha 50 µL de solução de ácido clorídrico em cada cavidade.

As leituras registradas como densidade ópticas foram realizadas em leitora de ELISA em comprimento de onda de 492 nm para todas as amostras testadas.

4.9. Modelo de avaliação da resposta imune celular em aves por meio da reação cutânea à fitohemaglutinina (PHA)

A reação cutânea à fitohemaglutinina consiste em uma reação que pode ser avaliada no espaço interdigital. Este teste funcional aplicado *in vivo* mensura a resposta imune mediada por células (CORRIER & DELOACH, 1990; FAIRBROTHER et al., 2004).

A PHA é uma glicoproteína presente no feijão rosa (*Phaseolus vulgaris*) e sua propriedade mitogênica foi descoberta em 1959 e consiste no recrutamento de células T de várias espécies (GOTO et al., 1978). Possuem sítios de ligação de carboidratos específicos que podem interagir com receptores celulares (MISQUITH et al., 1994), inclusive com os carboidratos presentes nos receptores de linfócitos T (KANELLOPOULOS et al., 1985).

A técnica consiste em aplicar o mitógeno intradermicamente e posteriormente quantificar a resposta do recrutamento das células para o local inoculado. O resultado é interpretado como um índice da imunocompetência mediada por células (TELLA et al., 2008).

Considerado um teste clássico para avaliação da imunidade devido a facilidade e a possibilidade de ser aplicado *in vivo* em condições à campo (MARTIN et al., 2006), fazendo com que o teste da PHA seja considerado como um bom indicador da imunidade mediada por células em aves (TIZARD, 2000)

Aos 35 dias de idade, cinco aves por tratamento foram utilizadas para avaliar a imunidade mediada por células *in vivo* (Corrier & DeLoach, 1990). A reação de hipersensibilidade cutânea à fitohemaglutinina (PHA) é avaliada no espaço interdigital e mensurada por meio da utilização de um paquímetro digital.

A fitohemaglutinina foi adquirida da empresa Cultilab (PHA-*Phaseolus vulgaris*) e aplicada conforme as recomendações do fornecedor. Cada ave foi inoculada intradermicamente, no espaço interdigital entre o terceiro e o quarto dedo da pata direita com 0,1 ml/ave da solução de fitohemaglutinina. Como controle negativo, 0,1 ml de solução salina estéril foi inoculada entre o terceiro e o quarto dedo da pata esquerda.

O espessamento da pele de ambas as patas foi aferido utilizando-se paquímetro digital (Caliper®), onde aferiu-se a espessura da pele em milímetros antes da inoculação e após 8 e 24 horas a inoculação. O cálculo realizado apresentou-se da seguinte forma:

Reação = resposta a fitohemaglutinina – resposta controles, onde a resposta a fitohemaglutinina é medida pela espessura da pele após o tempo de inoculação (8 ou 24 horas após) menos a espessura no tempo zero (antes da inoculação). A resposta do controle é medida pela espessura da pele após o tempo de inoculação (PBS) menos a espessura no tempo zero (antes da inoculação).

4.10. Peso relativo dos órgãos linfóides

Aos 35 dias de idade, 5 aves por tratamento (uma ave por parcela experimental) foram sacrificadas pela inalação de gás carbônico para a coleta e pesagem de órgãos linfóides: bursa, baço e timo. Os resultados foram calculados segundo a relação entre o peso do órgão e o peso vivo da ave.

4.11. Análise estatística

Para análise dos resultados de desempenho animal foi utilizado o programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2001).

Os dados foram submetidos à análise de variância através do General Linear Model (PROC GLM). As diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos ($P < 0,05$), foram analisadas através da comparação das médias por meio do teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

A análise estatística utilizada para mensuração dos parâmetros imunológicos foi realizada com o programa computacional GraphPrisma 4 software for Windows, versão 4.0, Inc. 2003.

Para as análises dos dados imunológicos foram utilizados testes não-paramétricos: Kruskal Wallis (mais de dois grupos experimentais) ao nível de 5% de probabilidade e a diferença entre os grupos foi avaliada utilizando-se teste t student após as análises não paramétricas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Parâmetros de desempenho zootécnico

O desempenho dos frangos de corte, resultado da adição dos diferentes níveis de aditivo fitogênico, administrado via ração, foi investigado, por meio da avaliação do ganho de peso, conversão alimentar, peso final e consumo de ração.

Os diferentes níveis de óleo-resina de copaíba não demonstraram efeitos sobre os parâmetros mensurados no desempenho animal.

Os resultados de desempenho das aves na fase inicial aos 7 dias de idade demonstram que não houve interação entre o tratamento com óleo-resina de copaíba e o desafio com *Escherichia coli* (Tabela 2).

Os animais desafiados apresentaram menor peso final, menor ganho de peso e menor conversão alimentar como resultado do menor consumo de ração apresentado por estas aves.

O peso final e ganho de peso das aves foram semelhantes no tratamento com antibiótico (colistina a 10 ppm) e copaíba não havendo diferença entre estes tratamentos com o promotor utilizado neste experimento.

Não houve diferença entre os tratamentos quanto a conversão alimentar, exceto pelas aves que receberam óleo-resina de copaíba com o nível de 0,4% que tiveram conversão alimentar maior do que o promotor de crescimento, entretanto não diferiu estatisticamente dos outros níveis de óleo-resina.

KOYAMA (2012) observou resultado semelhante quando incluiu 200 ppm de óleo-resina de copaíba na dieta de frangos de corte.

VIANA et al., (2010), observaram que a inclusão de óleo essencial de copaíba (*Copaifera reticulata*) na concentração de 0,15 ml/kg de ração proporcionou peso corporal semelhante ao tratamento com antibiótico promotor de crescimento (avilamicina) e não encontraram diferenças nos demais parâmetros de desempenho animal: consumo de ração e conversão alimentar.

Os resultados de desempenho das aves aos 14 dias de idade (Tabela 3) demonstram que não houve interação entre o tratamento com óleo-resina de copaíba e o desafio com *Escherichia coli*. O peso final e ganho de peso das aves foram semelhantes no tratamento antibiótico (colistina a 10 ppm) e copaíba não havendo diferença entre estes tratamentos com o promotor utilizado neste experimento. Os níveis diferentes de óleo-resina de copaíba não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 2 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 7 dias de idade em função dos diferentes níveis de óleo-resina de copaíba.

Desafio	Peso Final (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g/g)
COM	169,20 B	124,49 B	111,40 B	0,897 B
SEM	173,11 A	128,37 A	141,52 A	1,110 A
Óleo				
Controle (-)	181,72 A	137,00 A	175,03	0,968 B
0,2%	173,10 B	128,42 B	216,41	0,985 AB
0,4%	162,94 C	118,17 C	233,10	1,075 A
0,6%	168,22BC	123,53BC	188,31	0,997 AB
Controle (+)	169,78BC	125,02BC	166,63	0,982B
Desafio	0,0464	0,0463	<0,0001	<0,0001
Óleo	<0,0001	<0,0001	0,3425	0,0008
Des+Óleo	0,5199	0,5163	0,7271	0,3216
CV (%)	3,92	5,28	9,16	6,62

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P< 0,05). CV(%): coeficiente de variação

Aos 21 dias de idade os resultados demonstram que não houve interação entre o tratamento com óleo-resina de copaíba e o desafio com *Escherichia coli*. Os animais desafiados com a bactéria apresentaram menor

conversão alimentar em relação aos animais não desafiados, entretanto, houve um menor consumo de ração das aves desafiadas.

Os tratamentos não diferiram entre si quanto ao peso final, ganho de peso e conversão alimentar aos 21 dias de idade. Não houve diferença estatística entre os níveis de óleo de copaíba e o promotor de crescimento (colistina a 10 ppm), entretanto o tratamento com óleo-resina a 0,4% resultou em menor consumo de ração em relação ao tratamento controle (Tabela 4).

Tabela 3 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 14 dias de idade em função dos diferentes níveis de óleo-resina de copaíba.

Desafio	Peso Final (g)	GP/ave (g)	CR/ave (g)	CA (g/g)
COM	457,71	413,00	498,02	1,212
SEM	458,65	413,91	503,71	1,221
Óleo				
Controle (-)	476,97A	432,25 A	514,35	1,195
0,2%	468,27AB	423,59AB	510,55	1,224
0,4%	447,40 B	402,63 B	495,09	1,244
0,6%	444,38 B	399,69 B	488,75	1,223
Controle (+)	453,88AB	409,12AB	495,75	1,196
Desafio	0,8665	0,8697	0,3812	0,462
Óleo	0,0020	0,0020	0,071	0,059
Des+Óleo	0,8345	0,8334	0,431	0,877
CV (%)	4,26	4,72	4,53	3,49

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV(%): coeficiente de variação

Aos 28 dias de idade os resultados demonstram que não houve interação entre o tratamento com óleo-resina de copaíba e o desafio com *Escherichia coli*. Os animais desafiados com a bactéria apresentaram menor conversão alimentar em detrimento do menor consumo de ração apresentado por estas aves. Em comparação, as aves não desafiadas apresentaram maior conversão alimentar, como resultado do aumento do consumo de ração. Os tratamentos não diferiram entre si quanto ao peso final, ganho de peso e consumo de ração aos 28 dias de idade (Tabela 5).

Tabela 4 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 21 dias de idade em função dos diferentes níveis de óleo-resina de copaíba.

Desafio	Peso Final (g)	GP/ave (g)	CR/ave (g)	CA (g/g)
COM	900,18	855,47	571,53 B	1,303 B
SEM	900,70	855,96	606,53 A	1,408 A
Óleo				
Controle (-)	922,01	887,29	606,49 A	1,345
0,2%	915,46	870,78	593,32AB	1,356
0,4%	887,71	842,94	562,40 B	1,377
0,6%	866,39	821,70	582,50AB	1,359
Controle (+)	910,63	865,87	600,43AB	1,340
Desafio	0,967	0,969	0,0006	<0,0001
Óleo	0,046	0,046	0,041	0,5000
Des+Óleo	0,948	0,948	0,143	0,9347
CV (%)	4,94	5,20	5,62	3,63

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05). CV(%): coeficiente de variação

Tabela 5 - Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 28 dias de idade em função dos diferentes níveis de óleo-resina de copaíba.

Desafio	Peso Final (g)	GP/ave (g)	CR/ave (g)	CA (g/g)
COM	1475,46	1,431	1994 B	1,354 B
SEM	1444,51	1,400	2087 A	1,444 A
Óleo				
Controle (-)	1496,99	1,452	2099	1,403
0,2%	1507,56	1,463	2098	1,392
0,4%	1443,40	1,399	1999	1,389
0,6%	1414,75	1,370	1977	1,398
Controle (+)	1437,24	1,392	2029	1,414
Desafio	0,164	0,164	0,003	<0,0001
Óleo	0,043	0,042	0,030	0,904
Des+Óleo	0,569	0,567	0,229	0,752
CV (%)	5,28	5,44	5,02	4,41

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05). CV(%): coeficiente de variação

Deve-se considerar que neste estudo foi utilizado somente o óleo-resina de copaíba. Entretanto, diversas pesquisas sugerem a combinação de diferentes plantas que poderiam proporcionar um sinergismo de princípios

ativos que podem resultar em resultados diferentes quando os aditivos fitogênicos são testados (MITSCH et al., 2004).

Estudo realizado com a utilização de duas misturas: alecrim, cravo, gengibre, orégano e canela, sálvia, tomilho branco e óleo-resina de copaíba proporcionalmente iguais adicionados à dieta de frangos de corte apresentou resultados promissores como aditivo fitogênico (KOYAMA, 2012).

Entretanto, este estudo objetivou identificar o efeito que o óleo-resina de copaíba exercia sobre o desempenho animal quando utilizado isoladamente e em níveis elevados.

Contudo, não existem relatos até o momento que demonstram o efeito do óleo-resina de copaíba sobre os parâmetros zootécnicos em frangos de corte.

Porém, deve-se considerar que em relação ao desempenho de frangos de corte, as pesquisas realizadas com a suplementação de aditivos fitogênicos apresentam resultados controversos quanto a estes parâmetros pois muitas variáveis podem fazer com que o processo de comparação seja mais complicado (YANG et al., 2009).

Com relação aos resultados de desempenho apresentados neste estudo sobre o efeito do óleo-resina de copaíba na imunidade humoral de mucosas, pode-se sugerir que aos 28 dias de idade todos os níveis utilizados neste trabalho foram semelhantes ao promotor antibiótico.

5.2 Imunidade humoral de mucosas

A padronização do teste de ELISA indireto, permitiu determinar as melhores condições de diferenciação entre amostras desafiadas e amostras não desafiadas. Os resultados referentes a padronização do ensaio imunoenzimático foram dispostos em gráfico que apresentou a melhor concentração do antígeno e melhor diluição de bile para avaliação da resposta imune humoral.

As concentrações das amostras de bile e suspensão antigênica foram representadas como densidade óptica (OD) e a diferença demonstrada entre os tratamentos avaliados no teste de padronização apresentou um

resultado de aproximadamente 3 vezes de diferença entre os grupos (Figura 3).

Com o estabelecimento destes parâmetros a concentração ótima do antígeno foi determinada como sendo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (linha verde contínua e pontilhada) e a diluição da bile 1:10 (FIGURA 3), utilizando-se o conjugado na diluição de 1:10.000.

Entretanto, com o intuito de obter maior quantidade de anticorpos presentes nas amostras, foi verificado e realizado o ensaio com as amostras sem qualquer diluição (amostras teste puras).

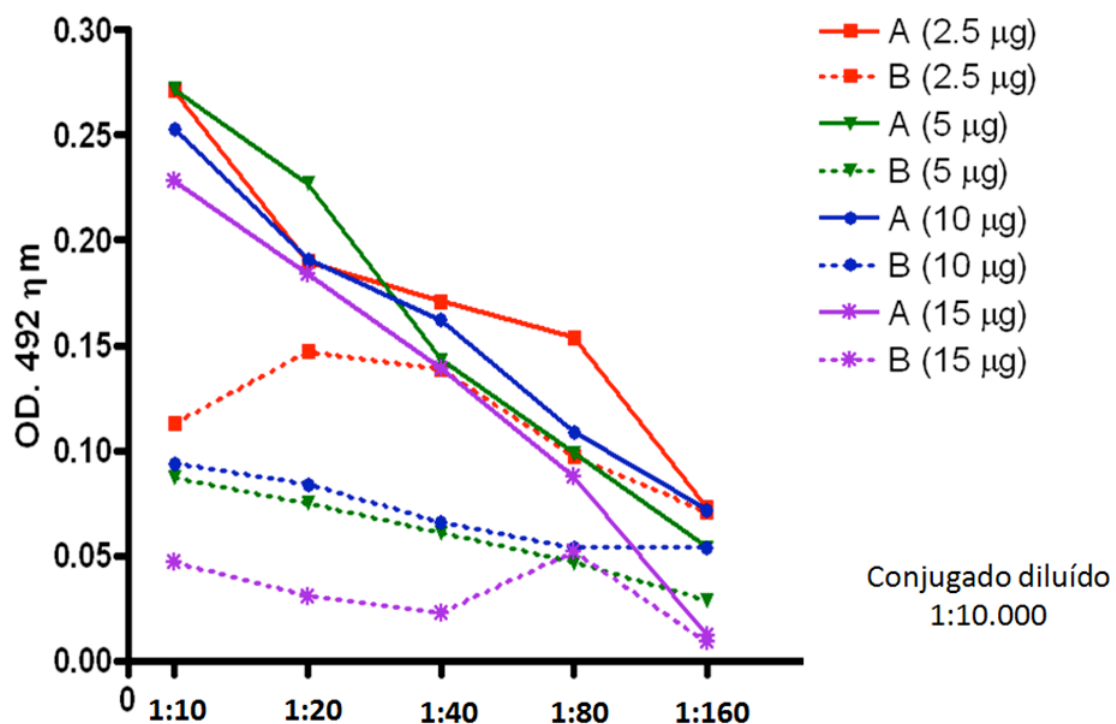


Figura 3 - Padronização do teste de ELISA indireto para avaliação da imunidade humoral utilizando concentrações de antígeno: 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (vermelho); 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (verde); 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (azul); 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (roxo) e nas diluições de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160. Linhas contínuas representam animais pertencentes ao grupo 1. Linhas pontilhadas representam animais do grupo 2.

Posteriormente a padronização, os resultados referentes às leituras de imunoglobulina isotipo IgA foram expressos como densidade ótica nas amostras de bile, secreção lacrimal e soro aos 28 e 35 dias de idade.

Pode-se notar que aos 28 dias de idade (Figura 4), os níveis de imunoglobulinas IgA correspondem a resposta imune referente a primeira infecção realizada no quarto dia de vida (24 dias após a primo-infecção).

Com relação ao grupo controle desafiado, representado pelo tratamento 1, observa-se uma diferença significativa na resposta dos níveis de imunoglobulina IgA (expressa como densidade óptica) entre este grupo controle negativo desafiado e o grupo promotor antibiótico desafiado, representado pelo tratamento 9 ($p= 0.0079$).

Em estudo realizado com uma mistura de óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e pimenta sobre o perfil de soroproteínas, TRAESEL et al., (2011) demonstraram uma menor resposta imunológica que também foi encontrada no grupo promotor de crescimento antibiótico (sulfato de colistina e oxitetraciclina a 0,005%) e na maior dose da mistura dos óleos (150 ppm), enfatizando, entretanto, que doses mais altas, podem promover prejuízo na função renal e hepática em frangos de corte.

Os níveis de 0.2% ($p= 0.0159$) e 0.4% ($p=0.0357$) apresentaram valores significativamente menores de IgA comparados ao grupo controle. O nível de 0.6% não diferiu estatisticamente do grupo controle e do grupo promotor antibiótico aos 28 dias de idade das aves.

Entretanto, não foi observada diferença nos níveis de imunoglobulinas entre o grupo promotor e os níveis de óleo-resina quando avaliados aos 28 dias de idade, verificando-se que nesta idade a ação dos diferentes níveis de óleo-resina foram equivalentes ao promotor de crescimento antibiótico.

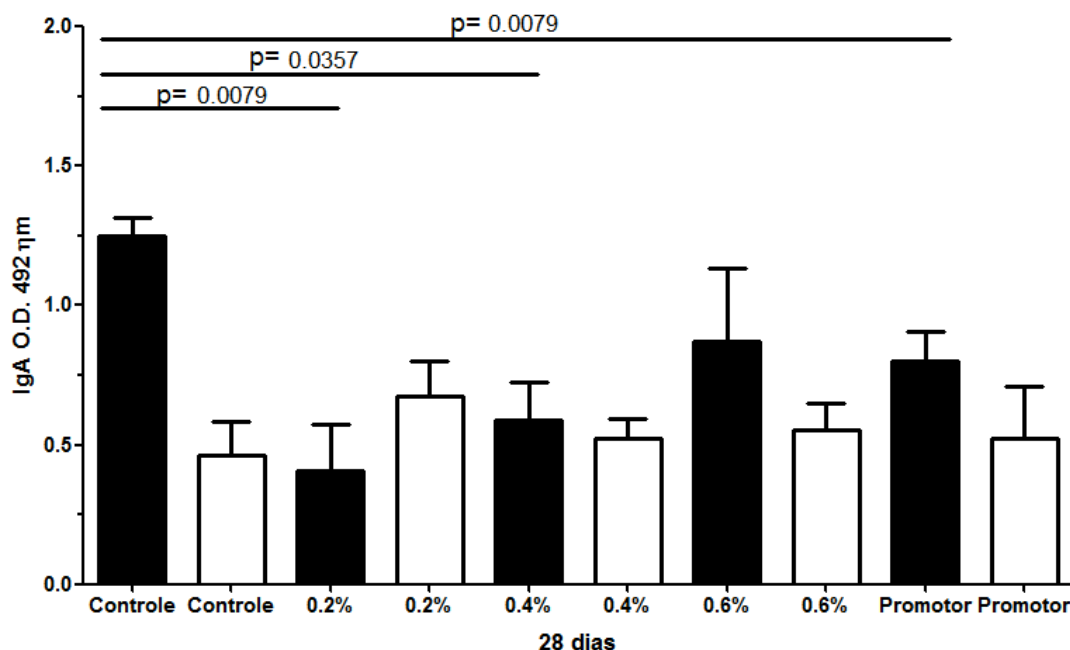


Figura 4. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de bile das aves aos 28 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

Como as imunoglobulinas são produzidas nos tecidos linfóides em resposta a estímulos antigênicos, uma menor exposição ao patógeno promovida pelo efeito preventivo do promotor estimularia em menor grau a resposta imunológica dos frangos, com ausência de estimulação na produção das imunoglobulinas (TRAESSEL et al., 2011).

Aos 35 dias de idade, os níveis de imunoglobulinas IgA correspondem a resposta referente a segunda infecção com *Escherichia coli* realizada no 22º dia de vida. Por se tratar de uma segunda infecção (realizada aos 22 dias de idade), correspondente a uma resposta 13 dias após a infecção secundária, a resposta imune humoral apresentou pico de produção em menor intervalo de tempo e de maneira mais intensa comparado a primeira resposta mensurada devido a presença de linfócitos B de memória (ABBAS et al., 2000).

Comparando-se a inclusão dos níveis de óleo-resina durante todo o período experimental, pode-se observar que a resposta imune humoral de mucosa aos 35 dias de idade na bile (Figura 5), promoveu um aumento nos

níveis de anticorpos em todos os grupos de animais tratados com óleo-resina de copaíba e no grupo promotor antibiótico, aproximando-se do grupo controle com desafio (tratamento A).

Observa-se aos 35 dias de idade nas amostras de bile, que houve diferença significativa para a avaliação de IgA de acordo com os níveis de óleo-resina de copaíba. O nível mais baixo de óleo-resina (0.2%) apresentou níveis de imunoglobulina A significativamente maiores quando comparados ao nível intermediário (0.4%) e nível alto (0.6%). O nível de 0.2% de óleo-resina demonstrou este mesmo comportamento com o promotor de crescimento antibiótico.

Adicionalmente a estes resultados, foi verificado um aumento significativo nos níveis de anticorpos quando observado o comportamento do tratamento com óleo-resina de copaíba a 0,2% durante o período experimental (Figura 6).

Observando-se o comportamento deste grupo, pode-se verificar um incremento significativo nos níveis de anticorpos se comparados as datas de 28 dias (O.D < 0.5) e 35 dias (O.D= 1.5) demonstrando ocorrer um efeito aditivo promovido pelo óleo de copaíba em suas menores concentrações ($p=0.0079$), indicando uma maior resposta da imunidade humoral de mucosas nos animais testados.

Comparando-se estes resultados com a adição de óleo-resina no nível intermediário de 0,4%, este mesmo comportamento não foi demonstrado aos 28 dias (O.D: 0,6) e aos 35 dias (O.D: 0,8) de idade das aves. Resultados semelhantes podem ser verificados com o alto nível de óleo-resina 0.6% que apresentou aos 28 dias um valor de O.D de aproximadamente 0,8 e aos 35 dias um valor de O.D de aproximadamente 0,5 de idade das aves (Figura 4 e 5, respectivamente).

Estes resultados demonstram um menor estímulo da resposta imune humoral de mucosa de frangos de corte, observando-se um efeito dose-dependente nas maiores doses administradas (concentração de 0,4% e 0,6%) de óleo-resina de copaíba.

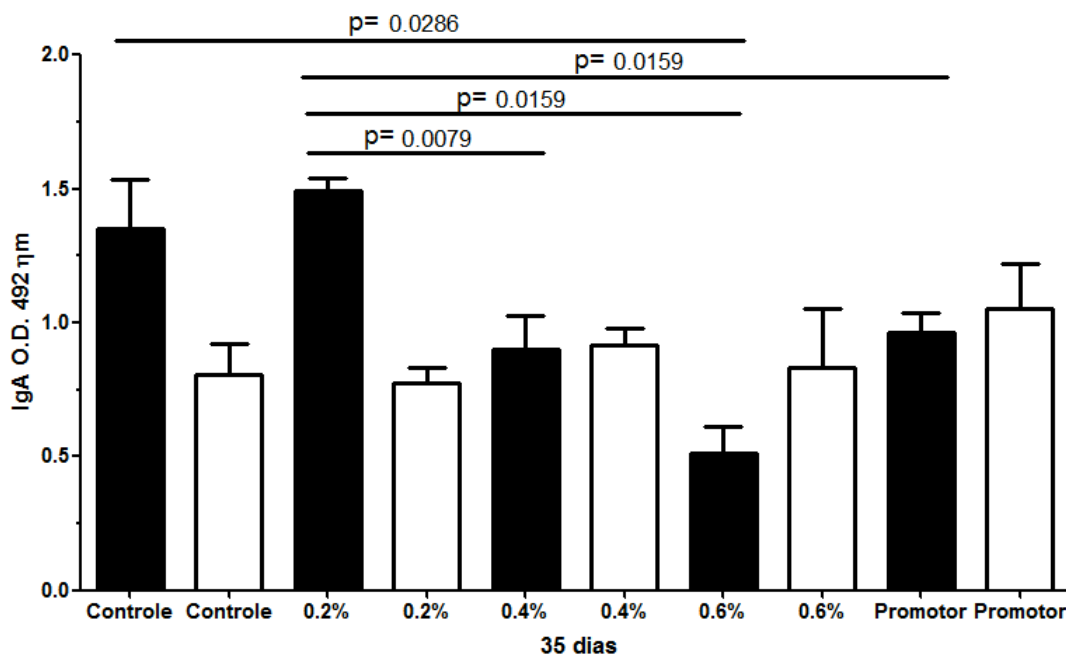


Figura 5. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de bile das aves aos 35 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

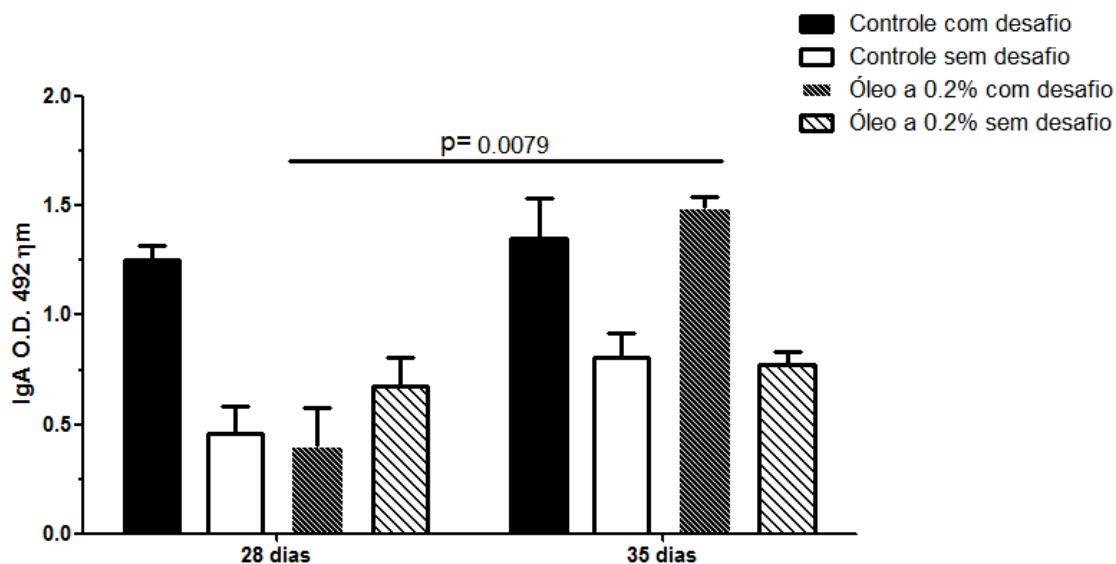


Figura 6. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de bile das aves aos 28 dias e 35 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período

experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

Utilizando as mesmas concentrações utilizadas neste estudo (0,2, 0,4 e 0,6%), ABDULKARIMI & ABDULLAHZADEH (2011), não verificaram uma melhora na resposta imune em nenhuma das concentrações de extrato de menta testadas em frangos de corte.

Pode-se sugerir que a atividade antibacteriana relatada na literatura para o gênero *Copaifera sp.* (PIERI et al., 2012) pode estar envolvida no menor estímulo sobre a resposta imune nos maiores níveis de óleo-resina administrados via ração, equivalendo-se a dos agentes antimicrobianos utilizados.

Outras pesquisas realizadas *in vitro*, observaram que a utilização de concentrações altas de óleo podem ser necessárias para inibir bactérias gram-negativas em estudo investigativo com 21 plantas (SMITH-PALMER et al., 1998).

O mecanismo pelo qual houve este estímulo na imunidade humoral de mucosas ainda não pode ser afirmado devido ao caráter investigativo e pioneiro desta pesquisa.

Com relação aos grupos controles não-desafiados de cada tratamento (representados pela barras em branco), observa-se a presença de anticorpos contra a bactéria *E. coli*.

Estes níveis são justificados pela transferência de imunidade passiva à progênie pelas matrizes por meio do saco vitelínico, que promove o desenvolvimento desta resposta imune específica sem que seja necessário o envolvimento direto com o microrganismo (SILVA, 2010).

Nas aves, durante o processo de formação do ovo, a imunidade passiva é transferida para o pinto, por meio da passagem das imunoglobulinas IgY presentes no sangue da matriz para o oviduto, depositando-se na gema e durante a formação do albúmen (no magnum), permitindo a passagem de IgA e IgM (SILVA, 2010).

Após a eclosão, os níveis de anticorpos maternos para *E. coli* mensurados pelo teste de ELISA na progênie é aproximadamente 55 a 60% das matrizes (HELLER et al., 1990).

Além disso, deve-se observar que nestes tratamentos também ocorreu um aumento discreto dos níveis de imunoglobulinas, verificado principalmente nas amostras de bile (Figuras 2 e 3). Estudos sugerem que o sistema imunológico das aves, apresenta-se de maneira geral, mais competente em aves adultas (BEIRÃO, 2011).

O perfil de resposta imunológica encontrada com as amostras de secreção lacrimal foram semelhantes ao encontrado para as amostras de bile, entretanto como esperado, os níveis de anticorpos nestas amostras apresentaram resultados de densidade óptica menores (Figura 7).

Ocorreu uma discreta diminuição nas leituras de O.D nas amostras de secreção lacrimal e diminuição mais acentuada nas amostras de soro, onde há menor quantidade desta imunoglobulina (Figura 10) nas aves testadas aos 28 dias de idade.

Aos 28 dias de idade, os níveis de imunoglobulinas IgA na secreção lacrimal correspondem a uma resposta imune 24 dias posterior a primo-infecção ocorrida aos 4 dias de idade, apresentando uma diferença entre o grupo controle negativo desafiado e o grupo controle positivo (promotor antibiótico), demonstrando a capacidade do promotor antibiótico ($p=0.0317$).

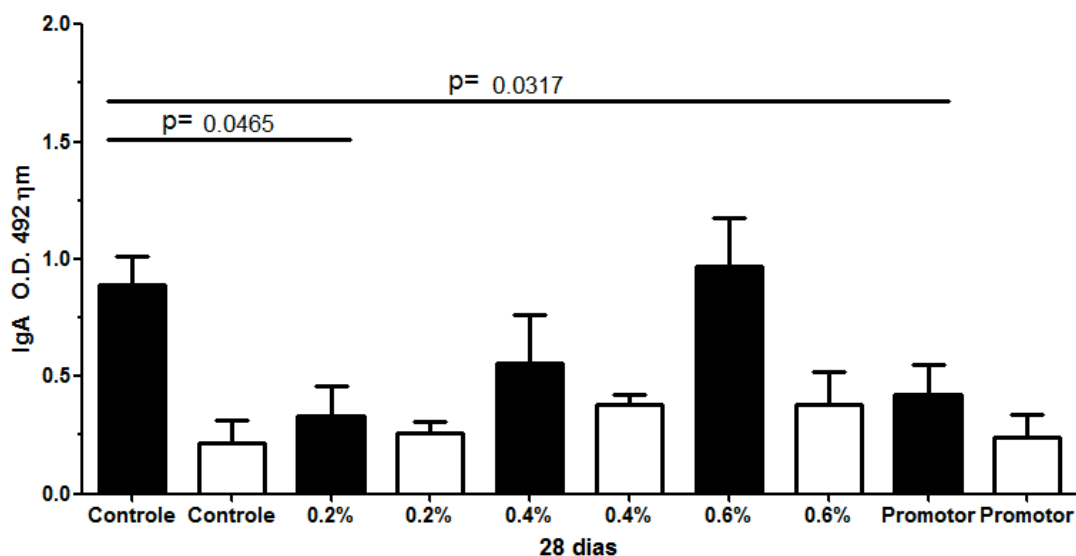


Figura 7. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de secreção lacrimal das aves aos 28 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não

receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

O grupo controle também apresentou diferença significativa com o nível de óleo-resina a 0.2% ($p=0.0317$). Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente entre si.

Como observado para as amostras de bile, o perfil de resposta das amostras de secreção lacrimal aos 35 dias apresentaram aumento nos níveis de anticorpos promovido em todos os tratamentos (Figura 8), resultado do segundo desafio com a bactéria *E. coli* realizado aos 22 dias de vida e correspondendo a um estímulo rápido do sistema imune 13 dias após a inoculação bacteriana. Entretanto, os tratamentos não promoveram diferença estatística na secreção lacrimal nesta idade das aves.

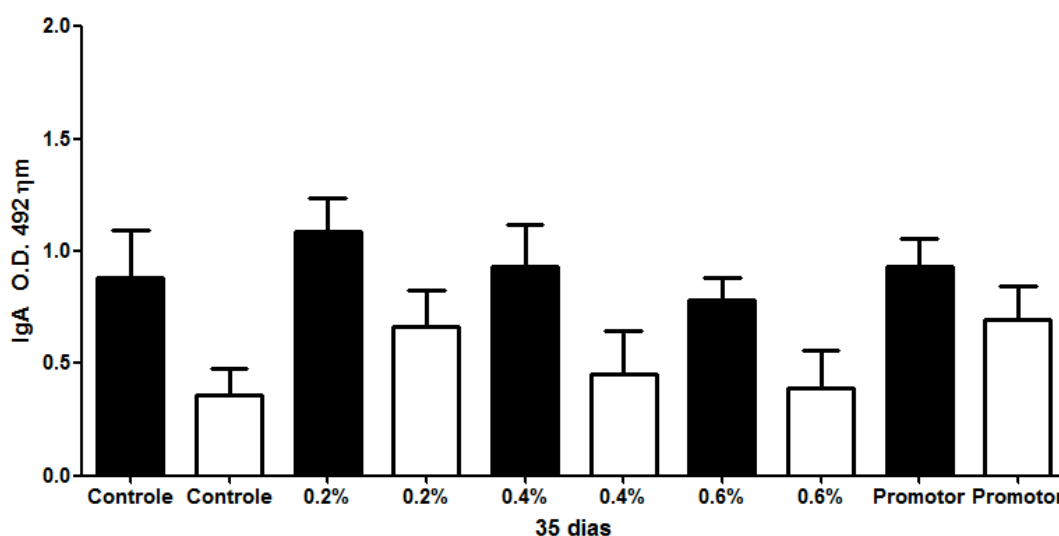


Figura 8. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de secreção lacrimal das aves aos 35 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

Pode-se observar que comparando o efeito do óleo-resina durante todo o período experimental, verifica-se o efeito aditivo (Figura 9)

apresentado nas amostras de secreção lacrimal aos 28 dias (O.D = 0.3) e aos 35 dias de idade das aves (O.D: 1.0).

Como os níveis de imunoglobulina A são encontrados em baixas quantidades no soro sanguíneo, verificou-se, conforme esperado, que os níveis de anticorpos deste isotipo nestas amostras apresentaram os menores resultados em relação as demais amostras apresentadas anteriormente.

Na análise do soro sanguíneo, o grupo controle apresentou diferença estatística com todos os tratamentos, entretanto, não houve diferença significativa entre os níveis de óleo-resina testados nesta amostra aos 28 dias de idade (Figura 10).

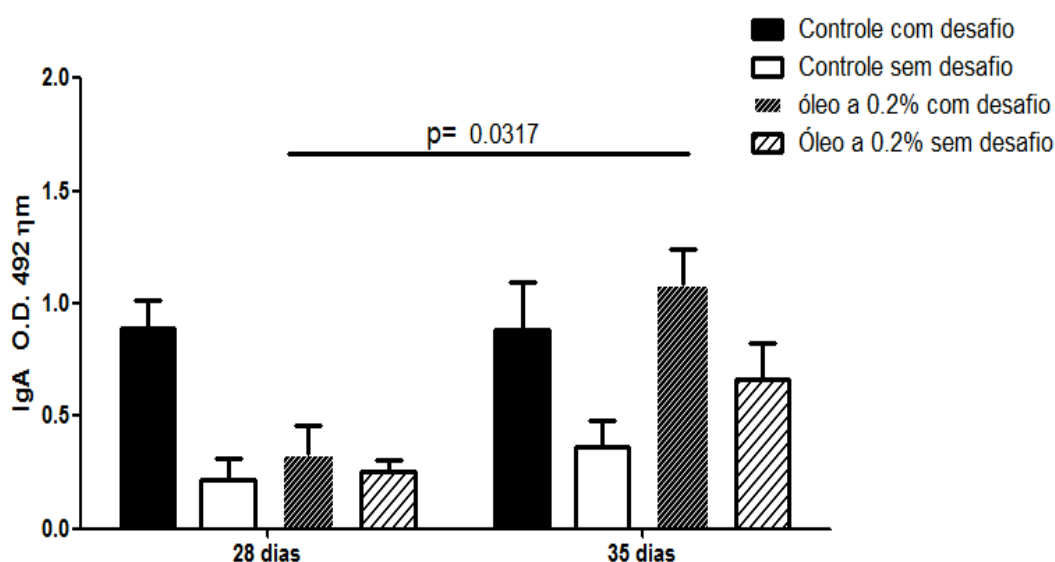


Figura 9. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de secreção lacrimal das aves aos 28 dias e 35 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

Entretanto, aos 35 dias de idade (Figura 11), o tratamento com nível de óleo-resina de 0,2% apresentou resultados significativamente maiores de IgA em relação aos demais níveis de óleo-resina.

Nesta idade, apenas o nível de 0,2% de óleo-resina apresentou aumento nos níveis de anticorpos comparados a data anterior (28 dias de idade). Os demais grupos apresentaram aumento inexpressivo nos níveis de

anticorpos após a segunda infecção realizada aos 22 dias de idade das aves.

Como apresentado para as amostras de bile e secreção lacrimal, as amostras de soro sanguíneo demonstraram o efeito aditivo do óleo-resina (Figura 12) no nível mais baixo de inclusão na dieta (0,2%) quando avaliado a sua inclusão durante todo o período experimental.

Uma possível explicação para obtenção deste efeito sobre a imunidade humoral de mucosa nas amostras analisadas pode estar relacionada com as propriedades do composto β -cariofileno, descritas para a espécie *Copaifera spp.* Este sesquiterpeno, tem sido considerado como um componente que apresenta diferentes propriedades, incluindo a atividade anti-carcinogênica (SILVA et al., 2007; ZHENG et al., 1992).

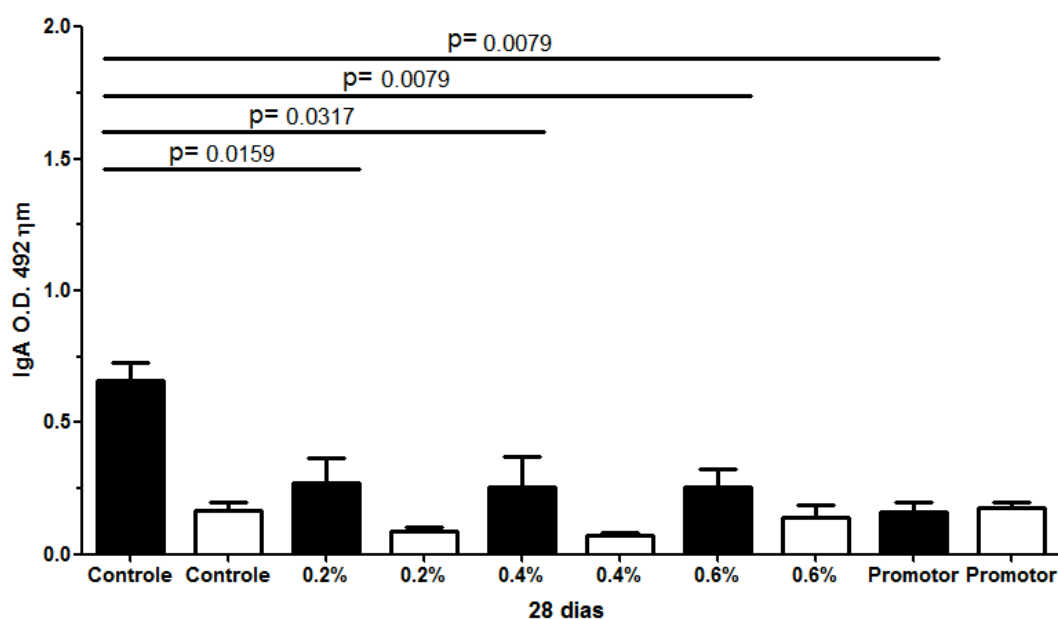


Figura 10. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de soro sanguíneo das aves aos 28 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

É possível que a permanência de β -cariofileno no organismo pode estar relacionado com os efeitos de modulação da função imunológica (SILVA et al., 2007).

YANG e colaboradores (2009), consideram que a atividade antimicrobiana e o estímulo sobre a resposta imune sejam provavelmente os dois mecanismos principais pelos quais os aditivos fitogênicos exercem efeito positivos sobre a saúde dos animais.

Os resultados apresentados sugerem que o óleo-resina de copaíba obtido comercialmente é uma fonte em potencial como imunostimulatório para utilização na produção de frangos de corte, pois contém compostos bioativos com potencial para atuar como suplementos alimentares multifuncionais para os animais.

Com relação as diferentes doses e espécies de copaíba, pode-se verificar que o óleo-resina, consiste no óleo bruto que é composto por diferentes constituintes que apresentam diferentes concentrações pois dependem de características externas as plantas para sua formação como pluviosidade, solo, incidência de luz solar, etc.

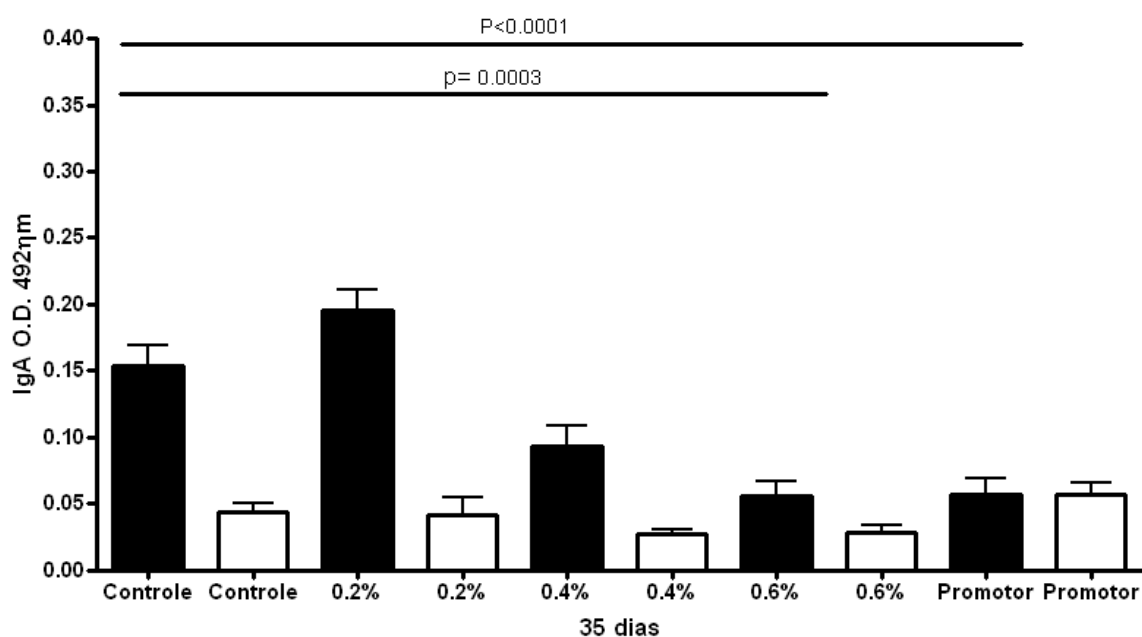


Figura 11. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de soro sanguíneo das aves aos 35 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-

Deve-se considerar, desta maneira, que não se trata de um produto purificado ou obtido de maneira sintética nas frações que o compõem (GOMES et al., 2008).

Além disso, como o óleo foi administrado por meio da ração, pode ocorrer influência do pH estomacal que podem interferir na absorção e conseqüentemente nas concentrações que alcançam o sangue e tecidos (GOMES et al., 2008). Mesmo com estas variáveis foi observado efeito aditivo significativo do óleo na imunidade humoral de mucosas no nível mais baixo utilizado.

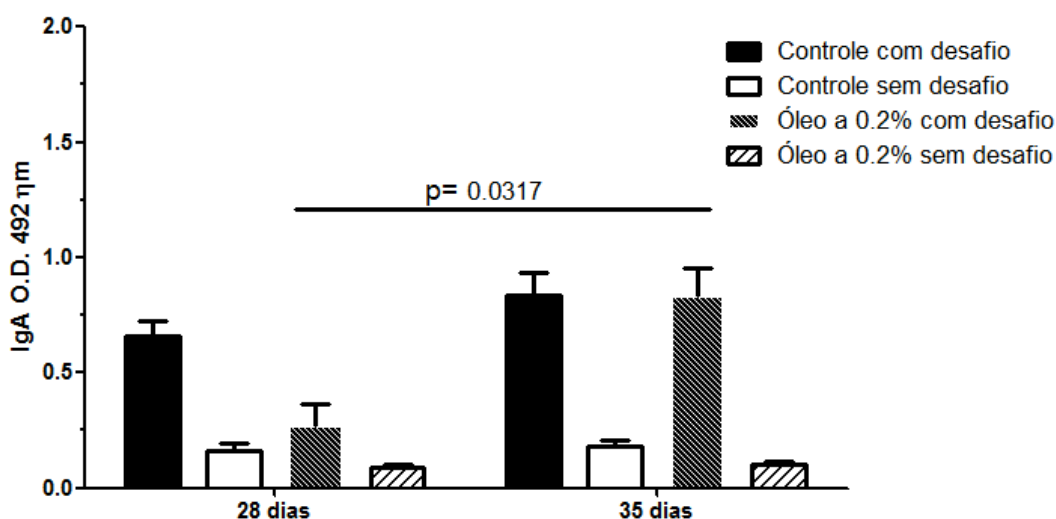


Figura 12. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de soro sanguíneo das aves aos 28 dias e 35 dias de idade. Legenda: Barras pretas – aves desafiadas com *Escherichia coli* patogênica no quarto dia e vigésimo segundo dia de idade. Barras brancas - aves não desafiadas com *Escherichia coli*. Grupo controle (Controle negativo) não receberam tratamento com óleo-resina de copaíba. O grupo promotor de crescimento antibiótico (Controle positivo) receberam colistina a 10 ppm durante todo o período experimental. Estão indicados na figura a média e desvio padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

Uma avaliação sistemática desse potencial e dos princípios ativos diferentes pelo qual sua ação é expressada necessita de maiores investigações.

5.3 Resposta imune celular

Na avaliação da imunidade celular verificada por meio da utilização do mitógeno fitohemaglutinina, os tratamentos não apresentaram diferença estatística em relação aos tratamentos controles.

Avaliando-se a resposta imune celular, pode-se observar que para todos os tratamentos após oito horas de inoculação da fitohemaglutinina, não foi influenciada pelos diferentes níveis de óleo-resina de copaíba em comparação ao grupo controle negativo e grupo controle positivo (Figura 13).

A mesma resposta pode ser observada após 24 horas de inoculação da fitohemaglutinina (Figura 14).

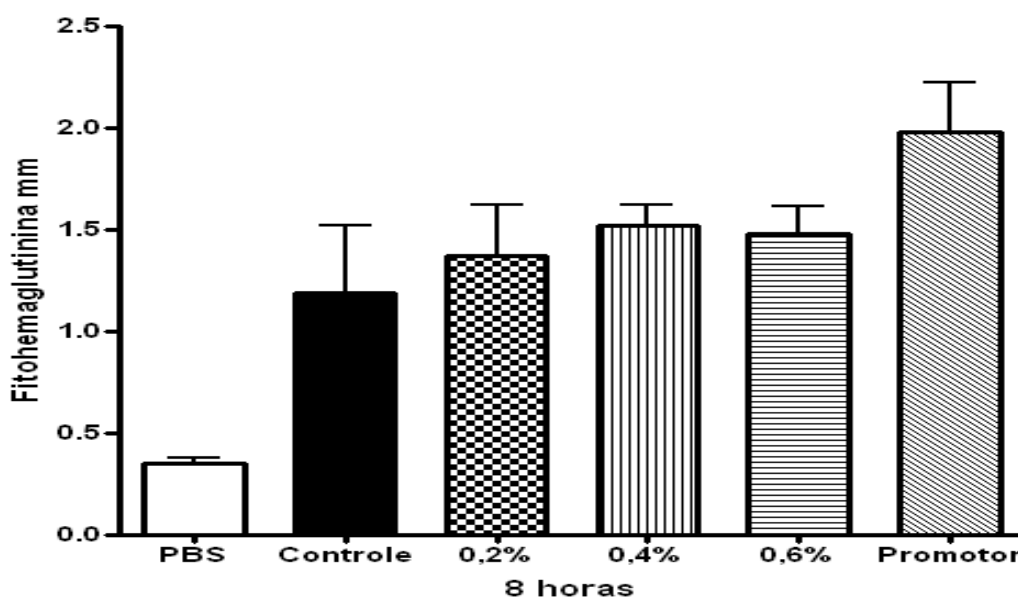


Figura 13. Espessuras (mm) dos espaços interdigitais após 8 horas de aplicação da fitohemaglutinina em comparação com o momento anterior a inoculação.

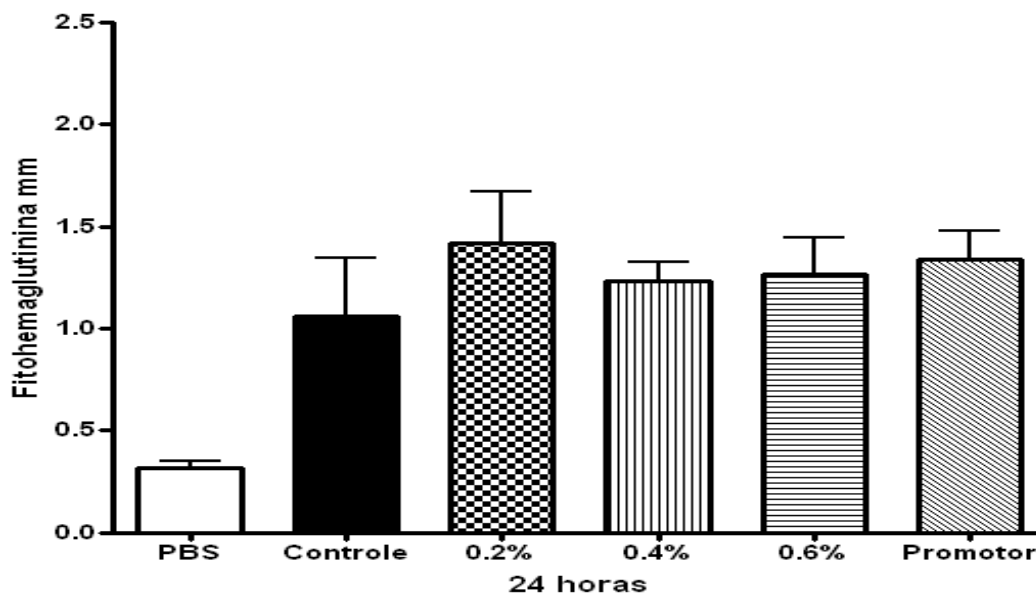


Figura 14. Espessuras (mm) dos espaços interdigitais após 24 horas de aplicação da fitohemaglutinina em comparação com o momento anterior a inoculação.

5.4 Peso relativo dos órgãos linfóides

O peso relativo dos órgãos linfóides foi avaliado como indicador da resposta imune celular e este não foi influenciado pelos níveis crescentes de óleo-resina de copaíba na dieta aos 35 dias de idade (Tabela 8).

Os níveis utilizados neste experimento não afetaram o peso do timo, baço e bursa, considerando desta forma, que o óleo-resina de copaíba não interfere na imunidade celular de frangos de corte.

A bursa de Fabrícus e o timo são órgãos fundamentais para o processo de maturação de linfócitos B e T, respectivamente (GLICK, 1986; MATELLER & THOMPSON, 1994), entretanto, FERREIRA et al., (2009) consideram que um maior peso dos órgãos linfóides não reflete completamente no maior número de linfócitos nestes órgãos.

Tabela 8 - Peso relativo dos órgãos linfóides de frangos de corte aos 35 dias de idade.

Peso Ave 35 dias (g)	Bursa 35 dias (g)	Baço 35 dias (g)	Timo 35 dias (g)
2107	4,49	2,19	10,17
2064	4,02	1,96	11,09
2149	4,03	2,08	10,32
2179	4,02	2,39	10,90
1978	4,50	1,99	9,99
1993	4,22	1,93	10,53
2123	4,54	1,99	11,40
0,394	0,180	0,088	0,126
0,050	0,800	0,188	0,602
0,050	0,731	0,212	0,054
8,58	29,11	21,95	19,45

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir sobre a utilização de óleo-resina de copaíba na dieta de frangos de corte:

- O óleo-resina de origem comercial de copaíba não apresentou efeito como aditivo promotor de crescimento em frangos de corte criados até 28 dias de idade.
- A adição de 0,2% de óleo-resina na dieta de frangos de corte apresentou efeito aditivo sobre a resposta imune humoral de mucosas.
- Não houve efeito sobre a resposta imune celular avaliada por meio do teste de reação cutânea à fitohemaglutinina e peso relativo dos órgãos linfóides.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de aditivos fitogênicos na produção animal é uma ferramenta importante para auxiliar nos avanços para a substituição aos quimioterápicos adicionados às rações.

Pelo exposto, novas perspectivas podem ser direcionadas para demonstrar a seletividade dos compostos presentes no óleo-resina, bem como testar o efeito destes compostos isoladamente e em comparação com o óleo bruto, possibilitando comparar e caracterizar o mecanismo de ação responsável pela ação imunoestimulante.

A investigação sobre os mecanismos de ação dos óleos vegetais demonstram avanços que irão fornecer o embasamento necessário para estabelecer a compatibilidade com a dieta e idade dos animais, avaliação de toxicidade e segurança destes aditivos, a fim de serem extensivamente incluídos nas formulações das rações como aditivos padronizados.

Em última análise, os estudos devem se concentrar em se obter informações dos óleos vegetais em estudos *in vivo* em que a dose-resposta, efeito da combinação com diferentes formulações da ração comercial e a contribuição da genética e criação animal sejam avaliadas para que possam fornecer aplicações práticas para a ciência animal.

Os resultados de tais estudos emergentes melhorará substancialmente a aplicação e utilização de fitogênicos na alimentação de aves de produção. Além disso, estes conceitos, devem estar em harmonia com as exigências dos mercados consumidores e o equilíbrio para a manutenção da produtividade nos sistemas de criação.

Considerando-se todos os testes realizados neste trabalho, demonstrou-se a dose de óleo com maior potencial para a utilização foi a inclusão no nível de 0,2%. Em vista do exposto, o conhecimento prévio das plantas na medicina popular permite verificar as potencialidades imunoestimulantes existentes no gênero *Copaifera* sp. e este estudo reforça que o óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) pode ser utilizado como promotor da saúde na produção de aves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A. K; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6a ed., Saunders, Rio de Janeiro, 2008.
2. ABDULKARIMI, R. & ABDULLAHZADEH, F. The effect of Mentha extract (*Mentha piperita*) on immune response in Broiler Chickens. **Journal of American Science**, 2011, v.7, n.12, p.82-85, 2011.
3. AITKEN, I. D., PARRY, S. H. AND DONNELLY, M. E. Collecting avian lachrymal fluid. **Veterinary Record**, v. 96, p. 491-492, 1975.
4. AKHTAR, M., HAI, A., AWAIS, M. M., IQBAL, Z., MUHAMMAD, F., HAQ, A., ANWAR, M. I. Immunostimulatory and protective effects of Aloe vera against coccidiosis in industrial broiler chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 170-177, 2012.
5. ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como promotores do crescimento. In: _____. **Farmacologia aplicada à avicultura: Boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 9, p. 149- 159.
6. AMOS, W. M. G. **Imunologia básica**. Zaragoza: Editorial Acriba S.A>, 1981. Cap. 7, p.54-64.
7. AZEREDO, Gustavo Naressi de; SAMPAIO, Paulo de Tarso Barbosa. Produtividade de óleo- resina de *Copaifera* spp. Em populações naturais na Província Petrolífera de Urucu. In: REUNIÃO CIENTÍFICA DA REDE CTPETRO AMAZÔNIA, 3., 2010, Manaus. [Anais...] Manaus: Rede CTPetro, 2010.
8. BEIRÃO, B.C.B. Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo, 2011, 135p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

9. BHAT, B. G.; CHANDRASEKHARA, N. Studies on metabolism of piperine: absorption, tissue distribution and excretion of urinary conjugates in rats. **Toxicology**, Limerick, v. 40, n. 1, p. 83-92, 1986.
10. BLECHA, F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, Philadelphia, v.17, n.3, p.621-633, Nov. 2001.
11. BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. **Animal feed science and technology**, Amsterdam, v. 158, n. 1, p. 1-14, 2010.
12. BRITO, N.M.B., BRITO, M.V.H., CARVALHO, R.K.V., MATOS, L.T.M.B., LOBATO, R.C., CORREA, S.C., BRITO, R.B. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.25, p. 176-180, 2010.
13. BRONZONI, R. V. M. et al. Detection of Infectious Bronchitis Virus and Specific Anti-Viral Antibodies using a concanavalin A-Sandwich-ELISA. **Viral Immunology**, v. 18, n. 3, p. 569-578, 2005.
14. BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003. p. 167-182.
15. BUTLER, J.E. Immunoglobulin diversity, B cell and antibody repertoire development in large farm animals. **Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Epizooties**, v. 17, p. 43-70, 1998.
16. CARNEIRO, M.R.B. A flora medicinal no centro-oeste do Brasil: um estudo de caso com abordagem etnobotânica em Campo Limpo de Goiás. [online]. 2009. 242 p. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e

Meio Ambiente) - Centro Universitário de Anápolis, Anápolis. Disponível em: http://www.unievangelica.edu.br/gc/imagens/file/mestrados/artigos/CARNEIRO,%20M_R_B_,%202009.pdf

17. CARON, L. F. O sistema imune das aves e a resposta às vacinações. In: Curso de sanidade avícola, Jaguariúna, SP. **Anais...** Jaguariúna: 2008.

18. CHAVAN, M.J., WAKTE, P.S., SHINDE, D.B. Anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v.17, p.149-151, 2010.

19. CIRIACO, E.; PINERA, P.P.; DIAZ-ESNAL B., LAURA, R. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). **Microscopy Research and Technique**, v.62, p. 482–487, 2003.

20. COOPER, M. D., PETERSON, R. D. A., GOOD, R. A. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. **Nature**, v. 205, p. 116-143, 1965.

21. COOPER, M. D., PETERSON, R. D. A., SOUTH, M. A., GOOD, R. A. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. **Journal of experimental medicine**, v. 123, p. 75-102, 1966.

22. COSTA, L. B.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 589–595, 2007.

23. CROSS, D.E., MCDEVITT, R.M., HILLMAN, K., ACAMOVIC, T. 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, p.496-506, 2007.

24. DAVISON, F. The importance of the avian immune system and its unique features. In: _____ **Avian Immunology**. 1. Ed. San Diego: Elsevier, 2008. cap.1, p. 1-11.
25. DEUS, R.J.A.; CARVALHO, A.S.C.; BANNA, D.A.D.S.; ARRUDA, M.S.P.; ALVES, C.N.; SANTOS, A.S. Efeito fungitóxico in vitro do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, 347–353, 2009.
26. DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 1–7, 2011.
27. DIBNER, J.J., RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, v.84, p. 634-643, 2005.
28. DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 699, p. 23–28, 2010
29. DOHMS, J. E., SAIF, Y. M. Criteria for evaluating immunosuppression. **Avian Diseases**, v.28, n. 2, p. 305-10, 1984.
30. DORMAN H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.
31. EMMERSON, D.AA. Commercial approaches to genetic selection for growth and feed conversion in domestic poultry. **Poultry Science**, v. 76, p. 1121-1125, 1997.
32. ERTAS, O.N., GULER, T., CIFTCI, M., DALKILIC, B. SIMSEK, U.G. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler

performance. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, p.879-884, 2005.

33. FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; LADEIRO, F.; VENANCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J. C.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 35– 40, 2003.

34. FERNANDES, R. M.; PEREIRA, N. A.; PAULO, L. G. Anti-inflammatory activity of copaíba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 53–6, 1992.

35. FERNANDES, T.T., SANTOS, A.T.F., PIMENTA, F.C. Atividade antimicrobiana das plantas. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.2, p.113-122, 2005.

36. FERREIRA, S.R., MURAKAMI, A.E., SIQUEIRA, T.G.V., SANTOS, J.M.G., POTENÇA, A., SANTOS, T.C. Níveis crescentes de parede de levedura sobre a resposta imune celular e perfil hematológico de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, 2009.

37. FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KATO, R. K.; MURGAS, L. D. S. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6 (supl.), p. 2316-2326, 2005.

38. GANAPATHY, K., CARGILL, P. W., JONES, R. C. A comparison of methods of inducing lachrymation and tear collection in chickens for detection of virus-specific immunoglobulins after infection with infectious bronchitis virus. **Avian pathology**, v.34, n. 3, p.248-251

39. GHAZALAH, A.A., ALI, A.M. Rosemary leaves as a dietary supplement for growth in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.3, p.234-239, 2008.
40. GINNS, C. A., BROWNING, G.F., BENHAM, M.L., WHITHEAR, & K. G. Development and application of an aerosol challenge method for reproduction of avian colibacillosis. **Avian Pathology**, v.27, p. 505-511, 1998.
41. GLICK, B. Immunophysiology, p.87-101. In: _____Sturkie P.D. (Ed.), **Avian Physiology**. 4 ed. Kingsport Press: Tennessee. 685p. 1986
42. GLICK, B. Embryogenesis of bursa of Fabricius: stem cell, microenvironment, and receptor-paracrine pathways. **Poultry Science**, v. 74, p. 419-426, 1995.
43. GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; HOVELL, A.M.C.; LANDGRAF, R.G.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid ehrlich tumor. **Journal Ethnopharmacology**, v. 119, 179–184, 2008.
44. GOREN, A.C.; PIOZZ, F.; AKCICEK, E.; KILIÇ, T.; ÇARIKÇL, S.; MOZIOGLU, E.; SETZER, W.N. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 448–453, 2011.
45. GOTO, N.; KODAMA, H.; OKADA, K. et al. Supression of phytohemagglutinin skin response in tymectomized chickens. **Poultry Science**, v.57, p.246-250, 1978.

46. GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 62, n. 2, p. 279–290, 2003.
47. GUO, Y.M. ALI, R.A., QURESH, M.A. The influence of β -glucan on immune responses in broiler chickens. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.25, p. 461-472, 2003.
48. GUO, F. C.; KWAKKEL, R. P.; WILLIAMS, B. A.; PARMENTIER, H. K.; LIS, W. K.; YANG, Z. K.; VERSTEGEN, M. W. A. Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral responses of *Eimeria tenella*-infected chickens. **Poultry Science**, New York, v. 83, n. 7, p. 1124-1132, 2004.
49. HASHEMI, S.R., ZULKIFLI, I., ZUNITA, Z., SOMCHIT, M.N. The effect of selected sterilization methods on antibacterial activity of aqueous extract of herbal plants. **Journal of Biological Sciences**, v.8, p.1072-1076, 2008.
50. HASHEMI, S. R.; DAVOODI, PhytoGenics as a new class of feed additive in poultry industry. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Oxford, v. 9, p. 2295–, 2304, 2010.
51. HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. **Veterinary Research Communications**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 169–180, 2011.
52. HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 105–116, 2012.
53. HASSAN, J. O. Detection of *Salmonella typhimurium* infection of chickens by indirect ELISA. **Veterinary Record**, v. 126, p. 519 -522, 1990.

54. HELLER, E.D., LEITNER, G., DRABKIN, N., MELAMED, D. Passive immunization of chicks against *Escherichia coli*. *Avian Pathology*, v.19, p. 345-354, 1990.
55. HOLT, P. S.; STONE, H. D.; MOORE, R. W.; GAST, R. K.; Development of a lavage procedure to collect lung secretions from chickens for evaluating respiratory humoral immunity. *Avian Pathology*, Athens, v. 34, n. 5, p. 396–398, 2005.
56. HUYGHEBAERT, G. Replacement of antibiotics in poultry. **Proceedings of the Eastern Nutrition Conference**. Quebec , Canadá. Quebec : UON, 2003.
57. JAFARI, R.A., RAZI JALALI, M., GHORBANPOOR, M., MARASHIAN SARAEI, S.M.R. Effect of dietary garlic on immune response of broiler chicks to live newcastle disease vaccine. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.14, p. 1848-1851, 2008.
58. JALKANEN S., GRANFORS K., JALKANEN M., TOIVANEN P. Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 hr of incubation: failure of produce immune, natural, and autoantibodies in spite of immunoglobulin production. **Cell Immunology**, v. 80, p. 363-373, 1983.
59. JEURISSEN, S. H. M.; VERVELDE, L.; JANSE, E.M. Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. **Poultry Science Review**, v. 5, p. 183-207, 1994.
60. JEURISSEN, S. H. M.; LEWIS, F.; KLIS, J.D.V.; MROZ, Z.; REBEL, J.M.J.; HUURNE, A.A.H.M. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity and functionality. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v.3, p. 1-14, 2002.

61. JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBOECK, B.; SMITH, A.L.; GÖBEL, T.W.F. Avian innate immune responses. In: _____ **Avian Immunology**. 1. Ed. San Diego: Elsevier, 2008. cap. 2, p. 13-50.
62. KAISER, P. The long view: a bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre- and post- genome. **Avian Pathology**, v. 41, n. 6, p. 511-518, 2012.
63. KANELLOPOULOS, J.M., PETRIS, S., LECA, G., CRUMPTON, M.J. The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v.15, p. 457-486, 1985.
64. KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MARZ, R.; SHINDLER, G.; GRAEFE, E. U.; VEIT, M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, n.6, p. 495-505, 2000.
65. KOIYAMA, N. T. G. **Aditivos fitogênicos na produção de frangos de corte**. [online]. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/93837?show=full>
66. KUBO, I.; Chaudhuri, S.K.; KUBO, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Saito, T.; Ishikawa, H.; Haraguchi, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v. 62, p. 427-430, 1996.
67. KUMAR, S., GUPTA, P., SHARMA, S., KUMAR, D. A review on immunostimulatory plants. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v.9, n.2, p.117- 128, 2011.
68. LANCELLOTTI, M.; MONTASSIER, H.J. . Relationship between tear antibody levels and immunity to infectious bronchitis virus. In:_____ | **Mercosul Symposium on respiratory viruses**, 2002, Ribeirão Preto. | **Mercosul Symposium on respiratory viruses**, 2002.

69. LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: A visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. **Anais...** Santos: APINCO, 2005. p. 21-33.
70. LEANDRO, L.M., VARGAS, F.S., BARBOSA, P. C. S., NEVES, J. K.O., SILVA, J.A., VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v.17, p. 3866-3889, 2012.
71. LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1643–1647, 2007.
72. LIMA, S.R.M., VEIGA, V.F., CHRISTO, H.B., PINTO, A.C., FERNANDES, P.D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1048–1053, 2003.
73. LIU, X.Y. Stress and immunity. In:_____ **Poultry Immunology**, ed. Yin, China Agriculture Press, Beijing, China v. xx, p. 230-252, 1999.
74. MAKARE, N., BODHANKAR, S., RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 78, p. 133-137. 2001.
75. MARTIN, L.B., HAN, P., LEWITTES, J., KUHLMAN, J.R., KLASING, K.C. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. **Functional Ecology**, v. 20, p.290-299, 2006.
76. MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D.C. DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220p.

77. MASTELLER E.L., THOMPSON, C.B. B cell development in the chicken. **Poultry Science**, v. 73, n. 7, p. 998-1011, 1994.
78. MELLOR, S. Herbs and spices promote health and growth. **Pig Progress**, v.16, n.4, p. 18-21, 2000.
79. MELO, J. G., SANTOS, A.G., AMORIM, E.L.C., NASCIMENTO, S.C., ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2011.
80. MENDES, A. A. O ajuste do uso de aditivos em rações e as preferências do consumidor. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia:SBZ, 2005. p. 183-186.
81. MENDONÇA, D. E., ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba- *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 577-581, 2009.
82. MILLET, S., BENNETT, J., LEE, K.A., HAU, M., KLASING, K.C. Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. **Developmental and Comparative Immunology**, v.31, p. 188-201, 2007.
83. MISQUITH, S., RANI, P.G., SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n. 48, p. 30393-30401, 1994.
84. MITSCH, P., ZITTER-EGLSEER,K., KOHLER, B., GABLER, C., LOSA, R., ZIMPERNIK, I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chicken. **Poultry Science**, v.83, p. 669-675, 2004.

85. MORGULIS, M. S. IMUNOLOGIA APLICADA. IN:_____ MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. P. 375.
86. NOBAKHT, A. NOBAKHT, M., SAFAMEHR, A.R. The effect of different levels of savory medicinal plant (*Satureja hortensis* L.) on growth performance, carcass traits, immune cells and blood biochemical parameters of broilers. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n.10, p. 1456-1461, 2012.
87. NUNES, A. D. **Influencia do uso de aditivos alternativos a antimicrobianos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte** [online]. 2008. 112 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-19032008-134523/pt-br.php>. Acesso em: 02 nov. 2011.
88. OCAK, N., ERENER, G., BURAK., AK. F., SUNGU, M. ALTOP, A., OZMEN, A. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 4, p.169-175, 2008.
89. OHSAKI, A. et al. The isolation and in vivo potent antitumour activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, p. 2889–92, 1994.
90. OLÁH, I., VERVELDE, L. Structure of the lymphoid system. In: _____ **Avian Immunology**. 1. Ed. San Diego: Elsevier, 2008. cap. 2, p. 13-50.
91. OZAKI, H., ESAKI, H., TAKEMOTO, K., IKEDA, A., NAKATANI, Y., SOMEYA, A., HIRAYAMA, N., MURASE, T. Antimicrobial resistance in fecal

Escherichia coli isolated from growing chicken on comercial broiler farms. **Veterinary microbiology**, 2011.

92. PACHECO, T. A. R. C., BARATA, L.E.S, DUARTE, M.C.T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp.) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p.123-124, 2006.

93. PALERMO, J. N. Uso de Medicamentos Veterinários: Impactos na Moderna Avicultura. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários e Zootecnistas, 2006. p.

94. PARISOTTO, E. B. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de *Cordia verbenaceae*** [online]. 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/93837?show=full>

95. PELISSARI, G. P. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum*** (RICH. IN PERS.) DC. (ASTERACEAE). 2008. 177 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Júlio de Mesquita (UNESP), Araraquara.

96. PERIC, L., MILOSEVIC, N., DUKIC-STOJCIC, M., BJEDOV, S. Effect of phytogenic products on performance of broiler chicken. **World Nutrition Forum**, Nottingham University, Mayrhofen, Austria, 2008.

97. PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): Histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

98. PIERI, F.A.; SOUZA, C.F.; COSTA, J.C.M.; BARRERO, M.A.O.; ESPECHIT, I.F.; SILVA, V.O.; MOREIRA, M.A.S. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, 1929–1934, 2011.
99. PIERI, F. A., SILVA, V. O., SOUZA, C. F., COSTA, J. C.M., SANTOS, L. F. MOREIRA, M. A. S. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241-244, 2012.
100. PLOWDEN, C. Notes on economic plants. **Economic Botany**, v.58, n.4, p.729–739, 2004.
101. PUNTUREE, K.; WILD, C. P.; VINITKUMNEUN, U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 183-189, 2004.
102. QURESHI, M. A.; HUSSAIN, I.; HEGGEN, C.L. Understanding immunology in disease development and control. **Poultry Science**, v.77, n. 8, p. 1126- 1129, 1998.
103. QURESHI, M. A. Interação entre nutrição e o sistema imune e produtividade das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Facta, 2002. P. 243-254.
104. RIBAS, J., CARRENÕ, A.M., Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, p.33-38, 2010.
105. RIZZO, P. V.; MENTEN, J. F. M.; RACANICCI, A. M. C.; SANTAROSA, J. Foundation and perspectives of the use of plant extracts as performance enhancers in broilers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 195-204, 2008.

106. ROITT I.M., **Fundamental Immunology**, Raven Press, New York, 1993.
107. ROSÁRIO, M.M.T., NOLETO, G.R., BENTO, J.F., REICHER, F., OLIVEIRA, M.B.M., PETKOWICZ, C.L.O. Effect os storage xyloglucan on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v.69, p. 464-472, 2008.
108. ROSÁRIO, M.M.T.; KANGUSSU-MARCOLINO, M.M., AMARAL, A.E., NOLETO, G.R., PETKOWICZ, C.L.O. Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. **Chemico- Biological Interactions**, v.189, p.127-133, 2011.
109. ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição dos alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2005. p. 54 -56.
110. SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P. 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.
111. SARTORI, J. R.; FASCINA, V. B.; CARVALHO, F. B.; GONZALES, E. Atualidades em aditivos: óleos essenciais, prebióticos e probióticos. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 9., 2009, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Goiana de Avicultura, 2009. p. 54.
122. SCHEUERMANN, G.N., CUNHA, A.J., CYPRIANO, L., GABBI, A.M. Aditivo fitogênico como alternativa aos promotores de crescimento em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 39, n.2, 2009.
113. SILVA, B. P., PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignyia phalerata*. **Fitoterapia**. v.72, p. 887-893. 2001

114. SILVA, L. C. R. Avaliação toxicológica e efeito do extrato acetato de etila da fibra de Cocos nucifera L. (Palmae) sobre a resposta inflamatória in vivo. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.11, n.4, p. 429-434, 2009.
115. SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p. 180–188, 2007.
116. SILVA, L.M.G.S. Níveis de arginina digestível para fêmeas reprodutoras de frangos de corte e sua progênie, 2010. 113 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringa.
117. ŚMIATEK, M., TYKALOWSKI, B., STENZEL, T., KONCICKI, A. Local immunity of respiratory mucosal system in chickens and turkeys. **Polish Journal of veterinary Sciences**, v.14, n.2, p. 291-297, 2011.
118. SMITH-PALMER, A, STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p.118-122, 1998.
119. SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five import food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118-122, 1998.
120. TAHERI, H.R., RAHMANI, H.R. POURREZA, J. Humoral immunity of broilers is affected by oil extracted propolis (OEP) in the diet. *International Journal of Poultry Science*, v.4, n.6, p.414-417, 2005.
121. TELLA, J.L., LEMUS, J.A., CARRETE, M., BLANCO, G. The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds. **Plos One**, v.3, n.9, 2008.
122. TIZARD, i. **An introduction to Veterinary Immunology**. 6th Ed. New York: WB Saunders Company, (2000)

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

124. TRAESEL, C. K.; LOPES, S. T. A.; WOLKMER, P.; SCHIMIDT, C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos e promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. *Ciência rural*, Santa Maria, v. 41, n.2, p.278- 284. 2011

125. TUNG, Y.T., CHUA, M.T., WANG, S.Y., CHANG, S.T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous Cinnamon (*Cinnamomun osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3908-3913, 2008.

126. TURNER, R. J. **Immunology: a comparative approach**. New York: John Wiley and Sons, 1994. P. 148-150.

127. VEIGA Jr., V. F., PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

128. VIANA, M.A.O.; AGUILAR, C.A.L.; LIMA, K.R.S. et al. Efeitos dos níveis de inclusão do óleo essencial de copaíba (*Copaifera reticulata*) sobre o desempenho de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47, 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010. CDROM

129. WENDLER, K. R. Botânicos, da medicina tradicional a melhoradores de desempenho na produção animal. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3., 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Pork Expo, 2006. p. 213-224.

130. WENK, C. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. In: International Symposium on "Recent Advances in Animal Nutrition", 2002, New Delhi. Anais...New Delhi: India, 2002.

131. WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on uña de gato and sangre de grado. **Alternative Medicine Review**, v. 6, p. 567, 2001.

132. WINDISCH, W., KROISMAYR, A. The effects of phytobiotics on performance and gut function in monogastrics, **Biomim World Nutrition Forum**, online, [http:// http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/forums/the-effect-phytobiotics-performance-t4870/p0.htm](http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/forums/the-effect-phytobiotics-performance-t4870/p0.htm), 2006.

133. WINDISCH, W.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 14, p. 140-148, 2007.

134. WISEMAN, S. A.; BALENTTINE, D. A.; FREI, B. Antioxidants in tea. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 37, n. 8, p. 705-718, 1997.

135. XIAO-LING, Z., CHEN, A., LIN, Z. Ganoderma lucidum polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.11, p. 219-226, 2007.

136. ZHENG, G.Q., KENNY, P.M., LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

137. ZUANON, J.A.S., FONSECA, J.B., ROSTAGNO, H.S., SILVA, M.A. Efeito de promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n.5, p.999-10005, 1998.

138. YANG, Y., IJI, P.A., CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: A review of the role of six kinds of alternative to infeed antibiotics. **Worlds Poultry Science Journal**, v.65, p.97-114, 2009.