

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

RITA BRITO VIEIRA

**ZEÓLITA (Clinoptilolita) EM DIETAS PARA POEDEIRAS
SEMIPESADAS**

**RECIFE
2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

RITA BRITO VIEIRA

**ZEÓLITA (Clinoptilolita) EM DIETAS PARA POEDEIRAS
SEMIPESADAS**

**RECIFE
2021**

RITA BRITO VIEIRA

**ZEÓLITA (Clinoptilolita) EM DIETAS PARA POEDEIRAS
SEMIPESADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Zootecnia

Orientadora: Prof^ª: Dra. Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke

Coorientadores: Pesquisador. Dr. Jorge Vitor Ludke
Prof^ª: Dra. Cláudia da Costa Lopes

**RECIFE
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R598z VIEIRA , RITA BRITO
ZEÓLITA (Clinoptilolita) EM DIETAS PARA POEDEIRAS SEMIPESADAS / RITA BRITO VIEIRA . - 2021.
49 f. : il.
- Orientadora: Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke.
Coorientadora: Jorge Victor Ludke e Claudia da Costa Lopes.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Recife, 2021.
1. Adsorvente. 2. Aluminossilicatos. 3. Amônia. 4. Aves de postura. 5. Rendimento de órgãos.. I. Ludke, Maria do
Carmo Mohaupt Marques, orient. II. Lopes, Jorge Victor Ludke e Claudia da Costa, coorient. III. Título

CDD 636



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ZEÓLITA (Clinoptilolita) EM DIETAS PARA POEDEIRAS
SEMIPESADAS**

Dissertação elaborada por

RITA BRITO VIEIRA

Aprovada em 30/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa: Dra. Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof: Dr. Carlos Bôa-Viagem Rabello
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa: Dra. Janete Gouveia de Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Biografia da autora

Rita Brito Vieira, filha de Pedro Almeida Vieira e Rosa da Silva Brito, nasceu em Parintins, Amazonas, em 22 de março de 1993. cursou técnico de nível médio em agropecuária, de 2010 a 2012, pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia-IFAM- *Campus* Parintins. No ano seguinte ingressou no curso de Bacharelado em Zootecnia no segundo semestre do ano de 2013, pelo Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia- ICSEZ-UFAM, *Campus* Parintins. Estagiou na Empresa Centro de Integração Empresa Escola- CIEE-AM, em parceria com o IFAM- *Campus* Parintins de 2014 a 2015. Realizou estágio obrigatório na Secretaria Municipal de Pecuária, Agricultura e Abastecimento- SEMPA, do município de Parintins em 2018. Em julho de 2018 concluiu o curso de Zootecnia obtendo o título de Zootecnista no dia 22 de Agosto. Em março de 2019, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), na área de concentração Nutrição e Produção de Não-Ruminantes, tendo defendido em junho de 2021, submetido a presente dissertação.

DEDICO

Àos Meus pais Rosa da Silva Brito e Pedro Almeida Vieira porque sempre me incentivarem
estudar e ir em busca de conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar me guiando nas minhas escolhas, sempre tendo saúde para buscar conhecimento.

A minha família por sempre me dar apoio para continuar os estudos e por todo carinho, companheirismo, educação e incentivo. Agradeço a minha mãe Rosa Brito e meu pai Pedro Almeida, por todo carinho, amor e atenção sempre.

A meu amor Helio Jacobson da Silva, pelo incentivo, compreensão e companheirismo, mesmo a distancia e apoia sempre nas minhas escolhas.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter me acolhido durante o mestrado, no Departamento de Zootecnia.

A professora Dra. Maria do Carmo M. M. Ludke, por ter me orientado durante este trabalho, por transmitir conhecimentos relevantes durante toda a permanencia da pesquisa e elaboração desta dissertação, obrigada pela compreensão, e atenção recebida.

Ao meu co-orientador Dr. Jorge Vitor Ludke por estar disposto a ajudar na pesquisa e construção do experimento.

A minha coorientadora Cláudia da Costa Lopes, por todo o ensinamento, pelos conselhos, incentivos, auxilio nas dúvidas e esta sempre disponível para dialogar, obrigada por tanto.

A minha Amiga Ercvania Rodrigues pela companhia, amizade e a vivencia de estudos.

Aos amigos que se dispuzeram a realizar a pesquisa experimental na granja. Agradeço ao Elton Francisco, Ercvania Rodrigues, Adrielle Santos, Roberta dos Santos e Dayane Albuquerque, mesmo, diante da distancia da Universidade se deslocaram até a área onde estava sendo realizado o experimento, para me ajudarem na coleta de dados. Meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos que realzaram as analises externas ao experimento e se diposeram a auxiliar nas análises, minha gratidão a: Lucas Cirilo, Elayne Lopes, Gabriella Duarte, Apolonio Ribeiro, Dayane Albuquerque, Rogerio Ventura, Walesca Ventura.

Aos funcionários na granja onde foi realizado a pesquisa agradeço ao Supervisor de produção Marcos por sempre estar disponivel e acessivel para contribuir na realização do experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES- pelo apoio financeiro a pesquisa.

A granja Jumbo em por permitir a realização da pesquisa e dar suporte na parte de insumos utilizados no experimento.

A empresa Celta Ltda Brasil pela doação do mineral utilizado na pesquisa.

A todos que contribuíram para execução desta pesquisa.

“O impossível existe até que alguém duvide dele e

prove o contrário”.

Albert Einstein

RESUMO

A saúde das aves pode ser prejudicada pela amônia em concentrações elevadas, afetando o sistema respiratório, comprometendo o desempenho das aves, assim como todo o sistema de produção. A utilização da zeólita na alimentação de galinhas poedeiras pode reduzir a emissão de amônia presente nas excretas das aves para o ambiente, mediante ao processo de adsorção. Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de níveis de zeólita (Clinoptilolita) na alimentação de galinhas poedeiras na fase de postura com 54 semanas de idade. Os tratamentos foram dieta controle isenta de zeólita e cinco dietas com inclusão de níveis crescentes de zeólita (0,7, 1,4, 2,1, 2,8 e 3,5%). Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, sendo utilizadas 240 aves poedeiras da linhagem Isa Brown, com oito repetições de cinco aves por parcela, alimentadas com as dietas experimentais durante quatro períodos de 28 dias. Foram realizadas avaliações de desempenho produtivo, qualidade de ovos, volatilização da amônia e valor de pH das excretas, peso dos órgãos (fígado, pâncreas, coração, intestino, proventrículo e moela) e medição do comprimento do intestino e cecos, hematologia e bioquímica sérica. Os resultados foram submetidos a ANOVA e ao teste de Dunnett e análise de regressão a 5% de probabilidade. Não houve efeito significativo dos níveis de zeólita na produção. Por outro lado, para as variáveis amônia e pH observou-se efeito linear platô. Os teores de N amoniacal das excretas diferiram em relação a dieta controle para todos os níveis de zeólita, enquanto que para o pH houve menores valores nos níveis de 0,7 e 1,4% de inclusão de zeólita, sendo que a volatilização da amônia e o valor de pH das excretas reduziram em 46,9% e 4,6%, ao consumirem as dietas com 0,93% e 1,19% de zeólita, respectivamente. Houve diferença estatística para o peso absoluto dos órgãos através do teste de médias, em que maiores pesos de fígado foram encontrados nos níveis de inclusão com 2,1 e 2,8% de zeólita, com um aumento relativo de 24,6 e 15,9 %, respectivamente. Com relação ao comprimento do intestino, foi maior para os tratamentos 1,4; 2,1 e 2,8% de zeólita. Valores hematológicos e bioquímica sérica não diferiram entre os tratamentos. Dessa forma, observou-se que a inclusão da zeólita pode ser utilizada na alimentação de aves de postura comerciais até 0,93% de inclusão sem afetar o desempenho produtivo e na qualidade dos ovos.

Palavra-chave: Adsorvente; Aluminossilicatos; Amônia; Aves de postura e Rendimento de órgãos.

Zeolite (Clinoptilolite) in laying hens' diet

ABSTRACT

The health of birds can be harmed by ammonia in high concentrations, affecting the respiratory system, compromising the performance of the birds, as well as the entire production system. The use of zeolite in the feeding of laying hens can reduce the emission of ammonia present in the excreta of birds into the environment through the adsorption process. The objective of this study was to evaluate the effects of supplementing zeolite (Clinoptilolite) levels in the feeding of laying hens in the laying phase at 54 weeks of age. The treatments were a control diet free of zeolite and five diets including increasing levels of zeolite (0.7, 1.4, 2.1, 2.8 and 3.5%). A randomized block design was used a total of 240 laying hens of the Isa Brown lineage were used, with eight replicates of five birds per plot, fed the experimental diets for four periods of 28 days. Evaluations of productive performance, egg quality, ammonia and excreta pH, organ weight (liver, pancreas, heart, intestine, proventriculus and gizzard) and measurement of intestine and cecum length, hematology, serum biochemistry were carried out. The results were submitted to ANOVA and Dunnett's test and regression analysis at 5% probability. There was no significant effect of clinoptilolite levels on production. On the other hand, for the ammonia and pH variables, a linear plateau effect was observed through. Ammoniacal N and excreta pH differed from the control diet for all clinoptilolite levels, in which ammonia volatilization and excreta pH reduced by 46.9% and 4.6% when consuming the diets with 0.93% and 1.19% clinoptilolite, respectively. The reduction in excreta pH is justified by the protonation of ammonia (NH₃) into ammonium ions (NH₄⁺). There was a statistical difference for the absolute weight of the organs, it was verified through the test of means, higher liver weights in the inclusion levels with 2.1 and 2.8% of clinoptilolite, a relative increase of 24.6 and 15.9%, respectively. In relation to the length of the intestine, it was greater for treatments 1.4; 2.1 and 2.8% clinoptilolite. Hematological and serum biochemical values did not differ between treatments. Thus, it was observed that the inclusion of clinoptilolite can be used to feed commercial laying birds up to 0.93% inclusion without affecting production performance and egg quality.

Keyword: Adsorbent; Aluminosilicates; Ammonia; Poultry; Organ yield

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Fórmula de ração, composição nutricional e estrutura experimental adotada com os níveis de Clinoptilolita em rações da poedeira Isa Brown com 54 semanas de idade-----	28
Tabela 2. Composição física e química da zeólita (Clinoptilolita-----	29
Tabela 3. Valores médios e erro padrão da média para desempenho produtivo da poedeira Isa Brown avaliada durante 112 dias e com idade inicial de 54 semanas em função de níveis de clinoptilolita na ração e nível de probabilidade para o teste F-----	33
Tabela 4. Valores médios e erro padrão da média para a qualidade externa de ovos de poedeira Isa Brown com idade inicial de 54 semanas em função de níveis de clinoptilolita na ração e valor para nível de probabilidade do teste -----	33
Tabela 5. Valores médios e erro padrão da média para peso médio e composição dos ovos de poedeira Isa Brown com idade inicial de 54 semanas em função de níveis de clinoptilolita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F-----	34
Tabela 6. Valores médios e erro padrão da média para teor de nitrogênio amoniacal liberado das excretas e pH das excretas da poedeira Isa Brown com 75 semanas de idade em função de níveis de Clinoptilolita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F-----	35
Tabela 7. Valores médios e erro padrão da média das variáveis de hematológicas de poedeira Isa Brown com 54 semanas de idade em função de níveis de Clinoptilolita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F-----	37
Tabela 8. Valores médios e erro padrão da média das variáveis de Bioquímica sérica de poedeira Isa Brown com 54 semanas de idade em função de níveis de Clinoptilolita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F-----	38
Tabela 09. Valores médios e erro padrão da média da morfometria dos órgãos de galinhas poedeiras semipesadas alimentadas com diferentes níveis de zeólita e valor de probabilidade segundo o teste F-----	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag.
Figura 1. Estrutura reticular tetraédrica que ocorre a troca catiônica de alumínio, silício e oxigênio.	21
Figura 2. Variação média da temperatura (T °C) e umidade relativa do ar (UR%) durante o período experimental.	27
Figura 3. Efeito do nível de clinoptilolita na ração de poedeira isa brown sobre a amônia liberada nas excretas.	36
Figura 4. Efeito do nível de zeólita na ração de poedeira Isa Brown sobre o peso relativo do fígado.	41
Figura 5. Efeito do nível de zeólita na ração de poedeira Isa Brown sobre o comprimento do intestino.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALB- Albumina

ALT -Alanina aminotransferase,

AST- - Transaminase oxalacética

BIOPA- laboratorio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal.

CA- Conversão Alimentar

CREA- Creatinina

dl- -Decilitro

Eij- Tero de erro aleatório

GGT- Glutamil transferase

mg- Miligrama

ml- Mililitro

mm-Milímetro

pH- Potencial Hídrogenionico

TGO - Transaminase oxalacética

TGP- Transaminase glutâmico-pirúvica

Yij- Observação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Aves de postura: produção e problemas no manejo de dejetos	18
2.2. Aditivo zeólita: Caracterização e suas funções	20
2.3. Estudos com a adição de clinoptilolita na dieta de aves	22
2.3.1 Efeito da clinoptilolita nos parâmetros sanguíneos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Local do experimento	26
3.2 Delineamento experimental e tratamentos	27
3.3 Avaliação de desempenho	29
3.4 Qualidade dos ovos	29
3.5. Amônia e pH das excretas	30
3.6 Parâmetros sanguíneos	31
3.7 Morfometria dos órgãos	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Desempenho	32
4.2 Qualidade dos ovos	33
4.3 Amônia e pH das excretas	35
4.4 Parâmetros sanguíneos	36
4.5 Morfometria dos órgãos	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Na produção avícola um dos entraves encontrados pelos produtores é o destino dos dejetos que são produzidos nos galpões, sejam em sistemas tradicionais ou verticalizados (FRANÇA, 2017). Atualmente observa-se, sobretudo, nos aviários comerciais tem alta produção de excretas que liberam os gases como amônia (NH_3), sulfeto de hidrogênio e compostos voláteis que são prejudiciais para o sistema de produção. A amônia que é produzida em galpões de aves, é uma preocupação para a saúde, não somente das aves, mas também de seres humanos e meio ambiente (NASEEM E KING, (2018).

Segundo Hartung (1986) e Hoff et al. (1997), cerca de 37% do nitrogênio total (NT) ingerido pelas poedeiras é perdido para o ar atmosférico como amônia (NH_3). A zeólita é um mineral que tem sido estudado na ração de poedeiras, no intuito de reduzir a emissão da amônia presente nas excretas das aves, prejudicial para o ambiente, através da fixação da amônia por este mineral durante a sua passagem no trato gastrointestinal do animal, sem comprometer o desempenho das aves (GRĄDZKI et al., 2020).

Existem vários tipos de zeólitas naturais produzidas no mundo, tais como a clinoptilolita, chabatiza, heulandita, modernita, fililita, silicata, silicatila e heroinita. Estas se diferenciam através de sua composição mineralógica (DEL CAMPO, 2004), e estrutural. Porém, a zeólita mais utilizada nas pesquisas com animais é a clinoptilolita (MASTINU et al., 2019). A clinoptilolita tem a capacidade de adsorver substâncias nocivas no trato gastrointestinal, como micotoxinas, amônia, metais pesados (chumbo mercúrio e cádmio) (PAVELIC et al. 2018), que atua como agente desintoxicante e antioxidante, sendo que este último tem um efeito baseado na capacidade de utilizar os íons metálicos presentes em sua estrutura, como cofatores para ativação de enzimas antioxidantes (MASTINU et al., 2019).

Olver (1983) conduziu experimento com clinoptilolita na alimentação de galinhas poedeiras, utilizando a suplementação de 5% de zeólita, que promoveu uma redução no percentual de umidade nas excretas, na contagem de colônias de bactérias na porção inicial do intestino (2/7) e porção final (7/8). Foi registrado por Mallek et al. (2012), o mesmo efeito na microbiota do intestino de frangos com o uso de clinoptilolite (1%). Enquanto Öztürk et al. (1998) verificaram diminuição na umidade das excretas ao utilizar 8% de clinoptilolite na dieta de poedeiras em planteis com problemas de alta umidade.

33 Segundo Jarosz et al. (2017), a Clinoptilolita, quando utilizada na dieta de poedeiras,
34 pode ser benéfica para a saúde das aves, podendo melhorar a qualidade do ar dentro dos galpões,
35 sem afetar o desempenho produtivo e a imunidade, desde que em baixos níveis de inclusão em
36 relação a dieta total. Contudo, a utilização de zeólita na alimentação de galinhas poedeiras ne-
37 cessita ter novas pesquisas para avaliar os efeitos sobre os parâmetros da saúde e produção
38 (JAROSZ et al., 2017), promovido pela menor volatilização de amônia (SCHNEIDER et al.
39 2017).

40 Desta forma, com o estudo apresentado, objetivou-se avaliar o efeito do uso de zeólita
41 natural em dietas para galinhas poedeiras semipesadas, com a finalidade de reduzir a quantidade
42 de amônia volatilizada nas excretas das aves, assim como os seus efeitos sobre os as variáveis
43 produtivas, que são: qualidade dos ovos, rendimento dos órgãos, perfil bioquímico e hematoló-
44 gico.

45

46 2. REVISÃO DE LITERATURA

47

48 2.1. Aves de postura: produção e problemas no manejo de dejetos

49

50 A produção de ovos de galinhas poedeiras foi crescente, conforme últimos dados. Em
51 2020 a produção foi de 4,5 bilhões de dúzias de ovos, sendo que 99,69% foram consumidos no
52 mercado interno e 0,31% foram exportados. Assim, dados oficiais informam um consumo *per*
53 *capita* de 251 unidades por ano no Brasil (ABPA, 2020). No contexto de produção os sistemas
54 de criação de galinhas poedeiras são tradicionais, desse modo são utilizados sistemas californi-
55 anos e o sistema verticalizado com uso de baterias, que são totalmente automatizadas quanto à
56 instalação (LUDKE et al., 2019).

57 No sistema de bateria de gaiolas verticais, estas possuem mais de 100 metros de com-
58 primento, altura de 10 a 15 metros e pé direito superior (MENDES, 2015), sendo que a sanidade
59 das aves depende de diversos fatores.

60 Um dos fatores que mais afeta a produção avícola baseia-se no aumento da ocorrência
61 de agentes patogênicos como as bactérias do grupo das enterobactérias. Como exemplo desse
62 grupo temos a *E. Coli* e *Salmonella spp.* Estas estão presentes nas excretas das aves sobre cama
63 aviária (SILVA, et al., 2007). Outro fator importante nos sistemas intensivos pertinentes à pro-

64 dução, consiste nos teores de amônia, que tendem a aumentar dentro do aviário, sendo neces-
65 sário fazer um tratamento desses resíduos para não comprometer a sanidade e o desempenho
66 desses animais (FRANÇA, 2017).

67 O manejo de dejetos deve ser planejado durante a construção das instalações, pois a
68 seleção de um sistema de manejo vai depender de aspectos como o potencial de poluição, a
69 necessidade de mão de obra, a área disponível, a legislação vigente, a confiabilidade, o custo
70 de produção e operacionalidade do sistema, tendo em vista que cada um desses requisitos varia
71 de acordo com a realidade de cada propriedade (FERREIRA, 2017).

72 Portanto, há necessidade de fazer um diagnóstico da granja, referente ao tratamento de
73 dejetos, uma vez que é o sistema de produção de cada granja que define o grau de diluição dos
74 dejetos, com as características físico-química. Desse modo, para dimensionar o manejo do sis-
75 tema de produção e o volume de dejetos para realizar o tratamento, necessita-se determinar o
76 volume diário de resíduos produzidos na propriedade com uma média estimada em 4,5 tonela-
77 das na avicultura para 450 kg de peso vivo de animal (FERREIRA, 2017).

78 França (2017) afirmou que os dejetos produzidos na avicultura podem causar problemas
79 ambientais, quando não são manejados corretamente. Pode, também, afetar a acidificação do
80 solo, e a produção de gases tóxicos pode contaminar o ar e contribuir para o efeito estufa, a
81 partir de gases como a amônia oriundos dos dejetos. A amônia é um gás tóxico que é produzida
82 nos aviários a partir dos compostos nitrogenados que não são utilizados pelo organismo do
83 animal e são excretados em forma de ácido úrico pelas aves. Além disso, parte da proteína bruta
84 não digerida e absorvida também contribuem para a formação da amônia.

85 Swelum et al. (2021) relataram que os níveis elevados de amônia (>25 ppm) em aviários
86 podem reduzir o ganho de peso, piorar a conversão alimentar, a capacidade de sobrevivência, a
87 taxa de condenação da carcaça e o sistema imunológico, que foi comprovado em estudos com
88 frangos de corte. Os níveis altos de amônio e amônia na forma iônica e não voláteis, podem
89 prejudicar as membranas do sistema respiratório das aves, aumentando a susceptibilidade a in-
90 fecções respiratórias por bactérias *E. Coli* (SWELUM et al., 2021)

91 Para que não ocorra efeitos prejudiciais da amônia em galinhas é recomendado que a
92 concentração na parte interna dos galpões não esteja acima de 25 ppm (25 µL por L de ar),
93 sendo que a concentração ideal deve ser menor que menor do que 10 ppm. Os efeitos da expo-
94 sição à ambientes que contém amônia depende da concentração e do tempo da exposição ao
95 local (NASSEM; KING, 2018).

96 A amônia é tóxica para os animais, pois interfere no desenvolvimento de órgãos imuno-
97 lógicos no sistema gastrointestinal das aves, devido os distúrbios causarem respostas inflama-
98 tórias a exposição a NH_3 (ZHANG et al., 2015; SHI et al., 2019). Além disso, a amônia pode
99 entrar no trato respiratório causando doenças como a traqueíte (SHI et al., 2019).

100 Wang et al. (2019) verificaram que a exposição excessiva a amônia (30 ppm) em estudos
101 com frango de corte, resultou em resposta inflamatória em neutrófilos no sangue. Shi et al.
102 (2019) observaram que a exposição à amônia em períodos de 0 a 3 semanas 19,5-20,5 ppm; 3-
103 6 semanas 44,5 a 45,5 ppm, causaram anormalidades na resposta imune traqueal principalmente
104 na transcriptoma traqueal de frangos e aumentou as células T, obtendo respostas inflamatórias
105 nas aves. Zhou et al. (2020) encontraram efeitos na exposição de amônia devido à diminuição
106 do desempenho em valores de 25 a 35 ppm de amônia sendo que isso foi constatado com base
107 nas respostas da traqueia e no soro das aves.

108 O uso de zeólitas naturais nas dietas é um recurso auxiliar que reduz a liberação da
109 amônia para o ambiente dentro dos galpões, além de realizar a adsorção da água das excretas
110 reduzindo sua umidade. Além disso, também podem estar atuando na redução de patógenos nos
111 aviários Segundo Wu et al. (2013) a zeólita reduziu a *Salmonella* e *Eschiarichia coli* no conte-
112 údo cecal em frangos de corte de 1 a 21 dias, essa diminuição de bactérias pode contribuir para
113 melhora da mucosa intestinal.

114

115 **2.2. Aditivo zeólita: Caracterização e suas funções**

116

117 As zeólitas podem ser utilizadas na alimentação animal, na água, na cama de frango e
118 indústrias avícolas, pois é um produto natural que melhora a saúde dos animais (HCINI et al.,
119 2018). A estrutura desse mineral é formada por uma densa camada de óxido de alumínio e óxido
120 de silício (MASTINU et al., 2019). São minerais porosos, composta por estruturas tridimensi-
121 onalmente cristalinas, altamente hidrofílica, podendo reter ou liberar água de forma reversível
122 (PAVELIC et al., 2021).

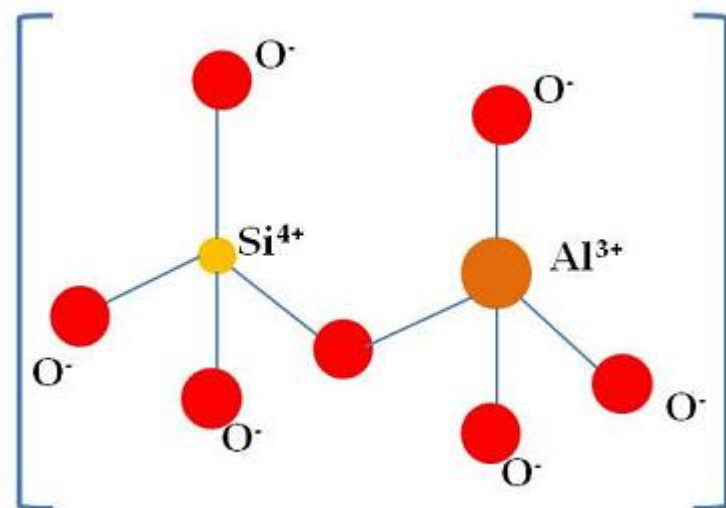
123 A clinoptilolita contém propriedade física e química com alta capacidade de troca ca-
124 tiônica, absorvência (BERTO et al., 2013; HCINI et al. 2018; MASTINU et al., 2019). De
125 acordo com Elliott et al. (2020), existem vários tipos de zeólitas que servem como adsorventes,
126 dentre essas, têm-se: a clinoptilolita, bentonita, caulita, montmorilonita, palygorskite e carvão
127 ativado. Desse modo, as zeólitas estão classificadas como aluminosilicatos alcalinos ou alcali-
128 nos terrosos, principalmente de sódio e cálcio e tem como características a alta porosidade, alta

129 capacidade de adsorção de água, sendo um aditivo adsorvente (BERTO et al., 2013; WU et al.,
130 2016).

131 A Zeólita natural conhecida como Clinoptilolita é formada de $\text{CaNa}_4\text{K}_4(\text{AlO}_2)_5(\text{SiO}_2)_{30}$
132 $24\text{H}_2\text{O}$ (SHARIATMADARI, 2008). A clinoptilolita contem propriedade físico-química com
133 alta capacidade de troca catiônica, absorvância (BERTO et al., 2013; HCINI et al. 2018; MAS-
134 TINU et al., 2019). As zeólitas têm benefícios, porque são capazes de fixar micotoxinas, amô-
135 nia, água, metais pesados e elementos radioativos, cujas substâncias podem prejudicar os ani-
136 mais. Desse modo elas atuam como trocadores de íons no processo bioquímico, neste os íons
137 precisam estar com cargas semelhantes para ter seu equilíbrio das reações de catiônicas que
138 ocorrem nas reações bioquímicas (ANDRONIKASHVILI et al., 2009). O processo utilizado de
139 troca catiônica atua durante a formação de compostos de alumínio, que são substituídos por
140 silicatos na parte da estrutura de canais tridimensionais da superfície da zeólita. Cada uma des-
141 sas estruturas cria carga negativa na superfície de zeólita, pois tem alta capacidade de troca
142 entre cátions carregados positivamente como íons amônio (NH_4^+), que fazem o equilíbrio das
143 cargas (DEL CAMPO, 2004) (Figura 1).

144 Além do exposto, a zeólita pode fazer a estabilização e regulação de reservas de sódio
145 e ácido no trato gastrointestinal, mantendo a homeostase e seu uso pode aumentar a conversão
146 alimentar dos animais (ANDRONIKASHVILI et al., 2009).

147



148

149 Figura 1: Estrutura reticular tetraédrica que ocorre a troca catiônica de alumínio, silício e oxigênio
150 (<http://www.iza-structure.org>).

151

152

2.3. Estudos com a adição de clinoptilolita na dieta de aves

A literatura desta área de conhecimento disponibiliza estudos com a zeólitas naturais e zeólitas modificadas utilizada em várias espécies de animais, com intuito de avaliar seus efeitos na alimentação animal, buscando ter meio de indicar opções para os produtores. Ao ser estudada a clinoptilolita obteve-se efeito na alimentação de frango de corte, pois as rações utilizadas no estudo proporcionaram aumento de peso nos animais (WAWRZY尼亚K et al., 2017; GRADZKI et al., 2020). Além disso, a adição de clinoptilolita na dieta de frango de corte melhorou a sanidade, reduzindo a gravidade dos sintomas respiratórios e gastrointestinais.

Várias pesquisas foram realizadas, objetivando conhecer os efeitos da zeólita na alimentação animal. Berto et al. (2013) ao utilizarem 0,5% de inclusão de clinoptilolita na alimentação verificou uma diminuição no ganho de peso e na espessura da casca do ovo. Nos estudos de Hcini et al. (2018) testaram dietas com dois níveis 1% e 2% de clinoptilolita para perus machos e fêmeas, encontraram efeitos positivos no desempenho, crescimento e aumento do ganho de peso em comparação com a dieta controle. Os autores observaram que ao nível de 2% de clinoptilolita houve aumento no ganho de peso de perus machos diferindo da ração controle, 9,36; 9,80 kg, respectivamente, porém não diferiram nas fêmeas.

Prasai et al. (2017) observaram o efeito dos aditivos biochar, bentonita e zeólita sobre a produção de ovos e atributos de excreções, em que o uso de zeólita em níveis crescentes de 1%, 2 % e 4 % na dieta das aves foi reduzindo a quantidade de nitrogênio nas excretas.

Em estudos realizados com por Haan et al. (2007), utilizando dietas acidificantes combinada com zeólita, verificaram que a emissão de NH₃ nas galinhas poedeiras na faixa etária de 21 semanas foram menores (277,0 mg/ave), e as aves com mais idade 38 a 59 semanas foram maiores, 402,1mg/ave e 447,5/mg/ave, respectivamente. Isso foi justificado pelos fatores ambientais devido a pesquisa ser realizada em períodos diferentes ao ano.

Li et al. (2008) verificaram, em seus estudos com utilização de zeólitas em esterco para avaliar a emissão de amônia, que a aplicação de aditivos levou a um menor pH, um menor teor de N amoniacal e um maior conteúdo total de N na camada superior de 2,5 cm (1 pol) do esterco. O pH pode afetar a forma de amônio em solução. Devido a isso, a capacidade de adsorção de amônio pode aumentar de acordo com o aumento do pH de 2 para 7, dependendo da origem e propriedade físico-química dos adsorventes ocorrendo em pH ácido (VADIVELU et al., 2006; DENG et al., 2010).

185 As zeólitas como adsorvente elimina uma serie de substâncias tóxicas (sais de metal
186 pesado, nitratos, micotoxinas, radionuclídeos e produtos do metabolismo como a amônia), tam-
187 bém se aderem a bactérias patogênicas (ANDRONIKASHVILI et al., 2009). Santin et al.
188 (2002), ao estudarem a eficácia do aluminossilicato no alívio dos efeitos adversos da OTA nos
189 rins. Esses autores constataram que no grupo de frangos de corte que, uma dieta com inóculo
190 de ocratoxina e 0,25% aluminossilicato que foram misturados semanalmente na ração, o adsor-
191 vente a essa concentração não apresentou efeito significativo para a capacidade de proteção a
192 imunidade de frango de corte.

193 Em estudo realizado por Trailovic et al. (2015) o adsorvente inorgânico (zeólita modi-
194 ficada) reduziu parcialmente os efeitos da ocratoxina no desempenho de frango de corte. E com
195 relação ao peso dos animais alimentados com esse adsorvente obtiveram maior percentagem de
196 peso e menor consumo de ração, assim como a conversão alimentar dessa dieta.

197

198

199 **2.3.1 Efeito da clinoptilolita nos parâmetros sanguíneos**

200

201 O processo metabólico proteico ocorre em várias etapas, e em aves o principal produto
202 é o ácido úrico (80%) e a amônia (10-15%). Esta, por sua vez, é altamente tóxica para as células,
203 quando ocorre seu acúmulo na membrana celular, pode entrar na corrente sanguínea, que a
204 conduz até o fígado promovendo a formação do ácido úrico (MACARI; MAIORKA, 2017).

205 O ácido úrico é formado tanto no fígado quanto nos rins das aves a partir da amônia.
206 Nos túbulos o ácido úrico é precipitado após exceder a solubilidade. Sendo que o ácido úrico
207 continua nos túbulos na forma precipitada como urato e aparece na urina na forma esbranqui-
208 çada. Como o ácido úrico não fica na forma de solução, ele não contribui para a pressão osmó-
209 tica efetiva do líquido tubular, e a perda de água é evitada (DUKES, 2017). Portanto, durante
210 o processo de catabolismo no organismo do animal são excretados o ácido úrico e a ureia que
211 são resíduos formados na degradação dos compostos nitrogenados (MACARI; MAIORKA,
212 2017).

213 Esses mecanismos fisiológicos nos animais são interligados o que pode ter efeito de um
214 conjunto de fatores para determinar uma ação no organismo das aves. Dessa forma, para se
215 compreender as ações que ocorre com intuito de conhecer as respostas imunológicas dos ani-
216 mais utiliza-se o sangue que é constituído de água, células sanguíneas, proteínas, minerais e
217 hormônios, posto que o plasma é a porção líquida do sangue, que contém proteínas que não

218 estão no soro, visto que as funções do sangue são transporte, proteção, equilíbrio hidroeletrolí-
219 tico, homeostasia (MACARI; MAIORKA, 2017).

220 Observa-se as reações metabólicas causadas pelo organismo do animal ao se fornecer
221 dietas contendo aditivos, visando entender como ocorre as reações de defesa e a imunização
222 sem afetar as respostas da homeostase. Contudo, o uso da zeólita na dieta de aves pode afetar
223 fatores como a estimulação e produção de anticorpos, a proteção da barreira intestinal contra
224 antígenos, e a ativação da síntese de citocinas pró e anti-inflamatória (JAROSZ et al., 2017).
225 Wu et al. (2013b) ao estudarem a Clinoptilolita, verificaram que, tanto estando na forma natural
226 quanto modificada, reduz a concentração sérica de citocinas pró-inflamatória, incluindo os
227 TNF- α e IL-1 β em frango de corte. Também são produzidas células plasmáticas produtoras de
228 anticorpos através da ação dos linfócitos T e B que são reguladores no organismo (JAROSZ et
229 al., 2017).

230 Contudo, as zeólitas, por serem trocadoras de íons, participam de transformações bio-
231 químicas, normalizam a homeostase dos animais e aumentam a conversão de nutrientes, po-
232 dendo ser reversíveis no aumento dos valores de hemácias e hemoglobina (ANDRONIKAS-
233 HVILI et al., 2009).

234 Em relação aos parâmetros hematológicos, muitos estudos têm sido realizados, no in-
235 tuito de avaliar os efeitos da inclusão de tipos de zeólita na dieta de frango de corte e poedeiras.
236 OGUZ; KURTOGLU (2000) testaram nível de 1,5% de clinoptilolita e observaram valores de
237 hemoglobina de 6,28 g/ml, hematócritos 26,2 %, heterofilos 40,3%, linfócitos 56,70 % e leu-
238 cócitos de 34,39 g/l. Esses valores de 1,5 % de aflatoxina juntamente com clinoptilolita me-
239 lhoraram os valores desses parâmetros avaliados. Resultados semelhantes foram encontrados
240 sobre o perfil hematológicos por Kececi et al (1998) ao estudarem clinoptilolita na dieta de
241 frangos de corte.

242 Em galinhas poedeiras MACHAEK et al. (2010) observaram menores valores de hemo-
243 globinas ao nível de 4% de clinoptilolita, cujos valores das variáveis são os seguintes: hemo-
244 globina com 70,38 g/100, hematócrito com 0,24l/L e leucócitos com 19,0 g/l em dietas contendo
245 4% de clinoptilolita essa redução de hemoglobina os autores justificam que pode afetar a ho-
246 meostase desses animais avaliados ao serem alimentados com dietas contendo zeolitas. Porém
247 o perfil sanguíneo também pode variar mediante diversos fatores como a alimentação, idade,
248 temperatura e sanidade das aves.

249 Segundo SAFAEIKATOULI et al. (2011) a adição de zeolita na dieta não afetou os
250 níveis bioquímicos no sangue das variáveis de AST, ALP, GGT, contidas no soro. Segundo
251 estes autores, apenas o tratamento de 30 g/kg de zeolita proporcionou maior atividade sérica de

252 alanina aminotransferase de 8, 8 iu/L, fosfatase alcalina 4368 iu/l, contudo não diferiram esta-
253 tisticamente, permanecendo nas faixas normais para frango de corte. Justificaria esse aumento
254 na ALT se tivesse aumento da enzima AST e seria um indicativo de danos causados aos tecidos
255 (SAFAEIKATOULI et al., 2011). Outras proteínas são utilizadas como componentes do plasma
256 nas aves, destacando-se a albumina que contém em média 17 g/L (MACARI; MAIORKA,
257 2017).

258 Além disso, a zeólita pode estimular de células M epiteliais intestinais facilitando a
259 transferência de moléculas de aluminossilicatos do lúmen intestinal para as células mais pro-
260 fundas da lâmina própria como os macrófagos e células dentríticas, que apresentam antígenos
261 as células T, causando uma resposta imune nos animais (GRADZKI et al., 2020).

262 Quando foi estudada a suplementação da zeólita nos tecidos sanguíneos encontrou re-
263 sultados no processo de proliferação de linfócitos, e, ao nível de 3% na dieta, aumentou a por-
264 centagem de células T (CD4⁺auxiliares e CD8⁺citotóxicas) (JAROSZ et al., 2017). Os autores
265 afirmaram que esse aumento, nessa porcentagem está relacionado com a alta concentração de
266 citocinas IL-10, indicando que essas células têm efeito imunossupressor, e, por serem células
267 reguladoras, podem inibir uma resposta inflamatória. Ao nível de 2% de zeólita obteve mais
268 porcentagem de linfócitos, sendo expresso esse aumento nos linfócitos B, indicando maiores
269 quantidades de anticorpos que protegem efetivamente o organismo das aves contra infecções
270 (JAROSZ et al., 2017).

271 Outros estudos desenvolvidos como os de Maciel et al. (2007), foi avaliada a função
272 hepática e renal de frangos em dietas contendo concentrações de 0,25 e 0,5% de aflatoxinas (5
273 ppm) associada à clinoptilolita. Observaram, ainda, que houve diminuição de 30% em relação
274 ao grupo controle a esses níveis de inclusão. Ao associar a clinoptilolita nas duas concentrações,
275 com 5ppm de aflatoxinas, houve diminuição de níveis séricos da creatinina $0,23 \pm 0,08$ e
276 $0,23 \pm 0,05$ mg/dl⁻¹ respectivamente. Para o ácido úrico foi encontrada redução ao nível de 0,25%
277 de clinoptilolita, tanto na forma isolada, quanto associada às aflatoxinas com os respectivos
278 valores $4,55 \pm 1,33$ e $3,69 \pm 1,41$ mg/dl⁻¹, indicando o aumento da excreção renal nesses dois tra-
279 tamentos.

280 Berto et al. (2013) encontraram valores de ácido úrico no sangue 6,15; 6,96; 8,79 e 9,53
281 mg/dL nos seguintes tratamentos 0; 0,15; 0,25 e 0,50 % de clinoptilolita, respectivamente, em
282 dietas de frango de corte, avaliando níveis de zeólitas juntamente com 3,7% de cálcio na dieta
283 de frango de corte. Essas concentrações de clinoptilolita na dieta não afetou o os valores san-
284 guíneos de ácido úrico.

285 Em outras espécies de animais como os suínos, as pesquisas com aditivos semelhantes
286 à zeólita foram estudados e verificaram que ao serem alimentados com uma dieta suplementada
287 com 2,5 e 5% de montmorilonita, que é um adsorvente, apresentaram alterações histológicas
288 hepáticas, incluindo inchaço, degeneração vacuolar e vesicular. Além disso, a capacidade anti-
289 oxidante, a glutamina peroxidase e o consumo médio diário de ração foram afetados em com-
290 paração com o grupo controle (ZHAO et al., 2017).

291 3. MATERIAL E MÉTODOS

292

293 A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de animais – CEUA da Universidade
294 Federal Rural do Pernambuco, de acordo com a licença nº 004/2020.

295 O referido estudo se propôs avaliar o efeito do uso de zeólita natural em dietas para galinhas
296 poedeiras semipesadas, fazendo a redução da quantidade de amônia volatilizada nas excretas
297 das aves, a fim de analisar os seus efeitos sobre as variáveis produtivas, que são: qualidade dos
298 ovos, morfometria dos órgãos, perfil bioquímico e hematológico. O procedimento da pesquisa
299 foi desenvolvido por observação direta em experimentos de campo para a coleta de dados per-
300 tinentes.

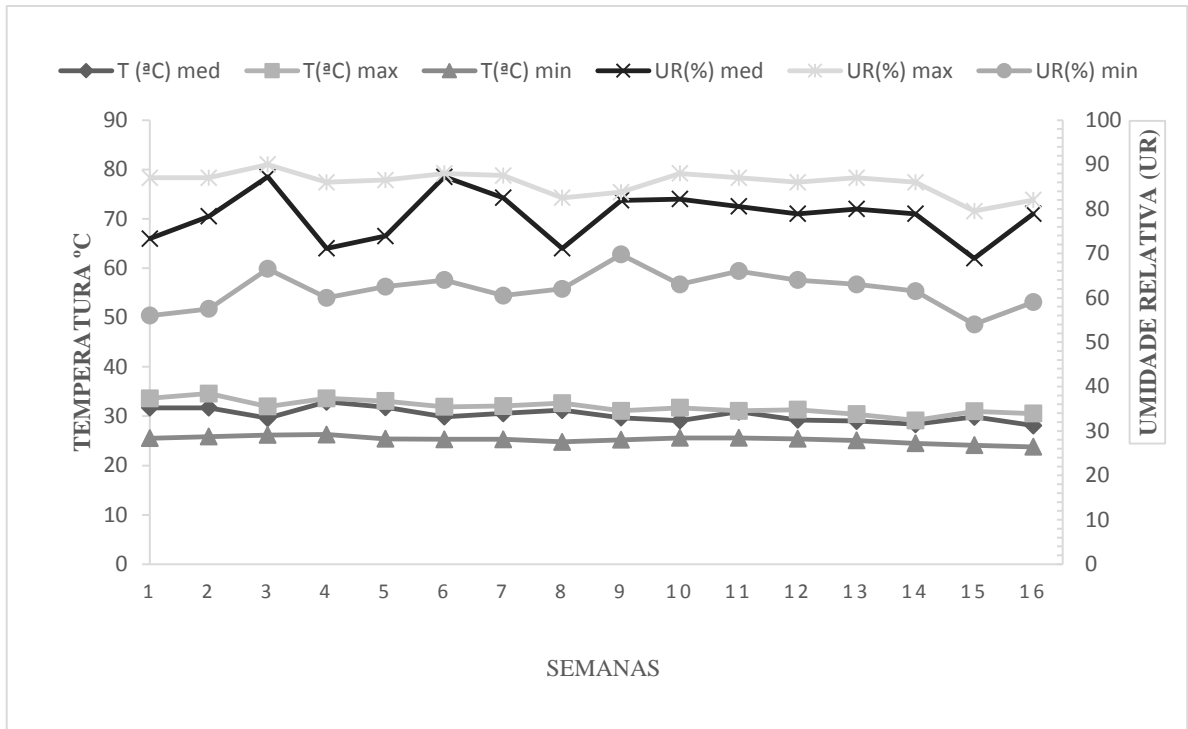
301 3.1 Local do experimento

302

303 O experimento de campo foi conduzido na granja Jumbo, localizada no município de Goiana
304 (latitude: 07° 33'38" S sul, longitude: 35.00'09" Oeste) região pertencente a Pernambuco, Bra-
305 sil. O abate e as análises de qualidade de ovos foram realizados no Laboratório de Carnes o
306 Departamento de Zootecnia da UFRPE.

307 O experimento foi conduzido utilizando 240 poedeiras Isa Brown com peso aproximado de
308 1,750 kg e produção média de 86% a partir da 54ª semana de idade, durante quatro períodos de
309 28 dias. As aves foram alojadas em galpão de alvenaria e criadas em gaiolas, medindo
310 50x50x45cm (5 aves/gaiola), equipadas com comedouros tipo calha e bebedouros tipo nipple.
311 O fornecimento de água foi *ad libitum* e a quantidade de ração foi fornecida de acordo com a
312 exigência calculada por ave. Foi adotado um programa de luz recomendado de acordo com o
313 manual da linhagem, utilizada com 16 horas de luz diárias (natural+artificial). Durante o perí-
314 odo experimental, foi aferida a temperatura e a umidade relativa do ar no interior do galpão,
315 que foram registrados diariamente por meio de um termohigrômetro digital, modelo Incoterm
316 0419 (Figura 2).

317



318

319

320

Figura 2. Variação média da temperatura (T °C) e umidade relativa do ar (UR%) durante o período experimental

321

322

323

3.2 Delineamento experimental e tratamentos

324

325

326

327

As aves foram distribuídas por peso e produção em um delineamento em blocos casualizados, em seis tratamentos com oito repetições, de cinco aves cada. Na 54ª semana de idade foi iniciado o fornecimento das rações experimentais, que se diferenciaram somente pela inclusão de níveis crescentes de zeólita.

328

329

330

331

332

Os tratamentos foram dieta controle isenta de zeólita (Clinoptilolita) e cinco dietas com níveis crescentes (0,7; 1,4; 2,1; 2,8 e 3,5 %) deste aditivo, conforme apresentado na Tabela 1. Todas as dietas foram isoenergéticas e isoprotéicas, seguindo as recomendações expressas nas tabelas em Rostagno et al. (2017). A relação dos aminoácidos foi mantida em relação ao nível de lisina em base de proteína ideal.

333

334

335

336

337

338

339 **Tabela 1.** Fórmula de ração, composição nutricional e estrutura experimental adotada com os níveis de zeó-
 340 lita (clinoptilolita) em rações da poedeira Isa Brown com 54 semanas de idade.

Composição da ração – Ingredientes		%	Composição nutricional calculada			
Milheto grão inteiro		50,000	Energia met. (kcal/kg)	2720,00		
Farelo de soja 45 %		14,138	Proteína bruta (%)	16,13		
Milho grão moído		12,998	Extrato Etéreo (%)	4,050		
Calcário 50% fino e 50% grosso		10,417	Fibra bruta (%)	2,366		
Farinha de carne e osso (43%)		4,383	Cálcio (%)	4,600		
Inerte / Clinoptilolita		3,500	Fósforo disponível (%)	0,360		
Óleo de soja		2,769	Lisina digestível (%)	0,805		
Cloreto de colina		0,500	Met+cist digestível (%)	0,789		
DL- metionina 99		0,311	Treonina digestível (%)	0,518		
Suplemento Vitaminico-mineral*		0,300	Matéria mineral (%)	10,97		
L-lisina HCl 78,8		0,243	Sódio (%)	0,179		
Bicarbonato de sódio		0,240	Potássio (%)	0,435		
			Cloro (%)	0,168		
			Balanço eletrolítico (mEq/kg)	142		
Sal comum		0,201				
	Total	100,00				
Estrutura experimental						
Tratamento	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Inerte, %	3,5	2,8	2,1	1,4	0,7	0,0
Clinoptilolita, %	0,0	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5

341 *Suplemento Vitaminico/Mineral por kg de ração: Cobre: 8 mg; Ferro:50 mg; Manganês: 70 mg; Zinco:50 mg;
 342 Iodo: 1,2 mg; Selênio: 0,2 mg. Vit. A: 7000 UI; vit. D₃: 2000 UI; vit. E: 5 mg; vit. K₃: 1,6 mg; vit. B₂: 3mg; vit.
 343 B₁₂: 8 mcg; Niacina: 20 mg; Ácido Pantotênico: 5 mg; Antioxidante: 15 mg.

344

345 Na Tabela 2 é mostrado a composição da zeólita natural (a clinoptilolita) utilizada e
 346 também suas características físicas.

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360 **Tabela 2.** Composição física e química da zeólita (Clinoptilolita).

Composição química		
	Valor mínimo	Valor máximo
SiO ₂	62%	75%
Al ₂ O ₃	7%	15%
Na ₂ O	0%	5%
K ₂ O	0,50%	5%
CaO	0,50%;	5%
Composição física		
Cor	Bege a levemente esverdeado	
Granulometria	0,4 – 1,0mm	
Densidade aparente	0,5-1,0g/cm ³	
pH	6,5-10,0	
Umidade	≤ 6%	
Capacidade de troca catiônica	1,2 a 2,0 mEq/g	

361 Fonte: CELTA 2021(www.celtabrasil.com.br)

362

363 3.3 Avaliação de desempenho

364 Das aves alimentadas com as dietas mencionadas anteriormente, foram avaliadas as va-
 365 riáveis de desempenho zootécnico (peso corporal inicial e final, consumo de ração (g/ave/dia),
 366 conversão alimentar por dúzia de ovos (g/dz) e por massa de ovos (g/g), produção de ovos
 367 aves/semana e produção total (média dos 4 períodos de 28 dias). Os consumos de ração foram
 368 registrados semanalmente.

369

370 3.4 Qualidade dos ovos

371 Das aves em estudo foi realizada a análise da qualidade externa dos ovos de acordo com
 372 os padrões de qualidade da RIISPOA (2017), os quais foram classificados em quebrado, trin-
 373 cados, sujos que foram feitas anotações diariamente. Também foram realizadas coletas de ovos
 374 para análises quanto ao peso do ovo (g), altura de albúmen (mm), peso da gema (g), peso da
 375 casca (g), espessura de casca (mm), porcentagem de gema e albúmen (%), casca e Unidade
 376 Haugh (UH).

377 Os ovos foram coletados nos três últimos dias de cada ciclo, onde três ovos foram sele-
 378 cionados por unidade experimental com base no peso médio, totalizando 24 ovos por trata-
 379 mento. Após a coleta, os ovos foram identificados e pesados individualmente em balança semi-
 380 analítica com precisão de 0,01 de acordo com o tratamento e suas respectivas repetições. Em

381 seguida, todos os ovos eram quebrados individualmente e dispostos sobre uma superfície lisa e
382 plana, e com auxílio de um paquímetro digital com escala de 0,01 mm, foi aferida a altura do
383 albúmen (mm) pelo valor indicado no paquímetro digital. Posteriormente, as gemas foram se-
384 paradas do albúmen e pesadas individualmente em balança de precisão 0,01g (bel, modelo
385 L3102iH). As cascas foram cuidadosamente lavadas, secas ao ar por um período de 48 horas e
386 pesadas e tiveram suas medidas de espessura medidas em três pontos distintos sendo na área
387 transversal, central, utilizando um micrômetro de precisão (IGaging San Clemente, CA, EUA).

388 As porcentagens da gema e da casca foram calculadas em relação ao peso do ovo. O
389 peso e a porcentagem de albúmen foram determinados à partir da diferença entre o peso do ovo
390 e o peso da casca e da gema. Além disso, com as medidas do albúmen e do peso do ovo,
391 também foram determinados os valores da Unidade Haugh dos ovos, que foi calculado utili-
392 zando a fórmula proposta por Card e Nesheim (1966), sendo: $UH = 100 \log (H+7,57-1,7W^{0,37})$,
393 onde H é a altura do albúmen (mm) e W é o peso do ovo (g), sendo que essa relação da altura
394 do albúmen corrigida para o peso do ovo, também é uma forma de avaliar a qualidade interna
395 dos ovos.

396

397 **3.5. Amônia e pH das excretas**

398 Na pesquisa também foi realizada análise de nitrogênio amoniacal nas excretas, pesando
399 100 g de amostra, colocadas em um frasco de vidro com tampa de capacidade de 750 mL.
400 Posteriormente, sobre as excretas inseridas no recipiente foi fixado um béquer de 50 mL con-
401 tendo 10 mL de solução de 2% de ácido bórico para fixação da amônia liberada pela excreta.
402 Logo após, os recipientes foram fechados e deixados em repouso por 17 horas. A determinação
403 da quantidade (mg) de amônia (NH₃) fixada na solução de ácido bórico foi realizada pela titu-
404 lação com ácido sulfúrico padronizado na concentração de 0,05, cujos os frascos foram abertos
405 e retirado o béquer com a solução de ácido bórico para fazer a titulação. Os resultados foram
406 expressos em miligrama de amônia liberada através da fórmula: $A = \frac{Vt \times N \times 1,7}{P}$; em que A: NH₃
407 (mg); Vt: volume da solução de H₂SO₄ gasto na titulação (mL); N: normalidade do ácido usado;
408 e P: quantidade incubada (g) (HERNANDES e CAZETTA, 2001).

409 Para análise de pH (potencial Hidrogeniônico) das amostras de excretas foi utilizado 9
410 g de excreta de aves em um recipiente de 100 mL, em que foi adicionado 60 mL de água desti-
411 lada, seguida de um repouso por um período de 30 minutos, após esse período procedeu-se
412 homogeneização do conteúdo contido no recipiente e a leitura do pH (SILVA; QUEIROZ,

413 2002). O pH foi aferido utilizando um pHmetro digital (modelo Kasvi K39), previamente cali-
414 brado com soluções-padrão de pH 4, 7 e 10.

415

416 **3.6 Parâmetros sanguíneos**

417 Para as análises hematológicas, foram coletadas amostras de sangue (4 ml) da veia de
418 uma das asas das aves com 70 semanas de idade, utilizando 1(uma) ave por parcela. Para aná-
419 lise dos parâmetros bioquímicos do sangue, foram coletadas amostras de soro de 2 (duas) aves
420 por parcelas, sendo 4 ml de sangue por ave, também com 70 semanas de idade.

421 A hematologia consistiu na análise de hemácias, hemoglobina, hematócritos, plaquetas,
422 proteínas plasmáticas totais, leucócitos, heterofilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos. As
423 amostras sanguíneas foram enviadas ao laboratório especializado – LaborVet. A contagem de
424 hemácias, leucócitos e plaquetas foram realizadas em câmara de Neubauer. O hematócrito foi
425 obtido através do método do microcapilar e a mensuração da proteína plasmática total de refe-
426 rência.

427 Quanto às análises bioquímicas, as amostras de soro foram submetidas à análise de pro-
428 teína totais, albumina, creatinina, cálcio, URATO/ Ácido úrico, ureia, Fosfatase alcalina (ALP),
429 aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamyl transferase
430 (GGT). Para realizar as análises utilizou-se kits comerciais (Doles) de acordo com a orientação
431 técnicas do fabricante. Para a leitura dos parâmetros utilizou-se equipamentos de espectrofoto-
432 metria, sendo essas análises realizadas no laboratório de Biologia Molecular Aplicada a produ-
433 ção Animal (BIOPA/UFRPE).

434

435 **3.7 Morfometria dos órgãos**

436 Para realização da morfometria dos órgãos foram utilizadas 48 galinhas (oito aves por
437 tratamento), com 70 semanas de idade. Em cada parcela experimental foi escolhida uma ave
438 com base no peso médio por gaiola. Primeiramente as aves foram eutanasiadas por desloca-
439 mento cervical, segundo recomendações do CONCEA (2013). Em seguida foi realizada a pe-
440 sagem dos órgãos, dentre eles o pro-ventrículo juntamente com a moela (após a retirada do
441 conteúdo do interior dos órgãos), o baço, fígado, coração e pâncreas. Além disso, foi medido o
442 comprimento do intestino, de cada ave. Os dados de peso e comprimento o do intestino, foram
443 mensurados no intuito de obter os pesos absoluto e relativo em relação ao peso corporal. Foi
444 calculada, ainda, a porcentagem de cada variável, avaliada em relação ao peso vivo.

445

446

3.8 Análise estatística

Foram testadas as pressuposições dos erros da normalidade e homocedasticidade. A estatística foi analisada através da Análise de Variância (ANOVA) usando o teste F com valor de $\alpha = 0,05$ e foram realizadas utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.4). O modelo estatístico aplicado foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij} \text{ onde,}$$

y_{ij} é o valor da variável resposta relacionada à observação referente ao tratamento i no bloco j , μ é a média geral, T_i é o efeito do i -ésimo tratamento com $i = 1, 2, 6$ e B_j é o efeito do j -ésimo bloco com $j = 1, 2, 8$ e ε_{ij} é o erro experimental aleatório normalmente distribuído com média zero e variância σ^2 [$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$] associado à observação y_{ij} .

Para a comparação dos resultados obtidos com cada um dos níveis de inclusão da Clinoptilolita em relação à ração controle, foi utilizado o teste de Dunnett, a 5 % de significância. Após a ANOVA, para as variáveis com efeito significativo para tratamento, análises de regressão foram realizadas, usando o PROC GENMOD do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.4), avaliando efeitos linear, quadrático e cúbico e o PROC NLMIXED para o modelo LP (Linear Platô) para identificar o melhor nível de inclusão de clinoptilolita. Os modelos lineares e o LP foram comparados usando o critério de informação Akaike (AIC), considerando o log da máxima verossimilhança ($-2 \log L$) e o número de variáveis explicatórias no modelo.

4. RESULTADOS

4.1 Desempenho

A inclusão de diferentes níveis de zeólita na dieta das poedeiras não influenciaram ($p > 0,05$) as variáveis de desempenho em termos de porcentagem de postura, peso médio dos ovos, massa de ovo, consumo de ração e conversão alimentar por massa e por dúzia de ovos (Tabela 3).

481 **Tabela 3.** Valores médios e erros padrões da média para desempenho produtivo da poedeira Isa Brown
 482 avaliada durante 112 dias e com idade inicial de 54 semanas, em função de níveis de zeólita na ração e
 483 nível de probabilidade para o teste F.

Níveis de zeólita, %	Postura, %	Peso médio dos ovos, g	Massa de ovo ao dia, g	Consumo de ração por ave ao dia, g	Conversão (g de ração por g de ovo)	Conversão (kg de ração/dúzia)
0,0	90,51±1,27	59,33±0,77	53,67±0,80	107,0±0,4	2,001±0,031	1,183±0,011
0,7	87,79±1,61	59,34±0,73	52,10±1,11	106,3±0,3	2,051±0,042	1,211±0,014
1,4	87,28±1,44	60,33±0,71	52,65±0,87	106,7±0,4	2,037±0,038	1,222±0,016
2,1	87,22±1,46	59,15±0,65	51,60±1,24	105,9±0,4	2,066±0,042	1,214±0,013
2,8	87,47±1,36	59,37±0,59	51,98±0,55	106,6±0,3	2,063±0,020	1,219±0,015
3,5	86,56±1,12	59,14± 0,40	51,21±0,82	106,0±0,2	2,078±0,035	1,224±0,018
Média	87,80±0,53	59,44± 0,26	52,20±0,38	106,4±0,2	2,049±0,014	1,212±0,006
Nível de Prob (p=)	0,3762	0,8244	0,5608	0,1508	0,335	0,2759

484

485

486 4.2 Qualidade dos ovos

487 Em relação à qualidade externa dos ovos em termos de porcentagem de ovos quebrados,
 488 trincados, sujos e ovos considerados fora do padrão de tamanho para comercialização, não foi
 489 observada diferença estatística ($p>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4).

490

491 **Tabela 4.** Valores médios e erros padrões da média para a qualidade externa de ovos de poedeira Isa
 492 Brown, com idade inicial de 54 semanas em função de níveis de zeólita na ração e valor para nível de
 493 probabilidade do teste F.

Níveis de zeólita, %	Ovos quebrados	Ovos trincados	Ovos sujos	Ovos fora do padrões
	%			
0,0	2,91±0,88	2,94±0,70	4,32±1,09	10,75±1,97
0,7	2,28±0,52	3,45±0,54	6,63±1,62	13,53±2,06
1,4	2,57±0,53	3,14±0,56	5,49±1,10	12,11±1,29
2,1	1,93±0,37	1,97±0,32	6,50±1,53	11,42±1,44
2,8	2,23±0,34	3,04±0,49	3,69±0,45	9,68±0,72
3,5	2,26±0,25	2,80±0,17	5,46±0,97	11,45±1,18
Média	2,37±0,21	2,89±0,22	5,35±0,48	11,49±0,61
Nível Prob. (p=)	0,8361	0,5321	0,4786	0,5307

494

495

496 Quanto as variáveis de peso dos ovos, porcentagem e espessura da casca, porcentagem
 497 e altura do albúmen, porcentagem de gema e Unidades Haugh (UH), também não apresentaram
 498 diferença estatística ($p>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5).

499 **Tabela 5.** Valores médios e erro padrão da média para peso médio e composição dos ovos de poedeira Isa Brown com idade inicial de 54 semanas em função
500 de níveis de zeólita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F.

Variáveis	Níveis de Zeólita, %						Média Geral	Prob Nível
	0,0	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5		
Peso do ovo (g)	60,29±0,39	59,99±0,31	60,69±0,44	59,69±0,45	60,28±0,47	60,53±0,28	60,24±0,16	0,5213
Peso casca (g)	5,890±0,07	5,876±0,052	5,983±0,074	5,858±0,064	5,842±0,087	5,895±0,064	5,890±0,027	0,7683
Casca (%)	9,79±0,13	9,81±0,09	9,86±0,10	9,82±0,07	9,70±0,10	9,75±0,12	9,79±0,04	0,9069
Espessura de casca (mm)	0,391±0,005	0,390±0,004	0,395±0,004	0,393±0,003	0,389±0,003	0,393±0,004	0,392±0,001	0,8849
Peso albúmen (g)	39,28±0,34	39,17±0,30	39,65±0,31	38,99±0,36	39,56±0,38	39,82±0,33	39,41±0,14	0,4779
Albúmen (%)	65,11±0,30	65,26±0,29	65,30±0,21	65,29±0,24	65,58±0,29	65,76±0,31	65,38±0,11	0,5762
Altura de albúmen (mm)	7,523±0,144	7,259±0,053	7,483±0,119	7,235±0,093	7,808±0,148	7,399±0,161	7,451±0,056	0,0534
Unidade Haugh	86,09±0,85	84,61±0,33	85,91±0,66	84,54±0,61	87,86±0,84	85,32±0,98	85,72±0,33	0,0521
Peso gema (g)	15,12±0,18	14,94±0,16	15,06±0,17	14,84±0,16	14,88±0,13	14,82±0,15	14,94±0,06	0,7159
Gema (%)	25,10±0,24	24,93±0,25	24,83±0,23	24,89±0,25	24,72±0,21	24,49±0,27	24,83±0,10	0,5760

501

502 **4.3 Amônia e pH das excretas**
503

504 Quantos aos valores de amônia, foi observado efeito estatístico ($p < 0,05$), com a redução
505 na emissão de amônia mediante ao aumento dos níveis de inclusão de zeólita na dieta, quando
506 comparado com o tratamento testemunha (sem zeólita). Quanto aos valores de pH das excretas
507 ($p = 0,05$) houve menores valores nos níveis de 0,7 e 1,4% de inclusão de zeólita, reduzindo em
508 3,86% e 4,82%, respectivamente (Tabela 6).

509

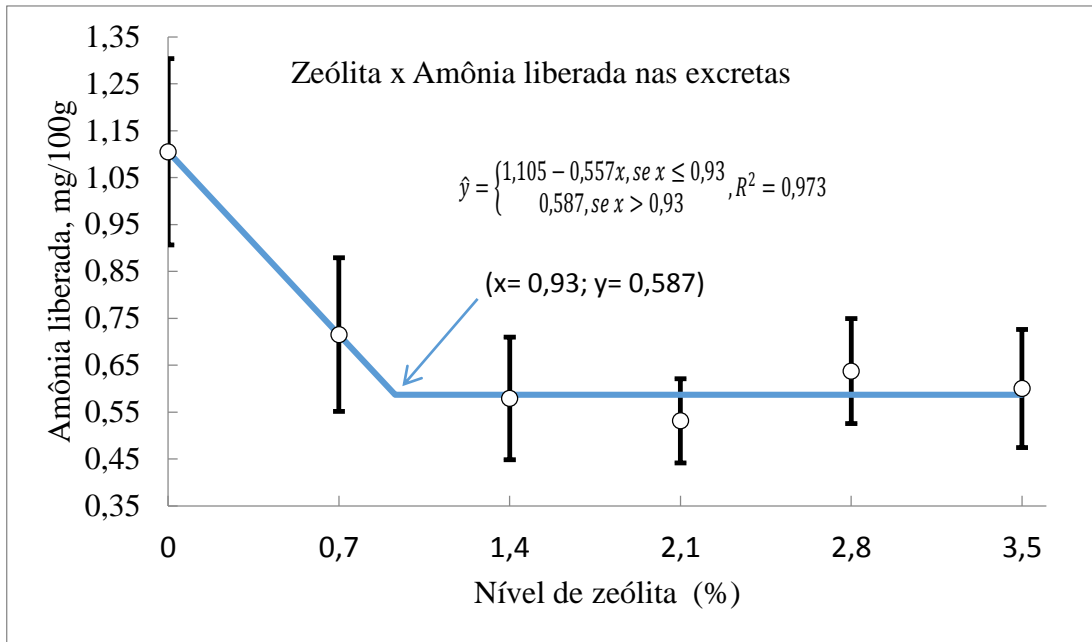
510 **Tabela 6.** Valores médios e erros padrões da média para teor de nitrogênio amoniacal liberado das
511 excretas e pH das excretas da poedeira Isa Brown com 54 semanas de idade em função de níveis de
512 zeólita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F.

Níveis de zeólita, %	Teor de N amoniacal, mg/100g	pH das excretas
0,0	1,11±0,20	7,26±0,14
0,7	0,72±0,16*	6,98±0,08*
1,4	0,58±0,13*	6,91±0,07*
2,1	0,53±0,09*	7,07±0,09
2,8	0,64±0,11*	7,14±0,10
3,5	0,60±0,13*	7,22±0,10
Média	0,70±0,06	7,10± 0,04
Nível de Prob. (p=)	0,050	0,049

513 Médias nas colunas seguidas de asterisco diferem da dieta controle pelo teste Dunnett ($p \leq 0,05$).

514

515 Com base na análise de regressão Linear Platô ($P = 0,0033$), a estimativa é de uma redu-
516 ção de 46,9% na liberação de amônia das excretas (Figura 3). Este valor foi estimado através
517 da equação a partir de um valor estimado de 1,105 mg de amônia liberada/100 g de excreta na
518 dieta isenta de zeólita, contra um valor constante estimado de 0,587 mg/100g no nível de 0,93%
519 do aditivo.



520

521 Figura 3. Efeito do nível de zeólita na ração de poedeira Isa Brown sobre a amônia liberada nas excretas.

522

523 4.4 Parâmetros sanguíneos

524 Não se verificou influência dos níveis de zeólita ($p > 0,05$) para nenhuma das variáveis
 525 sanguíneas hematológicas avaliadas (Tabela 7), assim como das variáveis sanguíneas de bio-
 526 química sérica (Tabela 8).

527

528

529 **Tabela 7.** Valores médios e erros padrões da média das variáveis de hematológicas de poedeira Isa Brown com 54 semanas de idade em função de níveis de
 530 zeólita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F.

Parâmetros	Níveis de Zeólita, %						Média Geral	Prob Nível
	0,0	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5		
Eosinófilos relat, %	1,000±0,447	0,00±0,00	0,667±0,333	1,833±0,872	0,500±0,500	0,333±0,211	0,722±0,206	0,2454
Heterófilos relat, %	50,83± 6,23	52,17± 3,64	59,67± 5,25	54,17± 2,04	46,67± 5,05	45,33± 6,09	51,47± 2,03	0,4677
Linfócitos relat, %	45,83± 5,87	46,33± 3,74	38,17± 5,16	39,83± 2,98	50,33± 5,20	52,00± 5,43	45,42± 2,02	0,3548
Monócitos relat, %	2,333±0,955	1,500±0,342	1,500±0,224	4,167±1,740	2,500±1,118	2,333±0,843	2,389±0,409	0,5700
Plaquetas totais	5500±885	7000±2000	5667±615	4500±428	5000±816	5833±703	5583±372	0,5868
Leucócitos	1970±200	2213±294	2047±206	2200±493	2535±342	3117±335	2347±140	0,0815
Hemácias x 10 ³ /mm ³	2337±161	2247±203	2150±141	2435±251	2393±166	2228±143	2298± 71	0,8027
Heterófilos: Linfócitos	1,079±0,268	1,193±0,168	1,317±0,284	1,408±0,134	1,151±0,191	0,981±0,213	1,185±0,081	0,6874
Hematócrito, %	26,33± 0,92	27,83± 1,40	27,00± 0,26	26,17± 0,65	26,33± 1,12	25,67± 0,88	26,56± 0,37	0,4592
Hemoglobina, g/dL	8,750±0,335	9,350±0,527	8,817±0,111	8,800±0,254	8,850±0,419	8,433±0,410	8,833±0,146	0,5479
Hemoglobina Corpuscular Média, pg	38,41± 3,03	42,55± 2,77	41,95± 2,95	37,48± 2,86	37,50± 2,06	38,45± 2,48	39,39± 1,08	0,7371
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média	33,21± 0,29	33,54± 0,34	32,65± 0,16	33,62± 0,33	33,60± 0,69	32,84± 0,97	33,24± 0,21	0,7935
Volume Corpuscular Médio, fL	115,5± 8,6	126,9± 8,3	128,4± 8,6	111,7± 8,9	111,3± 4,3	116,9± 6,0	118,4± 3,1	0,5959
Proteína Plasmática Total, g/dL	7,533±0,813	8,240±0,695	7,333±0,169	7,250±0,280	7,800±0,529	7,400±0,556	7,574±0,213	0,6091
Hemoglobina x3: Hematócrito	0,996±0,009	1,006±0,010	0,980±0,005	1,009±0,010	1,008±0,021	0,985±0,029	0,997±0,006	0,7935
Hemácias x3: Hemoglobina	0,806±0,065	0,719±0,044	0,733±0,051	0,828±0,072	0,812±0,045	0,796±0,050	0,782±0,022	0,7322

531

532

533 **Tabela 8.** Valores médios e erro padrão da média das variáveis de bioquímica sérica de poedeira Isa Brown com 54 semanas de idade em função de níveis
 534 de zeólita na ração e valor para nível de probabilidade do teste F.
 535

Parâmetros	Níveis de zeólita, %						Média Geral	Prob Nível
	0,0	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5		
Proteína Total	8,940±0,397	9,533±0,392	9,651±0,321	9,837±0,333	9,708±0,309	9,618±0,265	9,548±0,137	0,5452
Albumina	1,651±0,134	1,728±0,122	1,744±0,231	1,805±0,094	1,918±0,137	1,967±0,149	1,802±0,060	0,7138
Globulina	7,289±0,329	7,806±0,292	7,907±0,323	8,032±0,303	7,790±0,276	7,651±0,315	7,746±0,123	0,6118
Relação Glob:Alb	4,639±0,483	4,622±0,235	5,179±0,759	4,528±0,290	4,238±0,402	4,082±0,381	4,548±0,184	0,6496
Creatinina	0,30±0,032	0,31±0,039	0,31±0,020	0,30±0,023	0,29±0,034	0,28±0,039	0,30±0,013	0,9585
Fosfatase	539,3±74,5	558,5±64,5	560,5±46,4	527,3±30,5	475,2±45,9	422,2±48,7	515,8±22,0	0,5527
AST - TGO	171,6±6,7	166,1±5,0	164,1±7,8	162,9±6,7	167,0±11,0	176,0±8,5	168,0±3,1	0,8661
GGT	295,1±65,5	378,1±69,5	399,8±19,4	398,4±35,7	393,5±68,0	390,2±70,2	375,5±22,9	0,6198
TGP - ALT	21,66±2,70	16,96±3,74	15,96±3,92	18,05±3,62	20,35±6,15	23,74±5,57	19,45±1,76	0,7694
Cálcio	32,52±1,48	33,05±0,82	32,94±1,56	32,55±0,79	32,00±1,23	30,82±0,68	32,31±0,46	0,7786
Urato	3,678±0,375	3,537±0,435	3,316±0,429	3,173±0,511	3,051±0,570	2,966±0,424	3,293±0,183	0,8733
Ureia	1,918±0,223	1,990±0,209	2,032±0,164	2,033±0,161	1,947±0,217	1,727±0,125	1,941±0,074	0,7819

536 AST-TGO - Transaminase oxalacética ou Aspartato aminotransferase, TGP-ALT - Transaminase pirúvica ou Alanina aminotransferase, GGT - Gama Glutamil Transferase.

537 4.5 Morfometria dos órgãos

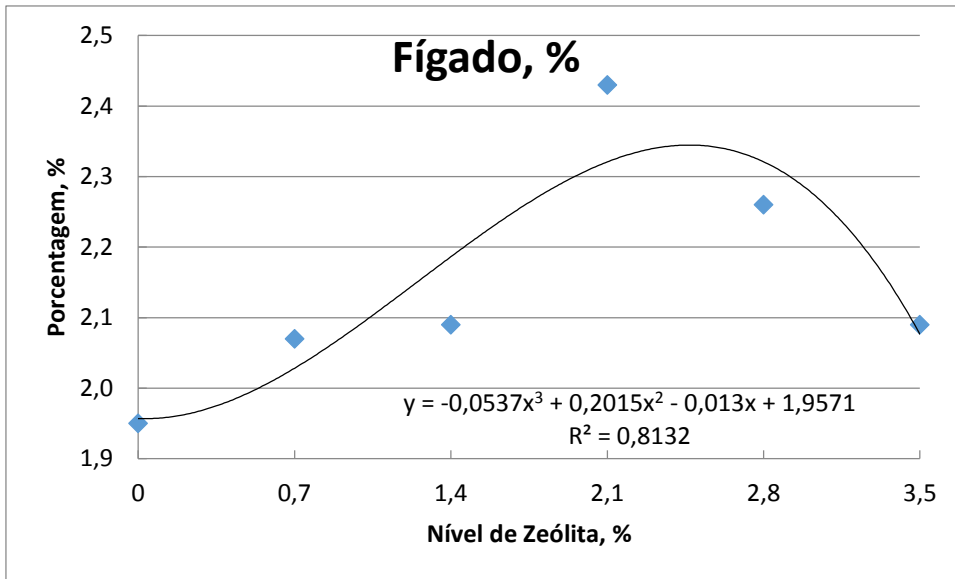
538 Nas análise em andamento, não foi observado efeito ($p>0,05$) para as variáveis de peso
539 relativo do proventrículo juntamente com a moela, baço, coração e pâncreas. Entretanto, para
540 o peso relativo do fígado ($P=0,002$) e o comprimento do intestino ($P=0,048$) com a inclusão de
541 zeólita na dieta (Tabela 9). Ao realizar a análise de regressão foi observado um efeito quadrático
542 para o peso relativo do fígado ($P=0,0043$) e comprimento do intestino ($P=0,0047$), de acordo
543 com a Figuras 4 e 5, respectivamente. Nas avaliações realizadas foi constatado um aumento no
544 peso relativo do fígado em função da inclusão da zeólita em comparação com tratamento con-
545 trole, com valores mais acentuados nos níveis 2,1 e 2,8% inclusão da zeólita, apresentando um
546 aumento relativo de 24,6 e 15,9 %, respectivamente. O comprimento do intestino foi influenci-
547 ado de forma consistente e significativa ($p<0,05$) pela presença da zeólita nos níveis de inclusão
548 de 1,4%, 2,1% e 2,8% quando os valores alcançados foram maiores nestes níveis quando com-
549 parados com os valores observados na dieta controle.

550 **Tabela 9.** Valores médios e erro padrão da média da morfometria dos órgãos de galinhas poedeiras semipesadas alimentadas com diferentes níveis de zeólita e
 551 valor de probabilidade segundo o teste F.

Variáveis	Níveis de zeólita, %						Média Geral	Prob Nível
	0,0	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5		
Peso vivo final (g)	1910± 14	1915± 21	1897± 21	1895± 20	1895± 27	1888± 23	1901 ± 8,3	0,956
Peso ao abate (g)	1928±18	1908±13	1879±12	1887±15	1894±19	1914±13	1901± 6,4	0,268
Intestino (%)	4,43±0,30	4,59±0,09	4,77±0,27	4,99±0,17	5,11±0,26	4,51±0,21	4,73±0,10	0,2535
Fígado (%)	1,95±0,10	2,07±0,07	2,09±0,09	2,43±0,08*	2,26±0,07*	2,09±0,06	2,15±0,04	0,002
Moela (%)	1,26±0,07	1,27±0,04	1,33±0,02	1,30±0,07	1,42±0,04	1,28±0,05	1,31±0,02	0,303
Ceco (%)	0,91±0,02	0,89±0,03	1,01±0,06	0,95±0,05	0,93±0,03	0,86±0,04	0,93±0,02	0,153
Coração (%)	0,38±0,03	0,37±0,03	0,38±0,03	0,39±0,01	0,40±0,02	0,40±0,03	0,39±0,01	0,908
Pró-ventrículo (%)	0,32±0,02	0,31±0,02	0,35±0,012	0,33±0,02	0,35±0,02	0,32±0,01	0,33±0,01	0,367
Pâncreas (%)	0,17±0,02	0,16±0,01	0,17±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01	0,16±0,01	0,17±0,01	0,698
Baço (%)	0,07±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01	0,10±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,09±0,001	0,439
Comprimento do Intestino (cm)	140,5± 6,6	150,1± 3,6	156,3± 4,9*	161,6± 4,1*	159,3± 3,1*	148,0± 5,0	152,6± 2,1	0,048

552 Médias seguidas de asterisco diferem pelo teste Dunnet ($p \leq 0,05$).

553

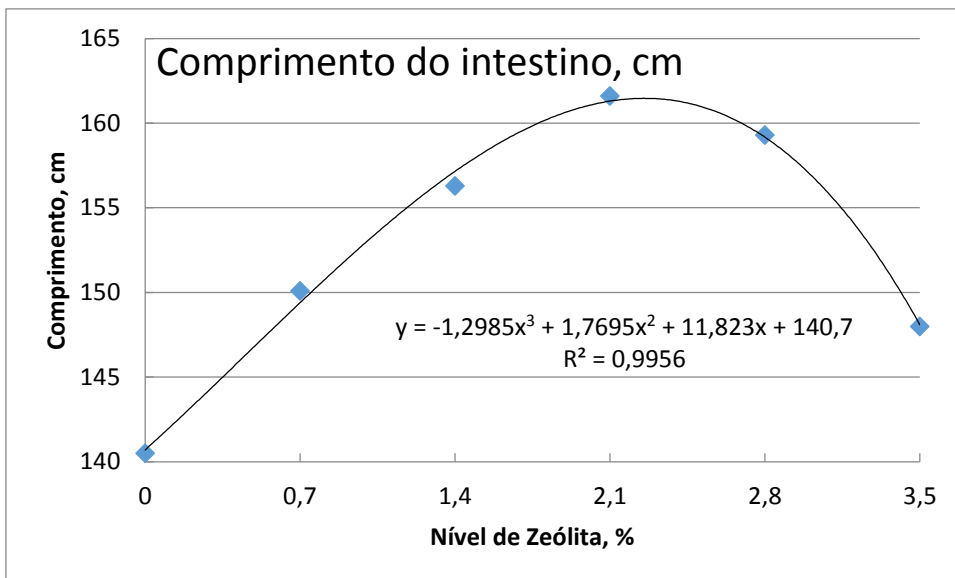


554

555 Figura 4. Efeito do nível de zeólita na ração de poedeira Isa Brown sobre o peso relativo do
 556 fígado.

557

558



559

560 Figura 5. Efeito do nível de zeólita na ração de poedeira Isa Brown sobre o comprimento do
 561 intestino.

562

563

564 5. DISCUSSÃO

565

566 Nesses estudos, foi possível observar que a zeólita pode reduzir a amônia excretada,
 567 aumentar o peso relativo do fígado e o comprimento do intestino das galinhas poedeiras.

568 Com relação ao desempenho produtivo e qualidade de ovos, demonstraram que a pre-
569 sença da zeólita não afetou tais parâmetros, sendo, mantida a produção e a qualidade de ovos
570 das poedeiras avaliadas durante o período entre 54 até 70 semanas de idade. A inexistência de
571 efeito da inclusão da zeólita na dieta sob a produção e qualidade de ovos, pode ser justificado
572 pelas características intrínsecas deste aditivo, tendo em vista ser um composto inorgânico que
573 não é absorvido pelo organismo das aves, não substituindo, portanto, nutrientes presentes na
574 dieta, apesar de fornecer elementos que participaram de reações no organismo animal (AN-
575 DRONIKASHVILI et al., 2009), possuindo capacidade de adsorção de íons e de troca catiônica,
576 não proporcionando efeitos negativos ao desempenho zootécnico das aves.

577 Nesses estudos de Kermanshahi et al (2011), também não foram encontradas diferenças
578 na produção e no peso dos ovos ao se adicionar zeólita na ração de poedeiras. Por outro lado,
579 Machacek et al. (2010) estudando níveis de inclusão de clinoptilolita (2 e 4%), o mesmo tipo
580 de zeólita utilizado neste experimento, mas sendo utilizado para galinhas poedeiras híbridas
581 Bovans Goldline, verificaram aumento no peso médio dos ovos com a inclusão de até 2% de
582 zeólita na dieta de poedeiras em relação à dieta controle, e redução no consumo de ração. Já
583 Emam et al. (2019) só encontrou efeito positivo na produção e qualidade dos ovos na inclusão
584 de 4% de zeólita (clinoptilolita) nas dietas de aves de postura. Fendri et al. (2012) observaram
585 efeito da zeólita a nível de 1% de adição na dieta, sobre as variáveis de peso dos ovos e peso de
586 albúmen, com aumento de ambas. Romero et al. (2012) também observou resultados satisfató-
587 rios na produção e na qualidade dos ovos estudando dietas, contendo zeólita para poedeiras.
588 Romero et al. (2012) também observou resultados satisfatórios na produção e qualidade dos
589 ovos estudando dietas para poedeiras contendo zeólita.

590 Entretanto, os resultados reportados na literatura sobre a quantidade de inclusão da ze-
591 olita na dieta de aves poedeiras e seus efeitos nos aspectos produtivos e qualitativos dos ovos,
592 ainda são muito inconsistentes, visto que pode variar de acordo com diversos fatores como tipo
593 e origem da zeólita, linhagem da ave, nível tecnológico empregado no sistema, dentre outros.
594 Assim nas condições em que foram desenvolvida esta pesquisa, ao submeter as poedeiras da
595 linhagem Isa Brown com peso aproximado de 1,750 kg, por um período de 112 dias às dietas
596 isonutricionais, com níveis de inclusão de clinoptilolita (Tabela 1), que se refere à zeólita testada
597 neste experimento, não foi possível observar efeito sobre os parâmetros produtivos e de quali-
598 dade dos ovos. Estes resultados, contudo, foram satisfatórios, tendo em vista que o intuito pri-
599 mordial era a inclusão da zeólita é para mitigar os efeitos da amônia presentes nas excretas a
600 fim de proporcionar o bem estar e sanidade das aves.

601 Quanto aos valores da redução de pH observados nas excretas das aves, inúmeros tra-
602 balhos também indicam essa mesma tendência (SCHNEIDER et al., 2017). A avaliação do pH
603 das excretas é um fator importante na produção avícola, pois é determinante no processo de
604 emissão de amônia nos galpões, visto que a acidificação ($\text{pH} < 7,0$) das excretas pode minimizar
605 a liberação e os impactos ocasionados pela amônia (AVILA et al., 2011; SCHNEIDER et al.,
606 2017). Conforme Romero et al, (2012) as dietas assim formuladas permitem a redução do pH
607 das excretas devido a protonação da amônia (NH_3) volátil até o íon amônio (NH_4^+) menos vo-
608 látil. Em função do seu arranjo estrutural a zeólita em tem a capacidade de adsorver a amônia
609 reduzindo o potencial de volatilização de compostos amoniacaís (KRALJEVIĆ-PAVELIĆ et
610 al., 2018).

611 Em relatos de pesquisas nos quais foram comparadas dietas de reduzida emissão e na
612 liberação de amônia nas excretas foi de até 48% (ROMERO et al., 2012). No presente experi-
613 mento, o valor médio na redução da liberação de amônia calculado para as cinco dietas com
614 inclusão de Zeólita é de 46,9% e na estimativa da equação de regressão de melhor ajuste o valor
615 correspondente estimado é de inclusão de 0,93 % de Zeólita. Este efeito característico sobre a
616 liberação da amônia vem associado com uma redução máxima estimada de até 4,6% no pH da
617 excreta ao nível ótimo de 1,18% de Zeólita na dieta. Com os dois níveis de Zeólita (0,7 e 1,4%)
618 nos quais o pH das excretas foi significativamente diferente da dieta controle, em média, é
619 possível observar uma redução. A magnitude da redução no pH das excretas não depende so-
620 mente dos aditivos usados, mas dependem da composição das dietas. Por este motivo não é
621 possível fazer uma comparação entre as diferentes pesquisas, porém Romero et al. (2012) rela-
622 taram uma redução de 9,94% no pH com o uso da dieta de reduzida emissão de amônia contendo
623 gesso e Zeólita em dietas milho e farelo de soja.

624 As dietas foram formuladas apenas com a alteração relativa entre inerte e zeólita para
625 os diferentes níveis, sendo os demais ingredientes mantidos constantes (Tabela 1) e, isto, re-
626 força o efeito exclusivo (quando presente) do aditivo em avaliação.

627 Os parâmetros do perfil sanguíneo são indicadores do estado fisiológico, patológico e
628 nutricional de animais, havendo mudanças nas variáveis hematológicas é um indicativo a ser
629 utilizado para elucidar o impacto de fatores nutricionais, que estão presentes na dieta das aves
630 (Kim et al, 2017). Os linfócitos B e T são considerados os mecanismos de defesa, juntamente
631 com os anticorpos e linfocinas, formam a resposta imunológica. Os linfócitos T estimulam o
632 sistema imunológico em resposta a agentes infecciosos ou indutores de estresse (ZAKARIAS
633 et al., 2002). Jarosz et al. (2017), utilizando zeólita como aditivo alimentar na dieta de frangos
634 de corte, verificaram que a energia metabólica adquirida na dieta é usada na proliferação de

635 linfócitos, que fazem parte da resposta imune a antígenos e atuam na defesa imunológica das
636 aves. Porém, ainda não se sabe o efeito modulador ou supressor da zeólita no mecanismo de
637 defesa do organismo.

638 Os valores observados neste estudo para hematologia e bioquímica ficaram dentro dos
639 padrões para as variáveis estudadas. Os valores para hemoglobina (8,750 g/dl), foram próximos
640 aos encontrados por Machacek et al (2010), que ao adicionar 2% com níveis de zeólita na dieta,
641 encontraram valores de hemoglobina em torno de 7,940 g/dl. Ou seja, os níveis de zeólita uti-
642 lizados nessa pesquisa não alterou os parâmetros sanguíneos das poedeiras.

643 Entretanto, no presente experimento houve um aumento no peso relativo do fígado nos
644 níveis 2,1 e 2,8% de clinoptilolita, que provavelmente deve ser um reflexo da dinâmica do
645 metabolismo dos compostos nitrogenados e demais nutrientes. Isto é justificado pelo trabalho
646 realizado por Machacek et al (2010), em que observaram uma redução de proteína total e glicose
647 no sangue com a suplementação de 2 e 4 % de clinoptilolita comparados as aves de postura
648 alimentadas sem o aditivo. Os autores afirmaram que esta redução no nível de glicose pode ser
649 interpretada como consequência aumento do transporte de glicose para as células dos tecidos,
650 um deles é o fígado.

651 O aumento do comprimento do intestino das poedeiras com valor máximo estimado para
652 uma inclusão de 2,25% de zeólita, pode está relacionado com a digestibilidade do alimento no
653 trato gastrointestinal. Este aumento está concordando com Berto (2009) quando afirmou que a
654 fixação do excesso de amônia produzida nos processos de digestão e fermentação intestinal pela
655 clinoptilolita, pode beneficiar a integridade intestinal e, conseqüentemente, afetar de forma po-
656 sitiva a absorção e o aproveitamento de nutrientes da dieta. O autor contextualizou também que
657 além dos benefícios para a integridade intestinal, a adsorção de amônia pode beneficiar também
658 certos processos metabólicos. Porém, níveis mais elevados de zeólita proporcionou redução no
659 comprimento do intestino, concordando com Machacek et al (2010) ao afirmar que outros
660 efeitos devem ser levados em consideração com administração a longo prazo de clinoptilolita,
661 pois doses elevadas deste mineral podem afetar as substâncias biologicamente ativas, como
662 vitaminas, oligoelementos e outras substâncias de ação específicas, podendo influenciar no
663 metabolismo dos nutrientes.

664 Wu et al. (2013a) avaliaram a inclusão 2% de uma clinoptilolita natural em dietas de
665 frangos de corte e observaram mudanças benéficas na morfologia intestinal através do aumento
666 nas vilosidades do intestino das aves, embora os autores não terem encontrado diferença
667 significativa nos dados de produção, estado de acordo com o presente trabalho. Ainda segundo
668 estes mesmos autores, a adição de zeólita na dieta, também pode proporcionar ações seletivas

669 sobre a microbiota intestinal no trato digestivo pela alteração do pH no intestino e ceco de
670 frangos de corte.

671 Aplicação oral em humanos de Clinoptilolita sugere ter um impacto positivo no trato
672 intestinal, devido a influência na integridade da parede intestinal, de acordo com Mastinu et al.
673 (2019).

674 De maneira geral, observa-se na literatura efeitos benéficos na ação da zeólita em níveis
675 na dieta de 2 a 4%, entretanto é importante que no presente estudo o nível de zeólita de apenas
676 0,93% já ocasionaram efeitos impactantes na emissão e circulação de amônia presentes nas
677 fezes das aves para o ambiente, que de acordo com Swelum et al. (2021), isto contribui com a
678 melhoria do bem estar animal, tendo em vista que níveis elevados (>25 ppm) deste gás dentro
679 dos galpões podem ser tóxicos para as aves e ocasionar prejuízos sanitários e econômicos.

680

681 **6. CONCLUSÃO**

682

683 Nas condições em que foi realizado o presente estudo a zeólita (clinoptilolita) é
684 recomendável serem incluídas nas dietas de aves de postura comerciais no nível de 0,93%,
685 promovendo em menor emissão da amônia para o ambiente, menor pH das excretas, benefici-
686 ando a morfologia intestinal e o metabolismo do fígado, com conseqüente não comprometi-
687 mento na produção e na qualidade dos ovos.

688

689 **7. REFERÊNCIAS**

690

691 AVILA, V. S. et al. Valor Agronômico da Cama de Frangos após Reutilização por Vários Lotes
692 Consecutivos. **Comunicado Técnico**, 446. Concórdia, SC. Dezembro, 2007.

693 ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual. Disponível
694 em:<http://abpa.br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>. Acesso
695 em: 06/07/2019.

696 ANDRONIKASHVILI. T. et al. Possibility of Application of Natural Zeolites for Medical
697 Perposes. **Bulletin Georgian National Academy of Science**, v.3, n.2, 2009.

698 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Secretaria de defesa agropecu-
699 ária. **Instrução Normativa nº 20 de 21 de outubro de 2016**. Diário oficial da união. Ed. 205,
700 S. 1, pag. 13. 2016.

701 BERTO, D. A. et al. Effects of dietary Clinoptilolite and calcium levels on the performance and
702 egg quality of commercial layers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, p. 263–268,
703 2013.

- 704 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastacimento/ Secretaria de defesa agropecu-
705 ária. Decreto Nº 9.013, de 19 de março de 2017. Diário oficial da união. Ed. 62, seção. 1, p. 77.
706 2017.
- 707 CONCEA, **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea**. Brasília/DF, 2013. Ministério da
708 Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal –
709 CONCEA, 54 p.
- 710 DEL CAMPO, N. **Uso de Zeólitas naturais en Nutrición Animal**. Santiago, Chile: Minera
711 Formas, v.22. 2004.
- 712 DENG, Y. et al. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. **Applied Clay Sci-**
713 **ence**, v. 50, n. 1, p. 92–98, 2010.
- 714 DUKES. Physiology of domestic animals. **Reece**. ed. 13- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
715 2017.
- 716 ELLIOTT, C. T.; CONNOLLY, L.; KOLAWOLE, O. Potential adverse effects on animal
717 health and performance caused by the addition of mineral adsorbents to feeds to reduce myco-
718 toxin exposure. **Mycotoxin research**. v. 36. p. 115-126, 2020.
- 719 EMAM, K.R.S et al. Effect of zeolite dietary supplementation on physiological responses and
720 production of laying hens drinking saline well water in South Sinai. **World Veterinary Jour-**
721 **nal**, v. 9, n. 2, p. 109-122, 2019.
- 722 FRANÇA, G. L. **Excreção de nitrogênio por galinhas poedeiras submetidas a diferentes**
723 **temperaturas e níveis de energia metabolizável na ração**. 2017. Tese (Doutorado Engenharia
724 Agrícola) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Vi-
725 çosa, Minas Gerais.
- 726 FERREIRA, R. A. **Suinocultura: Manual Prático de Criação**. Cap. 11. Ed. Aprenda Fácil,
727 Viçosa-MG. 2. Ed. 2017, 442 p.
- 728 FENDRI et al. Influence of Zeolite on fatty acid composition and egg quality in Tunisian laying
729 hens. **Lipids in diets for poultry**, v. 11, p. 71. 2012.
- 730 GRADZKI, Z. et al. The effect of feed supplementation with Transcarpathian zeolite (clinop-
731 tilolite) on the concentrations of acute phase proteins and cytokines in the serum and hepatic
732 tissue of chickens. **Poultry Science**. v. 99, p. 2424-2437, 2020.
- 733 HAAN. W. W et al. Effect of an acidifying diet combined with zeolite and slight protein reduc-
734 tion on air emissions from laying hens of different ages. **Poultry Science**, v. 86, p. 182–190,
735 2007.
- 736 HARTUNG, J. Dust in livestock buildings as a carrier of odours. In Odour prevention and
737 control of organic sludge and livestock farming, eds: NIELSEN VC, VOORBURG JH &
738 L'HERMITE P. New York: **Elsevier Applied Science Publishers**, p. 321-332, 1986.
- 739 HERNANDES R & CAZETTA JO. Método simples e acessível para determinar amônia libe-
740 rada pela cama aviária. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 3, p. 824-829, 2001.
- 741 HOFF SJ, BUNDY S & LI XW. Dust effects on odor and odor compounds. In: Proc. Interna-
742 tional Symposium: Ammonia and odour control from Animal Production Facilities, Vin-
743 keloord, October 6-10, v. 1, eds.: VOERMANS JAM & MONTENY G. Rosmalen, The Neth-
744 erlands: **CIGR and The European Society of Agricultural Engineers**, 101-110 p. 1997.

- 745 HCINI, E. et. al. Does supplemental zeolite (clinoptilolite) affect growth performance, meat
746 texture, oxidative stress and production of polyunsaturated fatty acid of turkey poult. **Lipids**
747 **in health and disease**, v.17, n. 1, p. 177- 185, 2018.
- 748 JAROSZ, L. et. al. The effect of feed supplementation with Zakarpacki zeolite (clinoptilolite) on
749 percentages of T and B lymphocytes and cytokine concentrations in poultry. **Poultry Science**,
750 v. 96. n. 7. p. 2091-2097. 2017.
- 751 KERMANSHAHI et al. efficacy of natural zeolite and pigments on yolk color and performance
752 of laying hens. **African Journal of biotechnology**, v. 10, p. 3237-3242. 2011.
- 753 KIM, C. H. et al. Effects of dietary supplementation of fermented broken rice (FBR) on laying
754 performance, egg quality, blood parameter, and cholesterol in egg yolk of Hy-Line brown Lay-
755 ing Hens. **Korean Journal poultry Science**, v. 44, n. 4, p. 235-243. 2017.
- 756 LI, H. et al. Reduction of ammonia emissions from stored laying hen manure through topical
757 application of zeolite, Al+Clear, Ferix-3, or poultry litter treatment. **Journal of Applied Poul-**
758 **try Research**, v. 17, n. 4, p. 421-431, 2008.
- 759 LUDKE, J. V. Et al. Os desafios tecnológicos da avicultura de postura em Pernambuco. **Revista**
760 **do Ovo**, n.53, p. 18-27, 2019. www.revistadoovo.com.br.
- 761 MACARI, M; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Funep. SP, 2017,
762 806 p.
- 763 MACIEL, R. M. et al. Hepatic and renal function of broilers fed diets with aflatoxins and natural
764 clinoptilolite. *Pesquisa agropecuária Brasileira*. V. 42, p. 1221-1225, 2007.
- 765 MALLEK, Z. et al. Effect of zeolite (clinoptilolite) as feed additive in Tunisian broilers on the
766 total flora, meat texture and the production of omega 3 polyunsaturated fatty acid. **Lipids in**
767 **Health and Disease**, v. 6, n. 11, p.35. 2012.
- 768 MACHACEK, M et al. Effect of the feed additive clinoptilolite (Zeo Feed) on nutrient metabo-
769 lism and production performance of laying hens. **Acta Veterinária Brasileira**. v. 79, p. s29 –
770 s34. 2010.
- 771 MASTINU, A. et al. Zeolite clinoptilolite: therapeutic Virtues of ancient mineral. **Molecules**.
772 V. 24. 1517. 2019.
- 773 MENDES, M. A. S. A. **Caracterização do ambiente térmico de aviários de postura, em**
774 **sistemas verticais, ventilados naturalmente e por pressão negativa em modo túnel**. 2015.
775 Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. p. 138.
- 776 NASEEM, S.; KING, A. J. 2018. Ammonia production in poultry houses can affect health of
777 humans, birds, and the environment. Techniques for its reduction during poultry production.
778 **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 16, p. 15269–15293. 2018.
- 779 ÖZTÜRK E, ERENER G & SARICA M. Influence of natural zeolite on performance of laying
780 hens and egg quality. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.22, p. 623-628. 1998.
- 781 OGUZ, H; KURTOGLU, V. effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during
782 experimental aflatoxicosis. **British Poultry Science**, v. 41, n. 4, p.512-517. 2000.
- 783 RAJENDRAN OLVER, M. D. The effect of feeding clinoptilolite (zeolite) to laying hens.
784 **South Africa Tydskrif Veek**, v.13, n.2, p. 107-110. 1983.

- 785 PRASAI, T. P. et al. Effect of biochar, zeolite and bentonite feed supplements on egg yield and
786 excreta attributes. **Animal Production Science**, v. 58, n. 9, p. 1632, 2017.
- 787 PAVELIĆ, K. S. et al. Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applica-
788 tions *in vivo*. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1350, 2018.
- 789 PAVELIC, K. S. et al. Treatment of osteoporosis with a modified zeolite shows beneficial ef-
790 fects in an osteoporotic rat model and human clinical trial. **Experimental Biology and Medi-**
791 **cine**. v. 246, p. 529-537, 2021.
- 792 ROMERO, C. et al. Effect of a partial replacement of limestone by a CaSO₄-zeolite mixture
793 combined with a slight protein reduction on production indices, egg quality, and excreta pH in
794 laying hens. **Journal Applied of Poultry Research**, v.21, p.325-334, 2012.
- 795 ROSTAGNO, H. S et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e**
796 **exigências nutricionais de aves e suínos**. 2017. 4ª edição, Viçosa, MG: UFV, p. 488.
- 797 SAFAEIKATOULI, M ; JAFARIAHANGARI, Y; BAHARLOUEI, A. Na Evaluation on the
798 effects of dietary kaolin and zeolite on broilers blood parameters, T4, TSH and growth hor-
799 mones. **Pakistan journal of nutrition**, v.10, n.3, p.233-237, 2011.
- 800 SAS. SAS Software. Version 9.4. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 2012.
- 801 SANTIN, E. The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral
802 immune response of broilers. **Avian Pathology**, v. 31, p.73-79. 2002.
- 803 SCHNEIDER, A. F. Zeólitas naturais na dieta de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de**
804 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 191-197, 2017.
- 805 SHARIATMADARI, F. The application of zeolite in poultry production. **World's Poultry Sci-**
806 **ence Journal**, v. 64, n. 1, p. 76–84, 2008.
- 807 SILVA DJ & QUEIROZ AS. 2002. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3.
808 Ed. Viçosa. UFV.
- 809 SILVA, V. S. et al. Efeito de Tratamentos Sobre a Carga Bacteriana de Cama de Aviário Reu-
810 tilizada em Frangos de Corte. **Comunicado Técnico**. Versão Eletrônica, Concórdia, SC. 2007.
- 811 SHARIATMADARI, F. The application of zeolite in poultry production. **World's Poultry Sci-**
812 **ence Journal**, v. 64, n. 1, p. 76–84, 2008.
- 813 SHI, Q. Et al. Ammonia induces Treg/Th1 imbalance with triggered NF-kB pathway leading to
814 chicken respiratory inflammation response. **Science of the Total Environment**. v.659, p. 354-
815 362. 2019.
- 816 SCHNEIDER, A. F et al. Zeólitas naturais na dieta de frangos de corte. **Arquivos Brasileiros**
817 **de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.1, p. 191-197, 2017.
- 818 SWELUM, A. et al. Ammonia emissions in poultry houses and microbial nitrification as a prom-
819 ising reduction strategy. **Science of the total Environment**. v. 781, p. 146978, 2021.
- 820 TRAILOVIC, J. N. et al. Comparative investigation of the efficacy of three different adsor-
821 vents against ota-induced toxicity in broiler chickens. **Toxins**, v. 7 n.4, p.1174-1191, 2015.
- 822 VADIVELU, V. M.; KELLER, J.; YUAN, Z. Efeito da concentração de amônia livre e ácido
823 nitroso livre nos processos anabólicos e catabólicos de uma cultura enriquecida de Nitrosomonas.
824 **Biotechnolog. Bioeng**. v.95, p. 830–839, 2006.

- 825 WAWRZYNIAK, A. et al. Effect of feeding transcarpathian zeolite on gastrointestinal mor-
826 phology and function in broiler chickens, Brazilian journal of poultry science. v. 19, n.4, p.737-
827 746. 2017.
- 828 WANG, D. et al. Ammonia exposure induced abnormal expression of cytokines and heat shock
829 proteins via glucose metabolism disorders in chicken neutrophils. **Environmental Science and**
830 **Pollution Research**. p.11356. 2019.
- 831 WU, Q. J. et al. Intestinal development and function of broiler chickens on diets supplemented
832 with Clinoptilolite. **Asia-Australasian Journal of Animal Science**, v. 26, n. 7, p. 987-994,
833 2013a.
- 834 WU, Q. J. et al. Effects of clinoptilolite and modified clinoptilolite on the growth performance,
835 intestinal microflora, and gut parameters of broilers. **Poultry Science**, n. 92, p. 684-692, 2013b.
- 836 WU, Y et al. Influence of butyrate loaded Clinoptilolite dietary supplementation on growth per-
837 formance, development of intestine and antioxidant capacity in broiler chickens. **Plos One**.
838 v.11, n.1, p. e0154410, 2016.
- 839 ZHAO, H. Y. et al. Excess of dietary montmorillonite impairs growth performance, liver func-
840 tion, and antioxidant capacity in starter pigs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n.7. p. 2943-
841 2951. 2017.
- 842 ZHANG, J et al. Proteome changes in the small intestinal mucosa of broilers (*Gallus gallus*)
843 induced by high concentrations of atmospheric ammonia. **Proteome Science**. n13. P.9. 2015.
- 844 ZHOU, Y. et al. Effects of ammonia exposure on growth performance and cytokines in the
845 serum, trachea, and ileum of broilers. **Poultry Science**. v.99, p.2485- 2493. 2020.