

Efeito do uso de **SIMBIÓTICO** na resposta imune humoral inespecífica em equinos

“Effect of symbiotic use on non-specific humoral immune response in horses”

“Efecto del uso de simbióticos en la respuesta inmune humoral inespecífica en los caballos”

André Galvão Cintra*

agcintra@gmail.com

Prof. Especialista, Médico

Veterinário Autônomo

Stefani Navarro Fachini

stefanifachinivet@gmail.com

MV Autônomo. Graduada pela

Unifaj

João Vitor Navarro Pedro

joaovitornavarrop@gmail.com

Graduando em medicina

veterinária pela Unifaj

Cintia Manzatto Baldin

cintia_baldin@hotmail.com

Profa MSc Unimax e Unifaj

*autor para contato

RESUMO: Realizou-se a análise sobre a influência do simbiótico na manutenção da saúde e qualidade de vida de equinos de diversas idades e portes, de ambos os sexos. Dez animais alimentados com uma dieta controlada e balanceada e submetidos diariamente a esforço físico foram suplementados com 15 gramas diários de suplemento simbiótico comercial composto de *Saccharomyces cerevisiae* + MOS (manano-oligosacarídeo). No experimento os animais foram comparados a eles mesmos em situações recorrentes, em ciclos. Foram coletadas amostras sanguíneas para avaliações qualitativas e quantitativas dos leucócitos e linfócitos para verificação da resposta imunológica. Nas condições propostas para o estudo os resultados foram inconclusivos.

Unitermos: probióticos, leveduras, imunologia

ABSTRACT: It performed an analysis on the influence of health maintenance and quality of life of horses of different ages and portions, of both sexes. Ten animals fed a controlled and balanced diet and submitted to physical exercise with supplements with 15 grams of commercial symbolic supplement composed of *Saccharomyces cerevisiae* + MOS (manano-oligosaccharide). No animal experiments were compared to themselves in recurrent situations, in cycles. Blood tests were collected for qualitative and quantitative tests of leukocytes and lymphocytes to verify the immune response. Under the conditions proposed for the study of results were inconclusive.

Keywords: probiotics, yeast, immunology

RESUMEN: Se realizó el análisis de la influencia del simbiótico en el mantenimiento de la salud y la calidad de vida de caballos de diferentes edades y tamaños, de ambos sexos. Diez animales alimentados con una dieta controlada y equilibrada y sometidos a esfuerzo físico diariamente fueron suplementados con 15 gramos diarios de un suplemento simbiótico comercial compuesto por *Saccharomyces cerevisiae* + MOS (manano-oligosacárido). En el experimento, los animales se compararon con ellos mismos en situaciones recurrentes, en ciclos. Se recogieron muestras de sangre para evaluaciones cualitativas y cuantitativas de leucocitos y linfocitos para verificar la respuesta inmune. En las condiciones propuestas para el estudio, los resultados no fueron concluyentes.

Palabras clave: probióticos, levaduras, inmunología

INTRODUÇÃO

Para que ocorra uma ideal absorção de nutrientes e fontes de energia das forrageiras foi necessário que o cavalo evoluísse de forma a que desenvolvesse um sistema digestório muito eficiente. A digestão dos equinos é dividida em duas etapas, sendo uma essencialmente enzimática, que ocorre no estômago e intestino delgado, enquanto outra é a microbiana, acontecendo no intestino grosso, ceco e cólon. Entretanto, a flora digestiva está ativa por todo o aparelho digestivo do cavalo³.

Deve-se entender os princípios básicos da bioquímica e fisiologia para alimentar os cavalos da forma mais eficiente com alimentos que possam completar os requisitos nutricionais de maneira equilibrada e que nem todo alimento está ausente de contaminações por micro-organismos, podendo ter fatores antinutricionais ou mesmo substâncias tóxicas para os animais¹⁷.

A microbiota digestiva é altamente específica quanto ao tipo de alimento, sendo volumoso ou concentrado, podendo variar diversas vezes ao dia. Portando, deve-se evitar mudanças radicais e constantes da dieta do cavalo, isso pode acarretar distúrbios metabólicos e outros problemas digestórios, comprometendo a saúde do animal².

Os probióticos são micro-organismos vivos que conferem ao

animal benefícios à saúde quando administrados em doses e concentrações adequadas. Podem ser utilizados em ocasiões que proporcionam estresse, como na desmama, mudanças na dieta, ingestão do colostro, transporte, superlotação de animais, doenças concorrentes e durante o tratamento com antibióticos⁵.

Simbióticos são substâncias utilizadas na alimentação animal composta de probiótico mais prebiótico. O uso de probióticos, classificado pela indústria alimentar animal como aditivo, tem como objetivo favorecer o desempenho zootécnico dos animais, isto é, melhorar a performance fisiológica, bioquímica e imunológica. Prebióticos são substâncias alimentares não digeríveis pelo organismo animal que têm como função fortalecer ou estimular o crescimento da flora intestinal saprófita (benéfica), natural ou não do animal, tornando-a mais capacitada para aproveitar os nutrientes oferecidos pelos alimentos. Dentre os diversos resultados observados na utilização de simbióticos aos equinos está a melhora no estado de saúde, especialmente em razão da elevação das defesas imunitárias sistêmicas e locais³.

Os probióticos em conjunto com os prebióticos têm a capacidade de modulação de respostas imunes sistêmicas, aumentando o número e a atividade de células fagocitárias dos animais. O estímulo imune produz ativação de macrófagos, proliferação de

células T e produção de Interferon, determinando um efeito positivo na imunidade das mucosas²⁰.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os benefícios do uso de simbiótico na resposta imune humoral inespecífica através da avaliação do número de leucócitos e linfócitos sanguíneos de equinos com alimentação equilibrada e suplementada com *Saccharomyces cerevisiae* + MOS (manano oligossacarídeo).

REVISÃO DE LITERATURA

A Imunidade Humoral

A imunidade humoral é mediada por anticorpos que se ligam a micro-organismos extracelulares e suas toxinas, que são neutralizados ou são alvos para a eliminação por fagócitos e pelo sistema complemento¹.

Existem dois tipos principais de linfócitos: os linfócitos B (LB) que amadurecem na medula óssea, e os linfócitos T, que amadurecem no timo. A medula óssea e o timo são conhecidos como órgãos linfoides centrais⁹.

Os linfócitos B são primeiramente produzidos no saco vitelino, posteriormente, durante a vida fetal, no fígado e concluindo na medula óssea. As células que vão se diferenciar em LB permanecem na medula óssea durante sua maturação e os LB deixam a medula e entram na circulação, migrando para os órgãos linfoides secundários. As moléculas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos nos LB são as imunoglobulinas de membrana, IgM e IgD. Estas são a contrapartida dos receptores de linfócitos T e por analogia são denominados receptores de linfócitos B em alguns contextos¹⁴. Os anticorpos neutralizam a infectividade dos micro-organismos e a patogenicidade das toxinas microbianas ligando-se e bloqueando a capacidade de se ligar nas superfícies celulares e interferindo na capacidade desses micro-organismos e toxinas de se ligarem às células hospedeiras¹.

A seleção clonal descreve o princípio operacional básico da resposta imune adaptativa, mas não os seus mecanismos. Diferentes patógenos possuem estilos de vida distintos, os quais requerem diferentes mecanismos não apenas para assegurar sua destruição, mas também para sua detecção e seu reconhecimento⁹.

O sistema complemento pode ser ativado nas superfícies microbianas sem anticorpos (o que é chamado de via alternativa, um componente da imunidade inata) e após a ligação de anticorpos aos antígenos (a via clássica, componente da imunidade humoral adaptativa). As proteínas do complemento são clivadas sequencialmente, e os componentes ativos, sobretudo C3B, se ligam a superfície, na qual os complementos são ativados¹.

A resposta imune adaptativa, quando for ativada para ajudar a eliminar os patógenos, demora em torno de 7 dias para ficar ativamente pronta e conta com a participação de linfócitos, que são células mais especializadas, capazes de ajudar a combater micro-organismos patógenos resistentes, além de conferir proteção para os micro-organismos por vários anos¹².

Uso de Probiótico na Nutrição Equina

A alimentação e o comportamento dos equinos estão relacionados a diversos fatores como o sistema de criação, quantidade e qualidade nutricional dos alimentos, quantidade de concentrado e volumoso ofertados a esses animais, manejo dos animais e o contato com outros animais¹⁸. A microbiota do sistema digestório dos equinos é responsável pela etapa mais longa do processo digestivo, a quebra e consequente aproveitamento da fibra da dieta¹⁹.

Os equinos são dependentes de bactérias e fungos que habitam seu aparelho digestivo para poder sobreviver. A flora do cavalo é específica quanto ao alimento podendo mudar mais de 100 vezes ao dia, por isso deve-se evitar mudanças bruscas na dieta³.

No decorrer dos últimos anos, os níveis de produção animal têm apresentado uma significativa evolução graças aos estudos em nutrição, melhoramento genético, sanidade e conforto dos animais e, para obter esses resultados, várias tecnologias surgiram para aprimorar e suprir a necessidade dos animais. Buscando um melhor desempenho animal e prevenção de doenças busca-se o uso de probióticos e prebióticos, que são alimentos que possuem micro-organismos que tem como principal função fortalecer a microbiota intestinal e ajudar no funcionamento do trajeto gastrointestinal¹⁵.

Nos últimos anos, pesquisaram-se alimentos como as rações com altos níveis de proteínas que possam substituir os mais tradicionais utilizados na alimentação dos equinos como milho, soja e trigo; no entanto para um correto uso destes “novos” alimentos, devem-se considerar fatores como palatabilidade, granulometria, higiene e valor, o mais importante para saúde dos animais e evitar doenças que possam acometer o trato gastrointestinal dos equinos⁸. Na produção de equinos a alimentação é um dos fatores que apresentam maiores custos. Então, o uso de aditivos nas dietas, é uma forma de torná-los mais aproveitáveis pelos cavalos. Dentre esses aditivos, estão os probióticos contendo micro-organismos que contribuem para uma melhor absorção dos nutrientes pelo organismo do animal⁷.

Os probióticos são definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam de forma benéfica o hospedeiro, atuando para promover o balanço de sua microbiota intestinal. Há alguns anos, busca-se o uso de probióticos para a melhoria da digestibilidade dos nutrientes na dieta dos equinos, especialmente sobre a fração fibrosa dos alimentos¹⁶.

Esses aditivos devem ser inócuos, manter-se viáveis por um tempo longo durante a estocagem e transporte, possuir resistência ao baixo pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal, não podem transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e possuir propriedades para combater mutações e o câncer⁴.

Também são produtos muito usados na recuperação de equinos que passam ou passaram por algum tipo de estresse como a deficiência de colostro, durante a desmama, em alterações bruscas de dieta, durante o transporte, quando há restrições hídrica e alimentar significativas, alterações climáticas bruscas, morbidades crônicas devido a manejos equivocados tais como laminites ou doenças gastroentéricas, como suplementos para animais com baixo score corporal e de terapia de longa duração, a fim de contornar o uso de antibióticos⁶.

A manutenção da flora bacteriana e o antagonismo de bactérias patogênicas no TGI são importantes mecanismos de defesa na prevenção da colonização por bactérias patogênicas. Preparados probióticos e outros destinados ao restabelecimento da flora normal no trato gastrointestinal são utilizados cada vez mais na clínica de equinos¹³.

Os produtos que contém lactobacilos quando armazenados em temperatura ambiente, não mantiveram as propriedades probióticas com esses micro-organismos vivos, salvo se armazenados a 4°C. O mesmo foi observado em produtos contendo *S. cerevisiae* na apresentação pasta; entretanto quando sua apresentação era em pó não foram encontrados problemas em seu armazenamento e em temperatura pelo prazo de 7 meses¹⁶.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Jaguariúna (protocolo nº043/2019) e realizado em um Centro de treinamento de cavalos, com animais da raça Quarto de Milha na cidade de Jaguariúna - SP. Foram avaliados 10 animais saudáveis (6 machos e 4 fêmeas não prenhes), com idades entre 3 e 18 anos e com peso corporal médio de 430 quilos.

Os animais tinham, como rotina diária, treinamentos de esforço médio a intenso para provas de três tambores; após o treinamento, eram soltos em piquetes separados e, no restante do tempo, confinados em baias individuais. A dieta consistia em ração concentrada comercial, em média 2 kg diários por refeição, três vezes ao dia, totalizando aproximadamente 6 kg por dia de concentrado por animal, feno de gramíneas em torno de 6 kg diários para cada animal e água à vontade.

Para avaliação do efeito do simbiótico na resposta humoral foram introduzidos 15 gramas diários de suplemento comercial em pó, composto de *Saccharomyces cerevisiae* + MOS (manano-oligosacarídeo), uma vez ao dia, por via oral, juntamente com o concentrado, em que os tratadores dessa propriedade ficaram encarregados de fornecer.

Durante a pesquisa, foram realizados três ciclos, sendo dispostos da seguinte forma: suplementados por 7 dias seguidos, depois tiveram período sem suplemento por 5 dias, receberam novamente o suplemento por outros 7 dias, passaram por mais 5 dias sem suplemento, receberam novamente o suplemento por outros 7 dias, passaram por mais 5 dias sem suplemento, dentro de um período de 31 dias como no modelo exemplificado da **Tabela 1**.

Tabela 1: Cronograma do projeto, demonstrando nos dias na cor laranja onde foram administrados 15 gramas de simbiótico e nos dias na cor azul, retiramos o aditivo da alimentação dos 10 animais

Ciclo	Dia	Dia							Dia			
1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
3	24	25	26	27	28	29	30	31				

De acordo com literatura, a resposta imune humoral leva uma média de sete dias para ser ativada através da ação dos linfócitos, por isso o período de suplementação, enquanto os cinco dias de intervalo foram realizados para observar uma queda após a suplementação devido ao período de latência estudado.

Nos dias 0, 7°, 12°, 19°, 24° e 31° foram coletadas amostras de sangue à vácuo em tubo com EDTA da veia jugular dos animais para a realização de análises hematológicas quantitativas e qualitativas. As amostras foram armazenadas em caixa de isopor com gelo e transportadas até a cidade de Paulínia onde, no mesmo dia, realizaram-se as leituras e interpretações.

Para a avaliação foi optado por realizar hemogramas dos animais para analisar a quantidade de linfócitos e leucócitos sanguíneos circulantes, visando observar eventual aumento na imunidade dos equinos. Esse exame foi o selecionado devido ao seu resultado rápido e baixo custo.

Os métodos utilizados para as análises laboratoriais foram os de confecções de esfregaços sanguíneos para avaliação leucocitária diferencial e observações sobre alterações na morfologia das célu-

las sanguíneas e as contagens celulares foram realizadas através do aparelho para exame hematológico automático (HEMOVET 2300 - **Figura 1**), no laboratório da Clínica Veterinária Ração Pet em Paulínia.



Figura 1: Aparelho de Contagem de Células Hematológicas (HEMOVET 2300)

Na última coleta do dia 31, os animais “g” e “h” foram vendidos e não teve-se mais acesso para realizar a coleta, portanto, as amostras não foram analisadas.

Ao longo do projeto os animais sofreram com transportes rodoviários para a participação de provas de Três Tambores em diversos lugares, e durante esses dias, o simbiótico pode não ter sido ofertado da maneira correta por terceiros.

Após a apuração de dados, utilizou-se o Teste “T” de Student utilizando o Excel/2013 para realização das análises estatísticas, onde a hipótese H_0 é o indicativo de que o simbiótico melhora a resposta imune celular inespecífica dos indivíduos.

RESULTADOS

As análises foram realizadas comparando os dias 0, 7° (Primeiro ciclo), 12° e 19° (Segundo ciclo), 24° e 31° (Terceiro ciclo). Desta forma, a estatística foi feita através do Teste T de Student utilizando duas amostras presumindo variâncias equivalentes com o nível de significância de 5%. A seguir, os estudos dos leucócitos totais e linfócitos realizados de forma separada por ciclo.

Na **Tabela 2**, avaliação dos leucócitos, podemos observar que, não houve diferença significativa na quantidade de leucócitos dos animais comparando dia 0 e 7° através do valor de Stat t de 2,01. Nos dias 12° e 19°, podemos observar que o Stat t foi de 0,68 mostrando que estatisticamente não houve influência significativa nos leucócitos totais também. E finalizando, o estudo dos dias 24° e 31° podemos observar através do stat t de 2,96 que houve diferença significativa no número de leucócitos totais, indicando uma queda na imunidade.

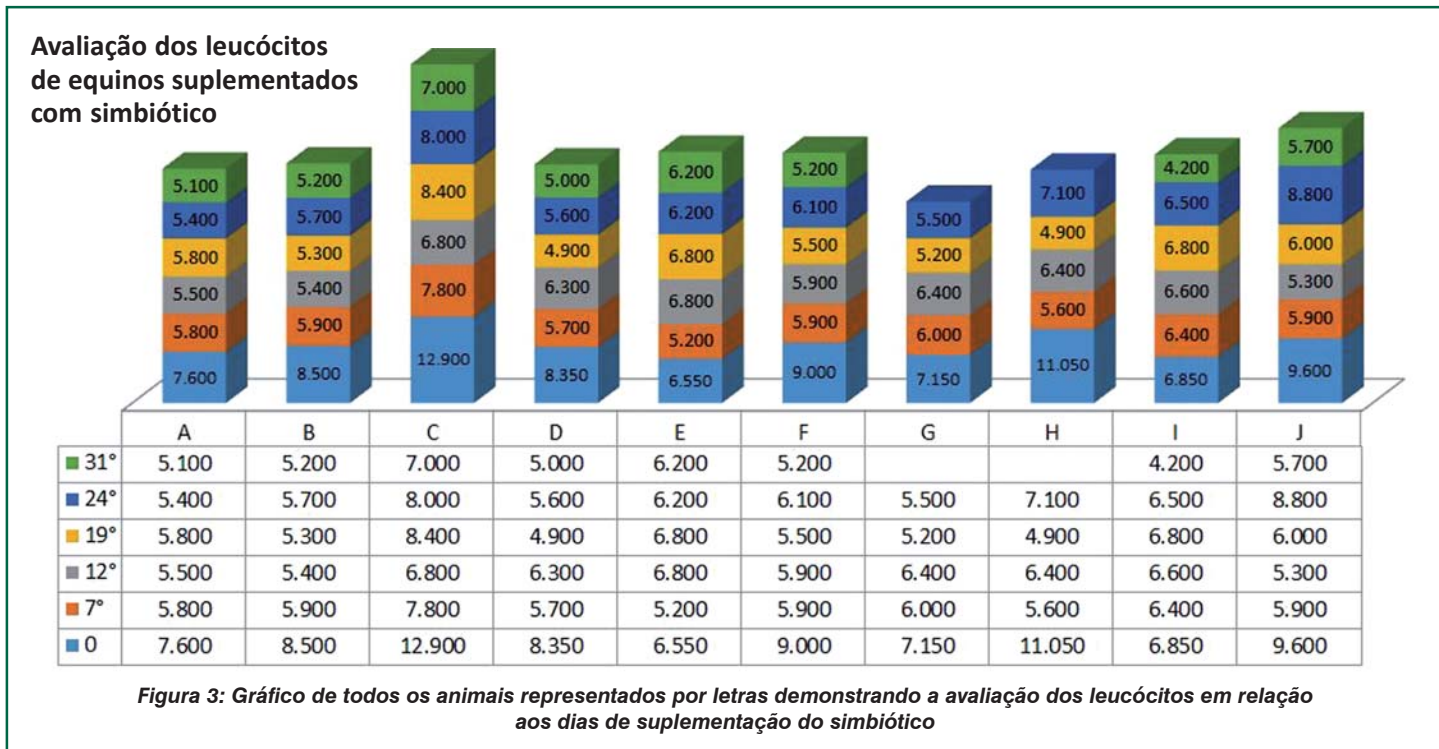
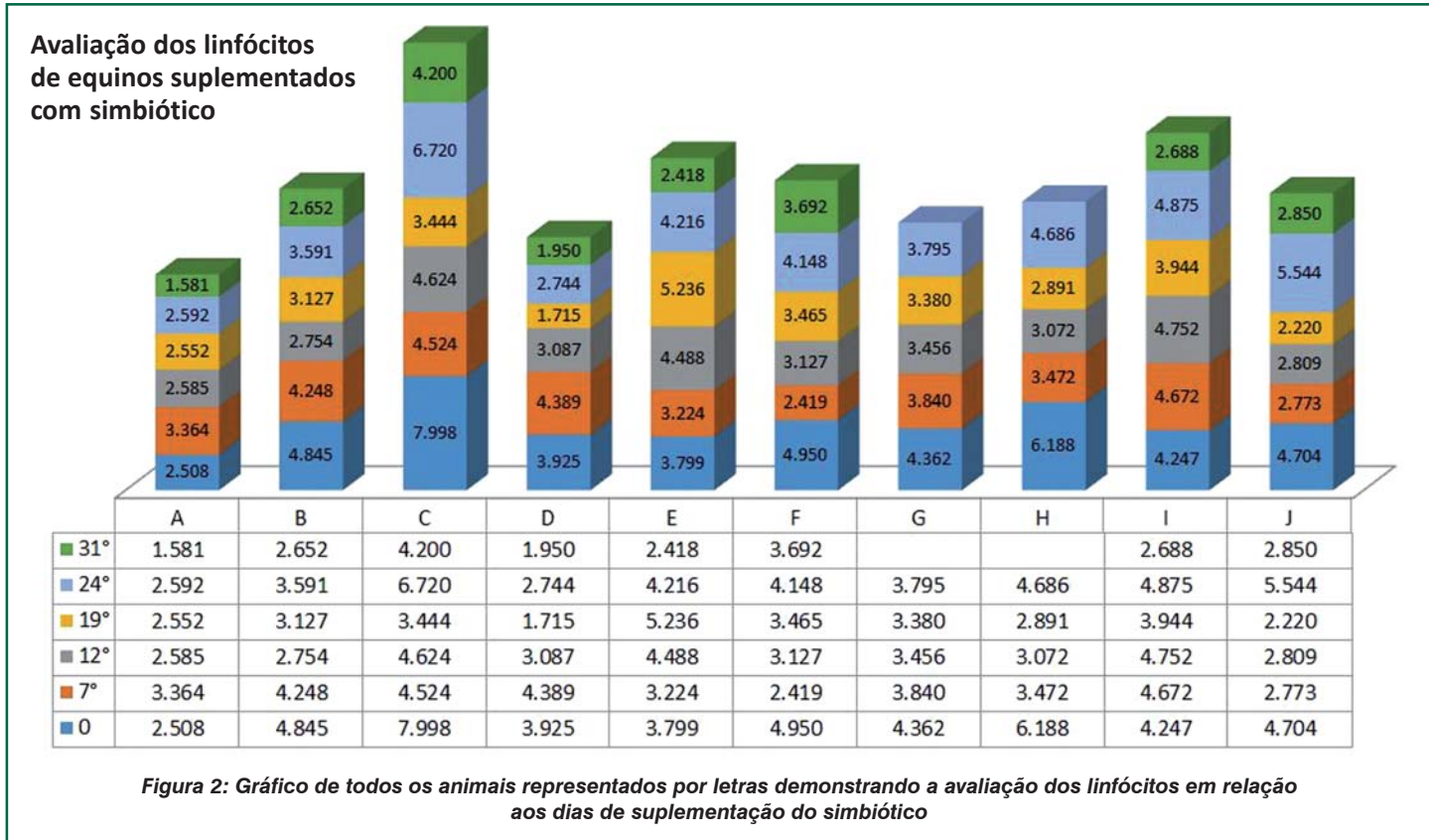
Na **Tabela 3**, avaliação dos linfócitos, podemos observar que o Stat t dos dias 0 e 7° é de 4,09 mostrando que estatisticamente

Tabela 2: Estudo estatístico dos Leucócitos totais de equinos suplementados com simbiótico

DIAS	STAT T	T CRÍTICO BI-CAUDAL
0 e 7º	2,011435837	2,10092204
12º e 19º	0,687537815	2,10092204
24º e 31º	2,963101045	2,10092204

Tabela 3: Estudo estatístico dos Linfócitos de equinos suplementados com simbiótico.

DIAS	STAT T	T CRÍTICO BI-CAUDAL
0 e 7º	4,091862199	2,10092204
12º e 19º	0,459212895	2,10092204
24º e 31º	2,136559572	2,10092204



obtivemos uma diferença significativa sobre essas células de defesa nas condições propostas nesse estudo, indicando que, mesmo com o simbiótico, ocorreu uma diminuição da imunidade dos animais. Nos dias 12º e 19º, o valor do *stat t* foi de 0,45 demonstrando que não houve influência significativa para a estatística. Enquanto nos dias 24º e 31º, apresentaram valor de *stat t* com significância indicando queda na imunidade durante a administração do simbiótico.

As **Figuras 2 e 3** demonstram as variações de linfócitos e leucócitos totais por animais, durante o projeto.

DISCUSSÃO

Os probióticos em conjunto com os prebióticos têm a capacidade de modulação de respostas imunes sistêmicas, aumentando o número e a atividade de células fagocitárias dos animais. Essa ação assume muita importância no sistema digestório, onde possui maior responsabilidade no desenvolvimento de imunidade geral nos animais. Os tecidos linfóides captam antígenos disponibilizados no trato digestório, como os probióticos e MOS, que estimulam as células B, precursoras de IgA e células T, colaboradoras das placas de Peyer para o desenvolvimento da mucosa onde há produção de anticorpos tipo IgA, que reduzem o número de patógenos no intestino. O estímulo imune produz ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de Interferon, determinando um efeito positivo na imunidade das mucosas²⁰.

Os produtos mais utilizados destinados aos equinos são as culturas de bactérias vivas *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e de *Bacillus subtilis* e as culturas de leveduras vivas, como a de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryza*¹¹.

Podemos considerar como causa provável dessa adversidade do resultado obtido no presente experimento sobre o efeito do simbiótico na imunidade a uma possível falha na administração do produto por terceiros, pois se corretamente administrado, assim como em todos os estudos encontrados, espera-se resposta positiva.

Os equinos sujeitos a transporte rodoviário prolongado ou frequente podem ter sua imunidade bastante comprometida, associada à imunossupressão que se observa durante 24 horas pós-transporte, assim como ocorreu com os animais do estudo que tinham participações em provas de Três Tambores, justificando essa queda na imunidade¹⁰.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que, nas condições propostas na pesquisa, os resultados foram inconclusivos, pois não foram realizados cuidados com a administração e periodicidade adequada para que o produto demonstrasse sua eficácia, demonstrando que, em quaisquer circunstâncias que se utilizem substâncias que visam o melhoramento de performance e estado de saúde de um animal, os cuidados e atenção na prescrição e fornecimento aos animais é de vital importância. +

Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Centro Universitário de Jaguariúna, UniFaj, sob número 043/2019.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
2. CINTRA, A.G. **O Uso de Probióticos para Equinos**. 2016b. Disponível em: <<https://meiorural.com.br/andrecintra/2016/08/07/o-uso-de-probioticos-para-equinos/>>. Acesso em: 30 mai. 2019.
3. CINTRA, A.G. **Alimentação Equina: Nutrição, Saúde e Bem-Estar**. Rio de Janeiro: Roca, 2016a. 354 p.
4. COPPOLA, M.D.M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, ago. 2004.
5. FERNANDEZ, P.C.C. *et al.* Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cad. Tec. Vet. Zootec.**, n.31, p.53-71, 2000.
6. FULLER, R. Probiotics in man and animals: A Review. **Journal of Applied Bacteriology**, n.66, p.365-378, Jan. 1989.
7. FURTADO, C.E. *et al.* Uso de levedura em equinos alimentados com dietas compostas de fenos de diferentes qualidades nutricionais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Maringá, v.39, n.10, p.2194-2199, ago. 2010.
8. FURTADO, C.E.; BRANDI, R.A.; RIBEIRO, L.B. Utilização de co-produtos e demais alimentos alternativos para dietas de equinos no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Maringá, v.40, n.2, p.232-241, mar. 2011.
9. JANEWAY JUNIOR, C.A.; TRAVERS, P. **Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença**. 2.ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
10. LECHONSKI, C. **O Sistema Imunológico dos Equinos**. 2017. Disponível em: <<https://cavalus.com.br/saude-animal/o-sistema-imunologico-dos-equinos/>>. Acesso em: 22 out. 2019.
11. LEWIS, L.D. **Nutrição Clínica Equina: Alimentação e Cuidados**. São Paulo: Roca, 2000.
12. LOPES, C.; AMARAL, F. **Explorando o Sistema Imunológico**. Belo Horizonte: Puc Minas, 2007, 44p.
13. MELO, U.P.; FERREIRA, C.; PALHARES, M.S. Doenças gastrintestinais em potros: etiologia e tratamento. **Ciência Animal Brasileira**, Espírito Santos, v.8, n.4, p.733-744, out. 2007.
14. MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* Sistema Imunitário - Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol**, São Paulo, v.5, n.50, p.552-580, ago. 2010.
15. MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica, **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, Porto Alegre, nov., 2006.
16. MOURA, R.S. **Probióticos ou fitase na dieta de potros Mangalarga Marchador**. 2010. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
17. OLIVEIRA, A.A.M.A.; PAGLIOSA, G.M.; SALVADOR, L.A. Avanços e tecnologias na alimentação de equinos. **Rev. Cient. Prod. Anim**, Rondon, v. 20, n. 2, p.91-97, 2018
18. RIBEIRO, L.B. *et al.* Comportamento e distúrbios alimentares em equinos durante ensaio de metabolismo recebendo volumosos com diferente qualidade nutricional acrescido de probiótico (*saccharomyces cerevisiae*). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.16, n.1, p.134-143, jul. 2009. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br>>. Acesso em: 30 maio 2019.
19. SADET-BOURGATEAU, S.; JULLIAND, V. Equine microbial gastrointestinal health. The Impact of Nutrition on the Health and Welfare of Horses, **EAAP Publications**, v.128, p.61-82, 2010. Disponível: <<http://www.eaap.org/publications>>. Acesso em: 30 maio de 2019.
20. SILVA, E.N. Probióticos e Prebióticos na Alimentação de Aves. In: CONFERÊNCIA APINCO2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS. Campinas: **Anais....** Campinas. FACTA, 2000. p 242-251