



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

VERENA PEREIRA DINALLI

**CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS, IMUNOLÓGICAS E  
QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE  
ALIMENTADOS COM DIETAS ADICIONADAS DE FARINHA  
DE MICROALGA (*Chlorella vulgaris*) E PROBIÓTICO**

VERENA PEREIRA DINALLI

**CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS, IMUNOLÓGICAS E  
QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE  
ALIMENTADOS COM DIETAS ADICIONADAS DE FARINHA  
DE MICROALGA (*Chlorella vulgaris*) E PROBIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Oba

Londrina  
2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

D583 Dinalli, Verena.  
Características produtivas, imunológicas e qualidade da carne de frangos de corte alimentados com dietas adicionadas de farinha de microalga ( *Chlorella vulgaris* ) e probiótico / Verena Dinalli. - Londrina, 2020.  
123 f.

Orientador: Alexandre Oba.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Aditivos - Tese. 2. Carne de aves - Tese. 3. Desempenho - Tese. 4. Imunologia - Tese. I. Oba, Alexandre. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636

VERENA PEREIRA DINALLI

**CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS, IMUNOLÓGICAS E  
QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE  
ALIMENTADOS COM DIETAS ADICIONADAS DE FARINHA  
DE MICROALGA (*Chlorella vulgaris*) E PROBIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Oba  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Lourenço Soares  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Emerson José Venâncio  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 04 de março de 2020.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder esta oportunidade e discernimento para concluir mais uma etapa em minha vida, por não me deixar desistir nas dificuldades e por sempre atender às minhas súplicas.

Aos meus pais, Silvia e José Carlos, por serem minha base, me apoiarem e por acreditarem em mim, saibam que esta conquista também é devido a vocês, e por vocês. À minha avó Izabel, que sempre se preocupou e acreditou em mim, obrigada por me apoiar, por sempre ter uma palavra de conforto e por ser este ser humano incrível.

À minha irmã Raíssa por ser meu exemplo, minha inspiração, sempre ter uma palavra de conforto nos momentos mais difíceis. Ao meu namorado Herculano por me apoiar sempre, por manter a paciência nos momentos que a mesma me faltava.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Oba por todos os ensinamentos, paciência e por ser meu exemplo de profissional e ser humano. Obrigada, professor, por se importar com o próximo, por cada conselho e palavra amiga, por ser um “pai” para todos nós e por me ajudar a chegar até aqui.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Lourenço Soares Russo, que além de me orientar ao longo da graduação em projetos de iniciação científica, também foi fundamental para a realização deste trabalho, obrigada também por ser meu exemplo de ser humano e profissional, e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venâncio pelos ensinamentos, paciência e dedicação para que os resultados imunológicos deste trabalho fossem obtidos.

Aos integrantes do Grupo de Estudo em Nutrição de Aves e Pets (GENAPET): Flávia, Thaís, Rafaela, Bianca, Suelen, Eduardo, Sabrina, Cíntia, Afonso, Gabriela, que colaboraram com este trabalho, sem a ajuda de cada um de vocês não seria possível realizar este projeto. À Fernanda, Bruna e Carol por toda ajuda nas análises de TBARS, textura e perfil de ácidos graxos. À Juliana pela ajuda nas análises imunológicas. Ao Prof. Dr. Lucas Santana da Cunha, ao Gabriel, ao Maurício e ao Rodolfo pela ajuda em estatística.

Às minhas amigas, Angélica, que mesmo estando longe nunca se esqueceu de mim, de me aconselhar e acreditar em mim, Thais e Flávia por me ajudarem sempre ao longo deste trabalho, pelos conselhos, por viverem comigo

os melhores e piores momentos, desde as comilanças até o choro, o desespero. Obrigada, meninas, por serem minhas amigas além da Universidade, muito obrigada por tudo.

Às amigas que obtive ao chegar em Londrina e que espero manter ao longo da vida, Luana e Maria Fernanda, que estão comigo desde o primeiro ano da faculdade, dividindo o apartamento e as experiências, muito obrigada pela paciência, conselhos, por compartilhar momentos únicos, desde o brigadeiro, a pipoca e até dividir a televisão. Aprendi muito com vocês!

Ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal, à Universidade Estadual de Londrina, professores e funcionários por todo o auxílio, ensinamentos e por esta oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me conceder a bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por apoiar financeiramente este projeto.

Aos funcionários da Fazenda Escola: Senhor Pedro, Antônio, Zé, Hermínio, Chicão, Fernando Massaro, Jorge, Anderson, Khauê, vocês foram de extrema importância para a realização deste trabalho, muito obrigada por toda a ajuda. À secretária Sandra Regina, à técnica Tânia pelas agradáveis conversas.

Enfim, sinto por todos, que de alguma maneira contribuíram com este trabalho, imensa gratidão. Gratidão por conhecer pessoas maravilhosas, humanas, que não hesitaram em me ajudar, me aconselhar ao longo desta caminhada, a qual só está começando e vocês fazem parte dela. Vou me lembrar de cada um com muito carinho.

“Não sei.... Se a vida é curta ou longa demais para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura..... Enquanto durar”. (Cora Coralina)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não  
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não  
sou o que era antes”.

Marthin Luther King

DINALLI, Verena Pereira. **Características produtivas, imunológicas e qualidade da carne de frangos de corte alimentados com dietas adicionadas de farinha de microalga (*Chlorella vulgaris*) e probiótico**. 2020. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

A *Chlorella vulgaris*, por possuir componentes com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, e o probiótico, por inibir o desenvolvimento de patógenos e manter equilibrada a microbiota intestinal, podem ser adicionados na ração, sendo alternativas funcionais e naturais, para melhorar a saúde, o desempenho das aves e a qualidade do produto final. Objetivou-se avaliar a adição de diferentes níveis de inclusão de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico sobre as características produtivas, imunológicas e na qualidade da carne de frangos de corte. Foram utilizados 1.040 pintainhos machos da linhagem Cobb, com um dia de idade, por um período de 42 dias. Os tratamentos experimentais consistiam na adição de diferentes níveis de inclusão de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* (0; 0,25; 0,50 e 1%) associados ou não (0,02%) ao probiótico ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g de *Bifidobacterium bifidum*,  $2,6 \times 10^9$  UFC/g de *Enterococcus faecium*,  $1,3 \times 10^9$  UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* e  $3,6 \times 10^9$  UFC/g de *Bacillus subtilis*). Foi adotado um delineamento em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4X2 (níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* x inclusão ou não de probiótico). Os resultados mostram que na fase pré-inicial a adição de *Chlorella vulgaris* proporcionou melhora linear na conversão alimentar, quando associada ao probiótico aumentou linearmente o ganho de peso e teve efeito quadrático quando não associada e apenas o probiótico proporcionou menor ganho de peso. No período de um a 35 dias e no período total de criação o probiótico melhorou a conversão alimentar. Foi observada interação entre o nível de 0,25% de *Chlorella vulgaris* e probiótico no período total de criação, melhorando o Índice de Eficiência Produtiva. A adição de *Chlorella vulgaris* aumentou linearmente a intensidade de amarelo e o teor de ácido  $\alpha$ -linolênico na carne, teve efeito quadrático para o teor de ácido araquidônico e efeito linear decrescente sobre a relação  $\omega 6/\omega 3$ . A adição de probiótico reduziu a capacidade de retenção de água e aumentou o teor de ácido araquídico. O peso do baço foi reduzido aos 43 dias de idade nas aves alimentadas com probiótico, a adição de *Chlorella vulgaris* aumentou linearmente o título do anticorpo natural anti-KLH IgY e com a associação dos aditivos houve aumento linear do anticorpo natural anti-KLH IgA aos 13 dias de idade. Apenas as aves que receberam probiótico apresentaram redução do título do anticorpo específico anti-hemácia de carneiro IgA aos 21 dias de idade. Conclui-se que a microalga *Chlorella vulgaris* melhorou o desempenho na fase pré-inicial, aumentou o teor de ácidos graxos polinsaturados, não comprometendo a estabilidade oxidativa da carne, bem como contribuiu com o desenvolvimento da resposta imune aos 13 dias de idade. O probiótico melhorou o desempenho de um a 35 dias e no período total e contribuiu com o sistema de defesa das aves, sendo eficiente em manter equilibrada a microbiota intestinal e proteger a mesma contra patógenos. A associação dos aditivos melhorou o desempenho e foi benéfica ao desenvolvimento do sistema de defesa das aves, podendo favorecer à maior produtividade das aves.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos. Aditivos. Aves. Desempenho. Imunologia.

DINALLI, Verena Pereira. **Productive, immunological characteristics and meat quality of broiler chickens fed diets with microalgae flour (*Chlorella vulgaris*) and probiotic**. 2020. 121 f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

The *Chlorella vulgaris*, has components with antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties, and the probiotic, by inhibiting the development of pathogens and keeping the intestinal microbiota balanced, can be added to the feed, being functional and natural alternatives, to improve the health, the performance of the birds and the quality of the final product. The objective was to evaluate the addition of different levels of inclusion of flour from the microalgae *Chlorella vulgaris* associated or not to the probiotic on the productive, immunological characteristics and meat quality of broilers. A total of 1,040 one-day-old male Cobb broiler chickens were used for a period of 42 days. The experimental treatments consisted of the addition of different levels of inclusion of flour microalgae *Chlorella vulgaris* (0, 0.25, 0.50 and 1%) associated or not (0.02%) of probiotic ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g of *Bifidobacterium bifidum*,  $2,6 \times 10^9$  UFC/g of *Enterococcus faecium*,  $1,3 \times 10^9$  UFC/g of *Lactobacillus acidophilus* and  $3,6 \times 10^9$  UFC/g of *Bacillus subtilis*). A randomized block design in a 4X2 factorial arrangement (levels of inclusion of microalgae *Chlorella vulgaris* x inclusion or not of probiotic) was adopted. The results show that in the pre-initial phase the addition of *Chlorella vulgaris* provided a linear improvement in feed conversion, when associated with the probiotic it linearly increased the weight gain and had a quadratic effect when not associated and only the probiotic provided less weight gain. In the period of one to 35 days and in the total breeding period, the probiotic improved the feed conversion. An interaction was observed between the level of 0.25% of *Chlorella vulgaris* and probiotic in the total breeding period, improving the Productive Efficiency Index. The addition of *Chlorella vulgaris* linearly increased the yellow intensity and the  $\alpha$ -linolenic acid content in the meat, had a quadratic effect for the arachidonic acid content and a decreasing linear effect on the omega 6 / omega 3 ratio. The addition of probiotic reduced the water holding capacity and increased the content of arachidic acid. The spleen weight was reduced at 43 days of age in birds fed with probiotic, the addition of *Chlorella vulgaris* linearly increased the titer of the natural anti-KLH IgY antibody and with the association of additives there was a linear increase of the natural anti-KLH IgA antibody at 13 days of age. Only birds that received probiotic showed reduced in the titer of specific anti-sheep red blood cell IgA antibody at 21 days of age. It is concluded that the microalgae *Chlorella vulgaris* improved the performance in the pre-initial phase, increased the content of polyunsaturated fatty acids, without compromising the oxidative stability of the meat, as well as contributed to the development of the immune response at 13 days of age. The probiotic improved the performance of one to 35 days and in the total period and contributed to the defense system of the birds, being efficient in keeping the intestinal microbiota balanced and protecting it against pathogens. The association of the additives improved the performance and was beneficial to the development of the defense system of the birds, being able to favor the greater productivity of the birds.

**Key- words:** Fatty acids. Additives. Birds. Performance. Immunology.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

- Tabela 1** – Composição percentual e calculada das rações experimentais nas diferentes fases de criação.....74
- Tabela 2** – Composição nutricional da microalga *Chlorella* em pó.....75
- Tabela 3** – Valores médios referentes ao consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), viabilidade criatória (VC) e índice de eficiência produtiva (IEP) de frangos alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico.....80
- Tabela 4** – Desdobramento da interação entre os níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico para o ganho de peso na fase de um a sete dias de idade e índice de eficiência produtiva de um a 42 dias de idade .....81
- Tabela 5** – Valores médios de rendimentos de carcaça e cortes de frangos alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico.....85
- Tabela 6** – Valores médios correspondentes à perda de água por cocção (PPC), capacidade de retenção de água (CRA), L\* (luminosidade), a\*(componente vermelho-verde), b\*(componente amarelo-azul), potencial hidrogeniônico (pH), textura e oxidação lipídica de frangos alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico .....87
- Tabela 7** – Perfil de ácidos graxos da carne de peito de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico.....90

### ARTIGO 2

- Tabela 1** – Composição percentual e calculada das rações experimentais nas diferentes fases de criação.....105
- Tabela 2** – Composição nutricional da microalga *Chlorella* em pó.....106

<b>Tabela 3</b> – Peso relativo dos órgãos linfoides (baço e bursa de Fabricius) de frangos de corte aos 21 e 43 dias de idade alimentados com rações contendo diferentes níveis de inclusão de <i>Chlorella vulgaris</i> (Alga) e/ou probiótico .....	109
<b>Tabela 4</b> – Título de anticorpos naturais aos 13, 21 e 42 dias de idade e título de anticorpos anti-hemácia de carneiro aos 21 e 42 dias de idade em frangos alimentados com rações contendo diferentes níveis de inclusão de <i>Chlorella vulgaris</i> (Alga) e/ou probiótico .....	112
<b>Tabela 5</b> – Desdobramento da interação entre os níveis de inclusão de <i>Chlorella vulgaris</i> associados ou não ao probiótico para o título de anticorpo natural IgA aos 13 dias de idade .....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Componente vermelho-verde
AA	Ácido araquidônico
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ATP	Adenosina trifosfato
b*	Componente amarelo-azul
CA	Conversão alimentar
CR	Consumo de ração
CRA	Capacidade de Retenção de Água
DHA	Ácido docosahexaenoico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Grama
GP	Ganho de peso
IEP	Índice de Eficiência Produtiva
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
Kcal	Quilocaloria
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
Kg	Quilograma
L*	Luminosidade
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malonaldeído
mg	Miligrama
nm	Nanômetro
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PIB	Produto Interno Bruto
°C	Grau Celsius
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade Formadora de Colônias

USDA United States Department of Agriculture  
VC Viabilidade criatória

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	PANORAMA DA PRODUÇÃO DE CARNE DE FRANGO .....	18
2.2	MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	19
2.3	PROBIÓTICO <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i> , <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> , <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> E <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	25
2.4	EFEITO DO USO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> E DE PROBIÓTICO NO DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE.....	32
2.5	EFEITO DO USO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> E DE PROBIÓTICO NA QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE .....	35
2.6	EFEITO DO USO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> E DE PROBIÓTICO NO SISTEMA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE .....	44
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	69
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	70
5.1	OBJETIVO GERAL .....	70
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO .....	70
<b>6</b>	<b>ARTIGO 1 – CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS E QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS ADICIONADAS DE FARINHA DE MICROALGA (<i>Chlorella vulgaris</i>) E PROBIÓTICO</b> .....	71
<b>7</b>	<b>ARTIGO 2 – PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS ADICIONADAS DE FARINHA DE MICROALGA (<i>Chlorella vulgaris</i>) E PROBIÓTICO</b> .....	100
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	121

<b>ANEXO</b> .....	122
ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animais. ....	123

## 1 INTRODUÇÃO

Os aditivos utilizados na alimentação animal podem contribuir com os processos metabólicos e digestibilidade dos nutrientes (GADIEV *et al.*, 2019), sendo estes, segundo a Instrução Normativa 44 de 15 de dezembro de 2015, substâncias, microrganismos ou produto formulado adicionado intencionalmente, possuindo ou não valor nutritivo, que melhoram as características dos produtos destinados à alimentação animal, estando diretamente relacionados com a saúde e produção animal (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018). Então, há preferência no uso de alimentos funcionais e naturais como aditivos nas rações, pois os mesmos possuem substâncias benéficas com funções antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (HAYES *et al.*, 2017), além de serem seguros e não tóxicos (BAI *et al.*, 2018).

Neste aspecto, a adição de algas na alimentação de frangos de corte tem sido cada vez mais estudada perante suas características nutricionais benéficas (ZHU *et al.*, 2015), como as microalgas verdes (*Chlorophyceae*) (ABDELNOUR *et al.*, 2019). Entre as microalgas verdes, há a *Chlorella vulgaris*, que se destaca por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (SEDIGHI *et al.*, 2016), que ocasionam benefícios à produção, saúde animal e qualidade do produto final (MADEIRA *et al.*, 2017). A *Chlorella* tem mostrado benefícios fisiológicos, antioxidantes, bioquímicos (LEE *et al.*, 2010), imunológicos, de crescimento e produtividade das aves (KIM; KANG, 2015). Além disso, apresenta elevado potencial de crescimento (KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015), adaptabilidade às condições ambientais (SALVIA *et al.*, 2014) e alta produtividade (AN *et al.*, 2016).

A *Chlorella vulgaris* pode ser utilizada como alimento funcional (KANG; PARK; KIM, 2017), se destacando por ser constituída de alto teor de proteína, polissacarídeos, minerais, vitaminas (PRABAKARAN *et al.*, 2018), ácidos graxos polinsaturados (FREITAS, 2017), pigmentos carotenoides (PASARIN; ROVINARU, 2018; SILVA *et al.*, 2019), compostos fenólicos (MUSZYŃSKA *et al.*, 2018), fibras (KIM; KANG, 2015) e atividade prebiótica (CHOI *et al.*, 2016) que contribui com o aumento da diversidade microbiana benéfica do trato digestório (EL-ABD; HAMOUDA, 2017).

O probiótico também é um aditivo de interesse por ser um produto natural, seguro e não tóxico (BAI *et al.*, 2018), sendo composto de culturas únicas ou mistas de microrganismos vivos (ADHIKARI; KIM, 2017) não patogênicos, que mantêm o equilíbrio da microbiota intestinal, e dessa forma beneficiam a saúde do hospedeiro (WU *et al.*, 2018). Diversas espécies são utilizadas como probióticos, entre elas *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* (SUGIHARTO, 2016), *Bacillus subtilis* e *Bifidobacterium bifidum* (LUO *et al.*, 2013).

O uso de probiótico na nutrição animal é devido a sua capacidade de inibir o desenvolvimento de patógenos, por manter equilibrada a microbiota intestinal, promovendo melhora na produtividade (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018). O probiótico ativa o sistema imunológico, aumenta a atividade de enzimas digestivas (MOUSAVI; HOSSEINI; MIRHOSSEINI, 2018), afetando positivamente a absorção de nutrientes (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018), melhora a capacidade antioxidante dos animais (GONG *et al.*, 2018) e a qualidade da carne (LAN; LEE; KIM, 2017).

Então, objetivou-se avaliar as características produtivas, imunológicas e de qualidade da carne de frangos de corte alimentados com dietas adicionadas de diferentes níveis de inclusão da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico (*Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus subtilis*).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PANORAMA DA PRODUÇÃO DE CARNE DE FRANGO

A carne de frango tem se inserido progressivamente na alimentação da população como uma das principais fontes de proteína de origem animal (GIAROLA, 2017), além de apontar crescente consumo em relação às outras carnes (MAPA, 2017).

Na década de 1970, a carne que ocupava a primeira posição entre as carnes mais consumidas no Brasil era a bovina (65%), em sequência a suína (27%) e em última posição, a carne de frango (8%). Entretanto, em 1980, um aumento na demanda por carne de frango foi observado, e em 2005 a carne de frango ultrapassou a demanda por carne bovina (OECD/FAO, 2016).

O consumo brasileiro de carne de frango, portanto, continuava se destacando em 2014, sendo a mais consumida (41,3kg/capita/ano), seguida pela bovina (25,4kg/capita/ano) e suína (11,6kg/capita/ano), segundo dados da *Organization for Economic Co-Operation and Development* - OECD/FAO (2016). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017), o consumo de carne de frango terá um crescimento anual de 2,6% entre os períodos de 2016/17 a 2026/27, previsto então, um aumento de 29,5% no consumo nos 10 anos seguintes.

A evolução no crescimento da produção de carne de frango também poderá ser notória no período de 2018/19 a 2028/29, em que projeta uma taxa de crescimento de produção de 2,6%. Ainda, em 2028 o Brasil deverá ocupar o primeiro lugar nas exportações, seguido dos Estados Unidos e União Europeia (MAPA, 2019).

A produção de frango é uma maneira muito eficiente de se produzir proteína de origem animal, pois requer pouco espaço e tempo de produção (RONDÓN, 2008), além de contribuir com a economia do país, com participação em torno de 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) (UBABEF, 2014), bem como, proporciona a geração de aproximadamente 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos (CRUZ; TEIXEIRA; PAVAN, 2016).

O grande desenvolvimento do setor avícola brasileiro impulsionou sua expansão no mercado interno e externo, sendo o Brasil, em 2018, o primeiro

país exportador de carne de frango (3,687 milhões de toneladas), seguido dos Estados Unidos (3,244 milhões de toneladas) e União Europeia (1,429 milhões de toneladas) e o segundo maior produtor (13,355 milhões de toneladas), na sequência dos Estados Unidos (19,361 milhões de toneladas), seguido da União Europeia (12,200 milhões de toneladas) (USDA, 2019).

A maior parte da produção brasileira, 66,9%, se destina ao mercado interno e 33,1% se destina às exportações como cortes (63%), inteiros (29%), salgados e industrializados (3%) e embutidos (2%) (ABPA, 2018). O estado que mais se destacou em 2017 quanto ao abate de frangos, representando 34,32% do total, e quanto à exportação, com participação em 37,20%, foi o Paraná, seguido por Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ABPA, 2018).

A demanda do mercado interno por carne de frango é crescente (GARCIA *et al.*, 2018), visto que o consumo desta carne apresentou aumento no ano de 2017 em relação ao ano anterior, no qual o consumo *per capita* era de 41,10kg/habitante e em 2017 o consumo *per capita* foi de 42,07kg/habitante (ABPA, 2018). Este fato pode ser consequência da escolha pelos consumidores por uma carne com preço mais acessível (TRAVASSOS; COELHO, 2017) e por ser saudável, com menor teor de gordura (FIGUEIREDO JÚNIOR *et al.*, 2017).

Os avanços do setor avícola no mercado interno e externo são decorrentes de melhorias na genética, tecnologia, nutrição, manejo e sanidade das aves. Além disso, fatores como a qualidade do produto final e custo baixo contribuem com a importante posição do Brasil como maior exportador. Então, o desenvolvimento de pesquisas para o aprimoramento do setor avícola é fundamental para que o Brasil permaneça em progresso como um dos maiores exportadores e produtores de carne de frango (SCHMIDT; SILVA, 2018).

## 2.2 MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*

Microalgas é o termo designado aos microrganismos algais que possuem pigmentos fotossintéticos e clorofila a (DERNER *et al.*, 2006), bem como produzem oxigênio absorvendo dióxido de carbono como fonte de alimento (SAFI *et al.*, 2014), sendo caracterizadas por serem microscópicas (ŚWIĄTKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JÓZEFIAK, 2015). As microalgas podem ser encontradas principalmente em água salgada ou doce e em diferentes tipos de solo, podendo se

desenvolver em ambientes com pouca água, nutrientes e dióxido de carbono, além disso, possuem a capacidade de se adaptar às diversas condições ambientais de luz, temperatura, salinidade, pH e umidade (SILVA *et al.*, 2019).

Estes microrganismos podem ser divididos em *Bacillariophyta* (diatomáceas), *Chlorophyta* (algas verdes), *Chrysophyta* (algas douradas) e *Cyanophyta* (algas verde-azuladas), sendo um grupo de algas constituído de aproximadamente 200.000 espécies (BLEAKLEY; HAYES, 2017), visto que os fatores determinantes para a classificação destes microrganismos são os constituintes da parede celular, produtos de reserva, tipos de pigmentos, aspectos citológicos e morfológicos, como células flageladas. Ainda, microalgas abrangem organismos compostos por dois tipos de estrutura celular: procariótica, como as cianobactérias (*Cyanophyta*), e eucariótica, como *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Xantophyceae*) e *Cryptophyta* (DERNER *et al.*, 2006).

As microalgas podem ser utilizadas na nutrição animal por serem fonte de carboidratos de fácil digestibilidade, compostas de 85% de lipídeos, entre eles o ácido eicosapentenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA) (HAYES *et al.*, 2017), por possuir proteínas, aminoácidos, carotenoides, vitaminas e por exercer atividade antioxidante antibacteriana, anti-inflamatória e antiviral, já sendo utilizadas na alimentação humana (ŚWIĄTKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JÓZEFIAK, 2015).

As microalgas verdes (*Chlorophyceae*) podem ser utilizadas como aditivo na alimentação animal (ABDELNOUR *et al.*, 2019), contribuindo com a produtividade, pois ocasiona melhora na resposta imunológica, resistência às doenças, possuem ação antibacteriana, além de proporcionar o desenvolvimento de bactérias benéficas. Como também, podem afetar positivamente a qualidade da carne dos animais, por conterem quantidades relevantes de minerais, vitaminas, ácidos graxos polinsaturados e carotenoides (MADEIRA *et al.*, 2017).

O gênero *Chlorella*, composto por algas verdes unicelulares, de reprodução assexuada, representante do fitoplâncton de lagos, lagoas e até mesmo encontrado em solos, se destaca pela alta produção de biomassa (KATIYAR *et al.*, 2017), sendo utilizado como aditivo na alimentação humana e animal (KANG *et al.*, 2013), na indústria farmacêutica e cosmética, por possuir componentes de interesse como proteínas, minerais, vitaminas, polissacarídeos, compostos

imunoestimuladores (NICOLETTI, 2016), ácidos graxos polinsaturados e pigmentos carotenoides (BLEAKLEY; HAYES, 2017).

Este gênero ainda pode ter aplicações como biofertilizante, biocombustível, (KANG *et al.*, 2013), para tratamento de águas residuais (BLEAKLEY; HAYES, 2017), visto que existe em torno de 8000 espécies que constitui o grupo das algas verdes (KENNETH *et al.*, 2001). A produção em larga escala de microalgas começou no Japão no início dos anos 60 com a microalga *Chlorella*, utilizada como aditivo alimentar (BUONO *et al.*, 2014).

A *Chlorella vulgaris*, microalga verde unicelular comumente encontrada em água doce (CHENG *et al.*, 2016), mas também encontrada em água salgada (SEDIGHI *et al.*, 2016), pertence ao filo *Chlorophyta* (PRABAKARAN *et al.*, 2018), despertou grande interesse em sua utilização devido ao seu elevado potencial de crescimento, valor nutricional, resistência às condições ambientais de temperatura, luz, pH e CO<sub>2</sub> (KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015). Como também, devido à facilidade de cultivo e alta produtividade (AN *et al.*, 2016), com produção anual de 4.000 toneladas (MORAIS *et al.*, 2015).

Esta microalga contém em torno de 60% de proteína (SALVIA *et al.*, 2014), podendo conter até 62% de proteína (GADIEV *et al.*, 2019), 1-4% de clorofila, 9-18% de fibra, vitaminas e minerais (RANI, SANDAL; SAHOO, 2018), como vitamina A e C (SALVIA *et al.*, 2014), potássio, sódio, magnésio, ferro, cálcio (BLEAKLEY; HAYES, 2017) e selênio (EL-ABD; HAMOUDA, 2017).

Na composição da *Chlorella vulgaris* ainda há aminoácidos essenciais (PRABAKARAN *et al.*, 2018), como lisina (3,5-8,2 g/ 100 g de proteína), metionina (0,60-5,80 g/ 100 g de proteína), triptofano (0,1-2,30 g/ 100 g de proteína), treonina (4,10-6,20 g/ 100 g de proteína), arginina (4,70-7,38 g/ 100 g de proteína), valina (2,85-7,8 g/ 100 g de proteína), histidina (1,0-3,5 g/ 100 g de proteína) e fenilalanina (2,0-9,60 g/ 100 g de proteína) (AHMAD *et al.*, 2018).

A *Chlorella vulgaris* também é composta de amido, polissacarídeo encontrado em maior quantidade nesta alga, ademais é composta de celulose, polissacarídeo encontrado na parede celular da *Chlorella*, e  $\beta$ 1-3 glucano (SAFI *et al.*, 2014). A parede celular da *Chlorella vulgaris* também é constituída de mananoligossacarídeo (REZVANI; ZAGHARI; MORAVEJ, 2012), ramnose, galactose, glicose, xilose, arabinose e manose (SAFI *et al.*, 2014)0, contendo 30% de carboidratos (GADIEV *et al.*, 2019).

O  $\beta$ - glucano possui diversos benefícios para a saúde e desempenho animal por diminuir o estresse, atuar como prebiótico e regular níveis de açúcar no sangue (OLIVEIRA; VETVICKA; ZANUZZO, 2019). O  $\beta$ -1,3-glucano pode contribuir com a melhora da imunidade inespecífica, pois aumenta o mecanismo de defesa do hospedeiro, resistência contra infecção, e então acarreta em melhor taxa de crescimento, menor índice de mortalidade (MOON *et al.*, 2016), e ainda pode sequestrar radicais livres (MALIWAT *et al.*, 2016).

A microalga *Chlorella* também contribui com a saúde e produtividade de frangos de corte por exercer atividade antimicrobiana por produzir clorelina, uma substância tóxica com função antibacteriana, sendo que protege a microflora contra agentes patogênicos (KIM; KANG, 2015), e por apresentar atividade prebiótica (CHOI *et al.*, 2016).

A atividade prebiótica da *Chlorella vulgaris* pode estar relacionada aos polissacarídeos que a compõe, como mananoligossacarídeo (REZVANI; ZAGHARI; MORAVEJ, 2012), ramnose, galactose, glicose, xilose, arabinose, manose e  $\beta$ 1-3 glucano (SAFI *et al.*, 2014), além de fibras (KIM; KANG, 2015), e contribui com o aumento da diversidade microbiana do trato digestório (EL-ABD; HAMOUDA, 2017). Os microrganismos presentes na flora intestinal são capazes de digerir componentes da alga, logo a eficiência digestiva dos animais pode ser aumentada, o que acarreta também no aumento de bactérias benéficas (KANG; PARK; KIM, 2017).

Os prebióticos, ingredientes alimentares não digeríveis (SUGIHARTO, 2016), são resistentes às enzimas do trato gastrintestinal superior, sendo fermentados no intestino grosso (PATEL; GOYAL, 2012), servindo como fonte de alimento para bactérias benéficas (ADHIKARI; KIM, 2017), como microrganismos produtores de ácido orgânico, principalmente ácido lático e acético (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

O prebiótico funciona como substrato seletivo para bactérias benéficas (PAN; YU, 2014), fornecendo nutrientes e energia (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018), consequentemente melhora integridade da mucosa intestinal (FURLAN; MACARI, LUQUETTI, 2004). Assim, também contribui com a formação da microbiota intestinal, que é fundamental para a digestão e conversão alimentar das aves, favorecendo a maior produtividade (TORRES-RODRIGUEZ *et al.*, 2007), além

de proporcionar a redução do crescimento de diversas bactérias patogênicas intestinais (SHANMUGAPRIYA *et al.*, 2015).

Os prebióticos também conseguem alterar a microbiota intestinal por meio do reconhecimento, pelo patógeno, de sítios de ligação nos açúcares dietéticos como sendo da mucosa intestinal (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004). As bactérias patogênicas conseguem colonizar a mucosa intestinal e exercer sua condição patológica por se aderirem ao epitélio por meio de fímbrias (SILVA; NÖRNBERG, 2003), as quais reconhecem polissacarídeos da superfície do epitélio, logo o prebiótico, polissacarídeo dietético, pode se ligar ao patógeno, não se ligando à mucosa intestinal. Dessa forma, é então eliminado com a digesta, mantendo a integridade da mucosa intestinal, com menor índice de incidência de infecções e desenvolvimento de patógenos (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004).

A pigmentação das algas verdes é proveniente de pigmentos como a clorofila a e b,  $\beta$ -caroteno e xantofilas (KADAM; TIWARI; O'DONNELL, 2013), além de possuírem outros carotenoides amarelos e laranjas, importantes para a fotossíntese e proteção de estruturas celulares contra radicais livres (KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015).

Os carotenoides estão presentes em todas as algas e é sabido que os animais não sintetizam carotenoides, e sim, os acumulam em seu organismo, resultando em produtos finais pigmentados (VAQUERO; HAYES, 2015). Os carotenoides que constituem a *Chlorella vulgaris*, a qual contém 1,2 a 1,3% de carotenoides na matéria seca (ŚWIAŹKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JÓZEFIAK, 2015), são a luteína, astaxantina, fucoxantina,  $\beta$ -caroteno e cantaxantina (PASARIN; ROVINARU, 2018), além de clorofila a e b e feofitina a (SILVA *et al.*, 2019).

O carotenoide de maior importância é o  $\beta$ -caroteno, representando 0,1 a 0,2% da matéria seca, também conhecido como provitamina A, o qual é primordial na proteção de células e tecidos contra os efeitos prejudiciais de radicais livres, comprovando sua atividade antioxidante. Dessa forma, mantém a homeostase das estruturas celulares e a resistência às doenças (KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015).

Assim, os carotenoides também desempenham função antioxidante (VAQUERO; HAYES, 2015), pois as algas em geral possuem sistema defensivo devido à exposição à radicais livres em seu ambiente (BLEAKLEY; HAYES, 2017). A

*Chlorella vulgaris* também possui em sua composição compostos fenólicos (ácido salicílico, ácido trans-cinâmico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-ocamarico, ácido cinâmico, epigallocatequina galato e apigenina) (MUSZYŃSKA *et al.*, 2018), equivalentes a 41 mg/g de matéria seca da alga (EL-ABD; HAMOUDA, 2017), como resultado das reações de defesa às condições adversas do meio ambiente (SILVA *et al.*, 2010).

Estes compostos fenólicos também desempenham atividade antioxidante por proteger estruturas celulares, como membranas celulares, proteínas, enzimas, lipídios contra danos oxidativos, neutralizando os radicais livres (MUSZYŃSKA *et al.*, 2018). A microalga pode apresentar, portanto, 29,29% de atividade antioxidante (EL-ABD; HAMOUDA, 2017).

A microalga *Chlorella vulgaris* é constituída também de ácidos graxos polinsaturados essenciais, prevalecendo maiores teores de ácido  $\alpha$ -linolênico, em torno de 27%, enquanto que o ácido linoleico predomina em torno de 24% (FREITAS, 2017). Estes ácidos graxos são beneficiadores da saúde do hospedeiro (NOVELLO *et al.*, 2008), visto que os ácidos graxos da família ômega 3 exerce importante função na diminuição de ocorrência de doenças cardiovasculares e degenerativas (BONOS *et al.*, 2016), além de aumentar a produção de mediadores anti-inflamatórios (PERINI *et al.*, 2010) e os ácidos graxos da família ômega 6 associam-se à reação inflamatória, permeabilidade dos vasos, bem como viscosidade sanguínea (MORAES; COLLA, 2006).

Por estas características, a suplementação de dietas com *Chlorella* pode implicar em inúmeros benefícios fisiológicos, antioxidantes, bioquímicos (LEE *et al.*, 2010), além de benefícios imunológicos, sendo que pesquisas têm estudado cada vez mais o potencial desta microalga no crescimento e produtividade das aves (KIM; KANG, 2015). Logo, a alga *Chlorella vulgaris* pode ser utilizada em rações para aves (SALVIA *et al.*, 2014) como um alimento considerado funcional devido aos seus componentes (OH *et al.*, 2015) que exercem atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (PRABAKARAN *et al.*, 2018).

### 2.3 PROBIÓTICO *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*, *ENTEROCOCCUS FAECIUM*, *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E *BACILLUS SUBTILIS*

O termo probiótico é designado aos microrganismos vivos, não patogênicos (MOUSAVI; HOSSEINI; MIRHOSSEINI, 2018), de cultura única ou mista (ADHIKARI; KIM, 2017) que quando administrados em quantidades adequadas proporcionam o equilíbrio da microbiota intestinal por reduzir os microrganismos patogênicos e induzir a proliferação de microrganismos benéficos. Assim, o probiótico ocasiona benefícios à saúde do hospedeiro (MAHFUZ *et al.*, 2017).

A melhora ocasionada pelos probióticos na saúde dos animais é devido ao equilíbrio e proteção da microbiota intestinal, acarretando melhora na produtividade e imunidade (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018). Os probióticos também melhoram a conversão alimentar, aumentam ganho de peso, diminuem as taxas de mortalidade (PARK *et al.*, 2016), aumentam a atividade de enzimas digestivas como lipase, protease e amilase (BORDA-MOLINA; SEIFERT; SILVA, 2018), e vitaminas como as do complexo B (DERAZ; ELKOMY; KHALIL, 2019).

O desequilíbrio da microbiota, seja por mudança de dieta, alterações climáticas ou doenças (LEMOS *et al.*, 2016), compromete a saúde e desempenho animal (NÉVOA *et al.*, 2013), pois a integridade intestinal é comprometida o que diminui a superfície de absorção, e também aumenta a exposição de antígenos e permeabilidade intestinal. Com isso, há a transferência de bactérias e seus produtos metabólicos para a circulação, o que ocasiona aumento das respostas inflamatórias com consequente piora no desempenho animal (GADDE *et al.*, 2017).

Além disso, manter o equilíbrio da microflora benéfica é fundamental para auxiliar na ativação das respostas adaptativas e inatas, bem como para a formação e desenvolvimento do sistema imune intestinal (AL-KHALAIFAH, 2018), e ainda participa da renovação intestinal, proporciona resistência à ave contra patógenos intestinais (BUCHON *et al.*, 2009), regula a eficiência absorptiva, maturidade intestinal e possui a capacidade de aproveitar alguns nutrientes que são pouco digestíveis pelas enzimas endógenas do animal (AMIT-ROMACH; SKLAN; UNI, 2004).

Então, é possível manipular a microbiota intestinal por meio da dieta, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos benéficos (SUGIHARTO, 2016),

mantendo a integridade do epitélio intestinal, que é fundamental para a saúde do animal, pois procede como uma barreira natural contra bactérias patogênicas, assim como, substâncias tóxicas presentes no lúmen intestinal (SHANMUGAPRIYA *et al.*, 2015). É visto que a microbiota intestinal é composta pelos primeiros microrganismos que a colonizam, permanecendo geralmente ao longo da vida do hospedeiro (SILVA; ANDREATTI FILHO, 2000), sendo a microbiota do pintainho, ainda imatura e com baixa diversidade de microrganismos (MACARI; LUNEDO; PEDROSO, 2014), formada após a eclosão, pois já na superfície do ovo são encontrados microrganismos transmitidos pelo intestino da galinha (DÍAZ-LÓPEZ; ÁNGEL-ISAZA; ÁNGEL, 2017), além do contato com ração, água, cama e seres humanos (MACARI; LUNEDO; PEDROSO, 2014).

Um meio utilizado na produção avícola para prevenir doença e melhorar a produção é o uso de antibióticos, porém o uso excessivo dos mesmos pode desencadear o desenvolvimento de bactérias resistentes, com desequilíbrio da flora intestinal (KAOUD, 2012), além de deixarem resíduos na carne (FARIA FILHO *et al.*, 2006).

Assim, o setor avícola tem buscado por alternativas aos antibióticos diante da descoberta de aditivos alternativos (BAI *et al.*, 2016a), particularmente produtos naturais por serem seguros e não tóxicos (BAI *et al.*, 2018), pois a maneira como os animais são criados e como isto pode interferir na qualidade do produto final é de extrema importância (FARIA FILHO *et al.*, 2006). Dessa forma, o uso de probiótico torna-se uma alternativa em dietas de aves (BAI *et al.*, 2016a).

Os probióticos também podem melhorar a capacidade antioxidante dos animais por eliminar o excesso de espécies reativas de oxigênio (GONG *et al.*, 2018), logo afetam positivamente o desempenho e a qualidade da carne dos animais (LAN; LEE; KIM, 2017). O uso de probióticos também é vantajoso, pois os mesmos não são prejudiciais às carcaças das aves, não deixam resíduos e não são incomuns ao trato gastrintestinal (KOSMANN, 2018).

A utilização de uma mistura de microrganismos como probiótico pode ser mais eficaz do que o uso de apenas uma espécie, pois podem ocorrer interações sinérgicas (BOSTAMI *et al.*, 2015).

Para que um probiótico seja utilizado na nutrição animal é necessário que não seja patogênico, tóxico, seja benéfico ao animal, apresentar-se estável e viável por períodos de armazenamento (ADHIKARI; KIM, 2017), ser

resistente às condições do trato gastrintestinal como enzimas digestivas (MOUSAVI; HOSSEINI; MIRHOSSEINI, 2018), baixo pH e sais biliares, sendo capaz de se aderir ao epitélio intestinal e dessa forma disputar com microrganismos patogênicos pela colonização no trato gastrointestinal (PARK *et al.*, 2016).

As maneiras como os probióticos agem na inibição de patógenos, a fim de exercer todos os benefícios na saúde do hospedeiro, é por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias bacteriostáticas, assim como, disputa pelos sítios de ligação no epitélio intestinal (DERAZ; ELKOMY; KHALIL, 2019), produção de ácidos graxos voláteis e bacteriocinas, compostos tóxicos aos patógenos, e por meio de estimulação do sistema imune (AL-KHALAIFAH, 2018).

As bactérias conseguem se ligar aos sítios de ligação na mucosa intestinal, competindo assim por espaço, pela ligação do glicocálix ou fímbrias das bactérias, formadas por polissacarídeos, com o glicocálix dos enterócitos (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002). Então, quando o probiótico é adicionado à ração podem se multiplicar no intestino, bloqueando os sítios receptores (MIRZA, 2018) por se ligarem ao glicocálix dos enterócitos, podendo inibir a aderência de bactérias patogênicas ao enterócito (FURLAN; MACARI, LUQUETTI, 2004).

O pH do lúmen também influencia na competição por sítios de ligação, pois um pH baixo favorece a sobrevivência de bactérias benéficas, como *Lactobacillus*, o que afeta a adesão do microrganismo ao epitélio, assim como sua resistência a um meio ácido. Portanto, mais bactérias benéficas conseguem se ligar ao epitélio intestinal, excluindo outras patogênicas, como *Salmonella* e *Escherichia coli* (AL-KHALAIFAH, 2018).

A proliferação de microrganismos patogênicos também é contida pelos probióticos por meio da competição por nutrientes no lúmen intestinal, pois os probióticos se alimentam de ingredientes parcialmente degradados por enzimas digestivas, como os prebióticos, adicionados à dieta, e assim menos nutrientes estarão disponíveis, ocasionando deficiência nutricional para bactérias patogênicas (KOSMANN, 2018).

Os probióticos também produzem bacteriocinas, as quais possuem efeito antibiótico, pois estas substâncias proteicas têm ação local, atuando na permeabilidade da membrana da bactéria, o que ocasiona a desestabilização da mesma e, conseqüentemente, morte (WULFF, 2015).

Além das bacteriocinas, os probióticos também produzem substâncias como o peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis (MIRZA, 2018) como ácido láctico, acético, propiônico e butírico (SILVA; ANDREATTI FILHO, 2000) a partir de ingredientes alimentares parcialmente absorvidos, no caso prebióticos, que inibem o crescimento de bactérias patogênicas (ANDREATTI FILHO; SAMPAIO, 1999).

Os ácidos orgânicos, além de reduzirem o pH, tornando o ambiente desfavorável para bactérias patogênicas, também inibem o transporte ativo do excesso de prótons internos, o que resulta em depleção de energia celular, pois requer consumo celular de adenosina trifosfato (ATP) (VIECO-SAIZ *et al.*, 2019), uma vez que os ácidos penetram na parede celular da bactéria e produz íons  $H^+$ , destruindo a fisiologia interna da célula bacteriana (AL-KHALAIFAH, 2018). Assim, afetam a parede celular bacteriana, síntese proteica e replicação e afetam a membrana citoplasmática, ocasionando a morte dos patógenos (VIECO-SAIZ *et al.*, 2019).

Os ácidos orgânicos são tóxicos para patógenos e em pH baixo, por estarem na forma não dissociada, há maior penetração na célula bacteriana, o que aumenta a toxicidade (SHARMA *et al.*, 2018).

Os ácidos graxos de cadeia curta (butirato, propionato e acetato) também são utilizados como fontes de energia nos tecidos, com isso os probióticos podem estimular o crescimento animal pelo aumento da produção destes ácidos e pela regulação seletiva da sinalização da insulina nos tecidos (ADHIKARI; KIM, 2017).

A utilização de butirato em aves já demonstrou efeitos positivos ao partilhar nutrientes dos tecidos adiposos e do fígado para os músculos pela regulação positiva dos receptores de insulina (ADHIKARI; KIM, 2017). Então, os ácidos graxos voláteis produzidos por bactérias podem ser absorvidos e metabolizados pelo hospedeiro, a fim auxiliar nas necessidades energéticas do organismo (MIRZA, 2018).

As bactérias produtoras de ácido láctico como probiótico também possuem a capacidade de agir como barreira no trato gastrointestinal, neutralizando e diminuindo as micotoxinas, por se ligarem as mesmas, sequestrando-as e aumentando sua excreção pelas fezes (VIECO-SAIZ, *et al.*, 2019).

Os microrganismos mais utilizados como probióticos na nutrição de aves são pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Aspergillus*, *Candida* e *Saccharomyces* (GONG *et al.*, 2018), sendo diversas as espécies consumidas como probióticos de tais gêneros, entre elas *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* (SUGIHARTO, 2016), *Bacillus subtilis* e *Bifidobacterium bifidum* (LUO *et al.*, 2013).

*Bifidobacterium* é um grupo de bactérias anaeróbicas, imóveis, não formadoras de esporos, gram-positivas, encontradas na forma de bastonetes curvos, caracterizadas por uma bifurcação em forma de Y (MONFERDINI; DUARTE, 2010). São habitantes naturais do intestino das aves e produzem ácido acético e láctico por meio da fermentação de açúcares (BARBOSA *et al.*, 2011), sendo também pertencente ao grupo de bactérias produtoras de ácido láctico (AL-KHALAIFAH, 2018).

Estas bactérias por produzirem ácido acético e láctico, diminuem o pH do meio, exercendo atividade antibacteriana (MISRA; KUILA, 1991, GIBSON; ROBERFROID, 1995), com retardo no desenvolvimento de microrganismos maléficos como *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Salmonella* (MONFERDINI; DUARTE, 2010). *Bifidobacterium* também diminui o potencial oxirredução como ação antibacteriana no intestino, inibindo a proliferação de patógenos (DRIESSEN; BOER, 1989, DUNCAN; EDBERG, 1995).

Outras maneiras utilizadas pelas Bifidobactérias para evitar a colonização por bactérias patogênicas no intestino são pela produção de bacteriocinas, substância antimicrobianas, pela competição por nutrientes essenciais e por se ligarem a sítios de ligação no epitélio intestinal (BARBOSA *et al.*, 2011).

A espécie *Bifidobacterium bifidum* possui a capacidade de se estabelecer na microbiota intestinal por sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, pois é revestida de exopolissacarídeos, que aumenta sua função antibacteriana (QUIGLEY, 2017), sendo o mesmo um composto eficaz em inibir toxinas bacterianas. Bactérias do ácido láctico produzem exopolissacarídeos (VIECO-SAIZ *et al.*, 2019), como bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (RUAS-MADIEDO *et al.*, 2006).

Estes exopolissacarídeos são polissacarídeos extracelulares (KANG e COTTRELL, 1979) localizados na superfície das bactérias (RUAS-MADIEDO *et al.*, 2006) que contribuem com a adesão e reconhecimento do microrganismo no epitélio

intestinal (DUBOC; MOLLET, 2001) e com a maior capacidade de sobrevivência das bactérias à passagem pelo trato gastrointestinal (PATEL; PRAJAPATI, 2013).

Ainda, a bactéria *Bifidobacterium bifidum* proporciona a síntese de vitaminas do complexo B e assegura a regularidade do peristaltismo do intestino (MONFERDINI; DUARTE, 2010), visto que devido à produção de ácido acético e láctico ocorre o aumento do peristaltismo do intestino, contribuindo para a remoção de patógenos (LAROIA; MARTIN, 1990, DUNCAN; EDBERG, 1995).

O gênero *Lactobacillus*, por sua vez, é o principal representante das bactérias ácido lácticas, corresponde às bactérias anaeróbicas facultativas (MONFERDINI; DUARTE, 2010), gram-positivas, não formadoras de esporos (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017) e que não possuem flagelos. São encontradas na forma bacilar ou cocobacilar (SILVA, 2016) e produzem ácido láctico como principal produto do metabolismo de carboidratos (MUHAMMAD; AHMAD; SHAH, 2018). Este gênero contribui também com o desempenho animal por produzirem enzimas digestivas (ZHANG *et al.*, 2015).

Este gênero também aumenta a atividade de macrófagos, ativa células natural *Killer*, aumenta os níveis de anticorpos e estimula a produção de interferon, agindo como imunomodulador. Ainda, reduz os efeitos nocivos de espécies reativas ao oxigênio, por produzir catalase, impedindo a formação de radicais peróxido, destruindo o peróxido de hidrogênio, como também, glutatona e tiorredoxina (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017).

*Lactobacillus acidophilus*, encontrado no trato gastrointestinal das aves (ALLEGRETTI, 2009), é capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal devido a sua resistência a ácido e sais biliares, sendo que produz ácido láctico, acético (ANTUNES, 2017) e peróxido de hidrogênio, o que inibe a colonização de patógenos no intestino como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Escherichia coli* (MONFERDINI; DUARTE, 2010).

Além disso, o *Lactobacillus acidophilus* também produz a bacteriocina lactacina B, proteína antimicrobiana, com efeito inibitório no crescimento de microrganismos patogênicos (GASPAR *et al.*, 2018), sintetiza niacina, ácido fólico, riboflavina e vitamina K (SILVA, 2016).

*Enterococcus*, outro gênero de microrganismos utilizado como probiótico na nutrição animal, também pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017), é formado por bactérias gram-

positivas, com forma esférica ou ovoide, móveis, apresentando flagelos reduzidos (ALLEGRETTI, 2009), não formam esporos, é anaeróbico facultativo, e produz ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose (TEIXEIRA, MERQUIOR, 2013), bem como enterocinas, bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* (VASILCHENKO; ROGOZHIN; VALYSHEV, 2017).

*Enterococcus*, assim como *Bacillus*, não possuem fímbrias, logo não se aderem ao epitélio, entretanto são produtores de bacteriocinas, que inibem o desenvolvimento de bactérias patogênicas, como *Salmonella* e *Clostridium*, e também hidrolisam compostos que nutrem bactérias benéficas, como *Lactobacillus* (MACARI; LUNEDO; PEDROSO, 2014).

*Enterococcus faecium* é encontrado naturalmente no trato gastrointestinal de animais (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017), utilizado na nutrição de frangos de corte como probiótico devido ao seu efeito no desenvolvimento de órgãos imunológicos, aumento da área de absorção intestinal e função antioxidante (ZHENG *et al.*, 2016). Também é caracterizado por aumentar a resistência à infecção e estimular o metabolismo e a biossíntese de aminoácidos que contenham enxofre e o metabolismo da glicina, serina, treonina e tirosina (OGNIK *et al.*, 2017).

Esta bactéria também pode se desenvolver em ambientes de baixo e alto pH e em ambientes de altas temperaturas, sendo resistentes a sais biliares (JOHNSON, 2017). Bem como, apresentam tempo de reprodução rápido, superior aos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, assim como a colonização nas paredes intestinais, logo inibe com eficiência os patógenos intestinais (REDONDO, 2008).

O microrganismo *Bacillus subtilis*, também considerado bactéria produtora de ácido láctico (AL-KHALAIFAH, 2018), é uma bactéria gram-positiva, aeróbica ou anaeróbica facultativa (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018), encontrada na forma de bacilos (WULFF, 2015).

Este microrganismo apresenta vantagens quanto ao seu uso como probiótico pela sua capacidade de esporular, conferindo maior sobrevivência durante a passagem pelo trato digestório (COPPOLA; TURNES, 2004) e pelo rápido crescimento (GAO *et al.*, 2017). Os esporos do probiótico *Bacillus subtilis* são resistentes a baixo pH, atingindo o intestino em grandes quantidades (WULFF, 2015).

*Bacillus subtilis* possui capacidade de tornar o intestino anaeróbico após sua germinação, ocorrendo exclusão competitiva de bactérias patogênicas (JEONG; KIM, 2014). Isto ocorre por ser uma bactéria aeróbica, que necessita de grande quantidade de oxigênio, enquanto se reproduz no trato intestinal, restringindo o crescimento de bactérias aeróbicas patogênicas (GAO *et al.*, 2017).

Ainda, o probiótico possui a capacidade de produzir compostos antimicrobianos (lipopeptídeos, surfactina, bacteriocinas) contra patógenos (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018) e ácidos orgânicos (propiónico, acético, butírico e láctico) (ANDREATTI FILHO; SAMPAIO, 1999), responsáveis pela redução do pH e exclusão competitiva de microrganismos patogênicos (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018).

O probiótico *Bacillus subtilis* também apresenta características de interesse à nutrição de frangos de corte, por influenciar positivamente o desempenho zootécnico (ZHANG; KIM, 2014), por melhorar a digestibilidade e absorção de nutrientes e produzir enzimas como amilase, protease, lipase, fitase, celulase e xilanase (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018).

Além disso, o probiótico *Bacillus subtilis* aumenta a resposta imunológica (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018), pois a influência dos probióticos no sistema imune dos animais está relacionada ao aumento do número de anticorpos, ativação de macrófagos e aumento de células T, bem como, envolve-se na produção de citocinas (WULFF, 2015). Ainda, promove o aumento da capacidade antioxidante dos animais, por ser resistente a pH e temperaturas altas e baixas (BAI *et al.*, 2016a), melhorando a qualidade da carne, por suprimir o estresse oxidativo (BAI *et al.*, 2016b).

Então, os probióticos podem ser utilizados em rações para aves, uma vez que mantêm as populações da microbiota intestinal em equilíbrio (MIRZA, 2018) e exercem efeitos benéficos no desempenho, saúde e qualidade da carne (ADHIKARI; KIM, 2017).

#### 2.4 EFEITO DO USO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* E DE PROBIÓTICO NO DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

O setor avícola procura constantemente alimentos que contenham todos os nutrientes necessários para que as aves se desenvolvam eficientemente

(NEUMANN; VELTEN; LIEBERT, 2018). Dessa forma, alguns estudos estão sendo realizados para comprovar a importância da microalga *Chlorella vulgaris* e do probiótico no desempenho de frangos de corte.

Os benefícios da *Chlorella vulgaris* são atribuídos aos seus componentes que exercem atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (PRABAKARAN *et al.*, 2018), sendo considerada um alimento funcional (OH *et al.*, 2015), assim definido por afetar benéficamente a saúde do hospedeiro, reduzindo o risco de ocorrência de doenças (MORAES; COLLA, 2006). Além disso, também possui alto teor de proteína, em torno de 60% (SALVIA *et al.*, 2014) até 62% de proteína (GADIEV *et al.*, 2019), polissacarídeos, fibras e clorelina, que afetam positivamente a microbiota intestinal, com aumento de bactérias benéficas, o que aumenta a eficiência digestiva dos animais (KANG; PARK; KIM, 2017), exercendo também função antibacteriana (KIM; KANG, 2015).

Por esta alga ser constituída de ácidos graxos polinsaturados essenciais (FREITAS, 2017), beneficiadores da saúde do hospedeiro (NOVELLO *et al.*, 2008) e  $\beta$ -1,3-glucano (MOON *et al.*, 2016) também afeta positivamente o sistema imune (KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015). Assim, pode contribuir com benefícios fisiológicos, bioquímicos (LEE *et al.*, 2010) e imunológicos (KIM; KANG, 2015) que contribuem com a saúde e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo animal.

De acordo com An *et al.* (2016), ao adicionarem diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (0,05, 0,15 e 0,5%) nas rações de frangos observaram que os níveis de 0,15 e 0,5% ocasionaram maior ganho de peso, e melhora na conversão alimentar quando utilizado o nível de 0,5%. No entanto, o consumo de ração e os rendimentos de peito e pernas não foram afetados pelos níveis.

Os autores El-Abd; Hamouda (2017), ao adicionarem cinco gramas de *Chlorella vulgaris* congelada e descongelada e cinco gramas de *Chlorella* fresca/ litro de água para frangos de corte, analisaram que houve efeito significativo para rendimento de peito. Porém, os tratamentos não resultaram em efeito significativo para a taxa de mortalidade.

Resultados benéficos também foram encontrados por Kang; Park; Kim (2017) ao testarem 25, 50 e 75g de *Chlorella*/ kg de ração para frangos de corte, os quais verificaram que com o aumento do nível de inclusão de *Chlorella* houve aumento do ganho de peso, apesar de que o consumo de ração e a

conversão alimentar não foram afetados pela inclusão da alga. Resultados estes semelhantes aos encontrados por Kang *et al.* (2013) ao adicionar 1% de *Chlorella vulgaris* na dieta de frangos.

O uso de probiótico também é vantajoso para melhorar o desempenho das aves, pois contribui com o aumento da eficiência na absorção e digestão de nutrientes, devido à sua influência na permeabilidade do epitélio intestinal, por evitar que microrganismos patogênicos utilizem nutrientes, como minerais, aminoácidos e carboidratos, para produção de toxinas (BUSANELLO *et al.*, 2012).

O probiótico influencia na melhor retenção de minerais, como cálcio, fósforo e nitrogênio, melhorando a taxa de eficiência proteica, o que conseqüentemente pode melhorar o rendimento de carne das aves (PARK *et al.*, 2016). Também pode contribuir com melhores características de carcaça por proporcionar aumento da digestibilidade da dieta (SOUZA *et al.*, 2018), já que contribui com o aumento da atividade de enzimas digestivas (DERAZ; ELKOMY; KHAIL, 2019).

Este aditivo também ocasiona benefícios aos animais, pois mantém a microbiota intestinal equilibrada, afetando positivamente a saúde dos animais (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018), estimulando também o sistema imune (MIRZA, 2018). Assim, manter a saúde e a integridade intestinal favorece a expressão genética das aves, afetando o desempenho animal, visto que promove melhora na obtenção de nutrientes pelas aves (SANTOS, 2011).

No estudo realizado por Bai *et al.* (2016a), ao testarem o probiótico *Bacillus subtilis* ( $2 \times 10^{10}$  cfu;  $3 \times 10^{10}$  cfu;  $4 \times 10^{10}$  UFC/kg de ração) em dieta de frangos de corte, verificaram que no período de um a 21 dias não houve efeito significativo da adição de probiótico sobre a conversão alimentar e consumo de ração, de 21 a 42 dias houve melhora na conversão alimentar em aves que receberam  $3 \times 10^{10}$  UFC e  $4 \times 10^{10}$  UFC de *Bacillus subtilis*, assim como, no período total. Gao *et al.* (2017) ao estudarem *Bacillus subtilis* (100, 150, 200 e 250mg/kg de ração) também observaram melhora na conversão alimentar e ganho de peso, sem alterar o consumo de ração.

Pourakbari *et al.* (2016), ao trabalharem com diferentes níveis (0,005%, 0,01%, 0,015% e 0,02%) de complexo de probióticos (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*

*rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Aspergillus oryzae* e *Candida pintolopesii*), verificaram melhora no ganho de peso e conversão alimentar. Gheisar; Hosseindoust; Kim (2016) ao estudarem *Enterococcus faecium* (0,25% e 0,5%) observaram que houve aumento do rendimento do peito.

Hatab, Elsayed e Ibrahim (2016), ao estudarem *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium* (0, 1 e 2mg/kg de ração), observaram maiores ganhos de peso, menor consumo de ração, melhor conversão alimentar e aumento do rendimento da carcaça.

Gong *et al.* (2018,) ao adicionarem diferentes probiótico (*Bacillus subtilis natto*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus* ( $10^8$  UFC/kg de ração) na ração de frangos, observaram maiores ganhos de peso, não sendo verificado efeito para conversão alimentar e consumo de ração. A inclusão dos probióticos também resultou em uma melhora nas atividades de tripsina, amilase, lipase e protease.

Souza *et al.* (2018), ao adicionarem *Lactobacillus acidophilus* ( $1 \times 10^9$  UFC/g de ração), *Bacillus subtilis* ( $2,8 \times 10^9$  UFC/g de ração), *Bifidobacterium bifidum* ( $2 \times 10^9$  UFC/g de ração) e *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^9$  UFC/g de ração) na ração de frangos, não observaram efeito significativo no consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar, viabilidade da produção e rendimento de carcaça e cortes (peito, perna e asas). Assim como foi obtido por Junaid *et al.* (2018) ao estudarem *Lactobacillus acidophilus* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC/g de ração) e *Bifidobacterium bifidum* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC/g de ração).

## 2.5 EFEITO DO USO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* E DE PROBIÓTICO NA QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE

A carne de frango contém baixa taxa de colesterol, quando sem pele, sendo o peito a parte mais magra da carcaça (COSTA *et al.*, 2017), possuindo de 0,9 a 1,57% de lipídios, visto que na região da coxa o teor de lipídios varia de 3,2 a 5,18%, e na região da sobrecoxa o teor de lipídios é de 1,3 a 4,36%. Em geral, a carne de frango é composta de um elevado teor de ácidos graxos polinsaturados (DOMINGUES, 2008).

Além disso, a carne de frango também é uma excelente fonte de minerais como o ferro, mais especificamente ferro hemínico, o qual é a forma do

ferro melhor incorporada pelo organismo, e vitaminas, particularmente B2 e B12, as quais colaboram na síntese de energia a partir dos nutrientes ingeridos (COSTA *et al.*, 2017). Isto posto, a busca por alimentos mais saudáveis é crescente, sendo função do nutricionista e da pesquisa selecionar ingredientes na ração dos animais que proporcionem uma melhor qualidade da carne.

A qualidade da carne, que compreende a aspectos como maciez, vida útil, perfil de ácidos graxos, suculência, aroma, sabor e cor, é um quesito de grande exigência pelo mercado consumidor, visto que pode ser identificada por meio de parâmetros físico-químicos da carne, como pH, capacidade de retenção de água, perda de água por cocção (ALVES; ALBUQUERQUE; BATISTA, 2016), medição de cor e força de cisalhamento (MELO *et al.*, 2015).

A dieta ofertada aos animais influencia de maneira direta na composição de ácidos graxos na carne dos frangos (RULE *et al.*, 2002). Dessa forma, o conteúdo lipídico da carne de frango é afetado diretamente pela gordura contida na dieta (SUGIHARTO; HENCKEL; LAURIDSEN, 2010).

Os ácidos graxos polinsaturados essenciais exercem benefícios à saúde, envolvidos na redução de triglicerídeos, agregações de plaquetas e risco de doenças cardiovasculares, pois diminuem o nível de colesterol e de lipoproteínas de baixa densidade no sangue. Os ácidos graxos considerados essenciais são o  $\alpha$ -linolênico e linoleico (NOVELLO, *et al.*, 2008), denominados dessa maneira pois as aves, assim como os mamíferos, não são capazes de sintetizá-los, logo são adquiridos por meio da dieta (COSTA *et al.*, 2017).

Após a ingestão, o ácido  $\alpha$ -linolênico é convertido em EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosahexaenoico) e o ácido linoleico é convertido em ácido araquidônico (TOGASHI *et al.*, 2007) e docosapentaenóico (DPA), visto que essas conversões são catalisadas por enzimas comuns entre as famílias ômega, denominadas elongase e dessaturase (HAGGARTY, 2010).

O EPA e DHA desempenham efeito cardioprotetor, diminuindo os triglicerídeos no plasma por meio da redução da síntese hepática de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), bem como modera a lipoproteína total e de densidade baixa (LDL) (PEDERSOLI *et al.*, 2015), também conhecido como colesterol ruim, pois associa-se à doenças cardiovasculares (NADRUZ JÚNIOR, 2009).

Os ácidos graxos polinsaturados da série ômega 3 também exercem atividades anti-inflamatórias, anticoagulantes, vasodilatadoras (MORAES; COLLA, 2006) e reduzem a incidência de doenças cardiovasculares (COSTA *et al.*, 2017). No entanto, a série ômega 6 está associada à reação inflamatória, permeabilidade dos vasos, viscosidade sanguínea (MORAES; COLLA, 2006), bem como está relacionada com a ocorrência de doenças inflamatórias, cardiovasculares e distúrbios imunológicos (BORGES *et al.*, 2014).

O metabolismo dos ácidos graxos polinsaturados da série ômega 3 e ômega 6 são discrepantes devido aos diferentes tipos de eicosanoides produzidos, sendo o ácido araquidônico gerador de prostaglandina 2, tromboxano 2 e leucotrieno 4, envolvidos, eicosanoides relacionados com propriedades pró-inflamatórias e com a ocorrência de doenças imunológicas e cardiovasculares. O ácido eicosapentaenóico (EPA) produz prostaglandina 3, tromboxano 3 e leucotrieno 5, sendo estes eicosanoides relacionados com propriedades anti-inflamatórias (MOURA *et al.*, 2015).

O consumo excessivo de ácidos graxos da série ômega 6 pode acarretar em produções exacerbadas de eicosanoides com características inflamatórias e peróxidos da séries leucotrienos, prostaglandina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub>, visto que em um organismo saudável quantidades pequenas de eicosanoides são produzidas, enquanto que em um organismo em condições patológicas são produzidas elevadas quantidades de eicosanoides (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2011).

Entretanto, o mesmo não ocorre com os ácidos graxos polinsaturados da série ômega 3, os quais são ineficientes em produzir peróxido, inibindo então a síntese de eicosanoides prejudiciais, como o EPA, que inibe a síntese de prostaciclina e tromboxano, sendo este último também inibido pelo DHA (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2011).

Assim, para o bom funcionamento do sistema imune, é primordial manter um equilíbrio entre a relação ácidos graxos polinsaturados da família ômega 6 com os ácidos graxos polinsaturados da família ômega 3, pois se esta relação for alta pode ocorrer aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando excessivamente a resposta inflamatória (SWIATKIEWICZ; ARCZEWSKA-WLOSEK; JOZEFIAK, 2015), uma vez que nos processos de alongamento e dessaturação, o ácido  $\alpha$ -linolênico e o ácido linoleico, por serem comuns a ambas vias metabólicas,

competem pelas mesmas enzimas, o que resulta na produção de eicosanoides com diferentes funções (POTENÇA *et al.*, 2010).

Então, a incorporação de *Chlorella vulgaris* na ração das aves pode contribuir com a deposição de ácidos graxos polinsaturados na carne, pois esta alga é constituída de ácidos graxos polinsaturados essenciais, predominando altos teores de ácido  $\alpha$ -linolênico (FREITAS, 2017). Pakravan *et al.* (2017) ao investigarem a eficácia da substituição da farinha de peixe (0, 400, 300, 200, 100g) pela farinha de *Chlorella vulgaris* (0, 97,2, 194,4, 291,6 e 388,8g) na dieta de camarão branco, verificaram que com a substituição houve aumento nos teores de ácidos graxos polinsaturados (ácido eicosapentaenóico, ácido docosahexaenóico e ácido araquidônico) na carne.

Sugiharto; Henckel; Lauridsen (2010), ao testarem uma dieta para frangos de corte enriquecida com cinco e dez gramas de *Chlorella*, verificaram que o conteúdo de ácidos graxos saturados no peito foi menor em relação aos ácidos graxos polinsaturados. Porém, o nível de ácidos graxos polinsaturados não foi aumentado com a suplementação de *Chlorella* neste estudo, pois segundo Cunnane; Anderson (1997) e Fu; Sinclair (2000) os ácidos graxos polinsaturados são preferencialmente oxidados para fins metabólicos.

Logo, um nível mais alto de ácidos graxos polinsaturados na dieta pode resultar no aumento da oxidação destes ácidos graxos, conseqüentemente, menor teor dos mesmos seria depositado nos tecidos (SUGIHARTO; HENCKEL; LAURIDSEN, 2010).

O uso de probiótico também pode influenciar no perfil de ácidos graxos da carne de frango, sendo que os ácidos graxos polinsaturados da dieta modulam a ação dos probióticos, aumentando a colonização de determinadas bactérias (ABDULLA *et al.*, 2018).

Segundo Popova (2017), os probióticos podem ocasionar aumento da insaturação de ácidos graxos sem comprometer a estabilidade oxidativa na carne, Hascík *et al.* (2014) analisaram que as concentrações de ácido graxo monoinsaturado e polinsaturados na carne aumentaram com a inclusão de 3,3 g de probiótico na dieta. Endo e Nakano (1999) constataram maior proporção de ácidos graxos insaturados na carne de peito e coxa de frangos em relação aos ácidos graxos saturados e aumento da concentração de ácidos graxos ômega 3, principalmente ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA),

ao estudarem a inclusão de 3 g de probiótico (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Saccharomyces* e *Candida*) nas dietas.

Abdulla *et al.* (2018) observaram que, ao adicionarem cinco gramas de *Bacillus subtilis*/ kg de ração, apenas a concentração de ácido oleico na carne diminuiu e a concentração de ácido palmítico aumentou . Isto pode ser explicado, pois os microrganismos intestinais podem hidrogenar ácidos orgânicos insaturados em saturados e dessaturar alguns ácidos orgânicos, logo a microbiota intestinal é capaz de modificar a composição de ácidos graxos da ração e dos tecidos animais. Além disso, as espécies do gênero *Bacillus* produzem ácido butírico como principal produto metabólico, o que pode interferir na geração de ácido palmítico na carne de peito de frangos de corte.

Ainda, segundo os autores, os principais ácidos graxos polinsaturados encontrados na carne de peito de frangos de corte foram ácido linoleico (C18: 2n- 6), ácido linolênico (C18: 3n-3), ácido araquidônico (C20: 4n-6) e ácido eicosapentaenóico (C20: 5n-3), porém não foram afetados pelo uso de probiótico.

Jahromi *et al.* (2016), ao testarem 0,1% de probiótico (*Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus acidophilus*) em rações pra frangos de corte criados em diferentes temperaturas (24°C e 35°C), analisaram que com a adição do probiótico em ambas as temperaturas houve efeitos positivos no perfil de ácidos graxos no peito, apresentando menores quantidades de ácidos graxos saturados e maiores quantidades de ácidos graxos insaturados totais.

O probiótico influencia na redução de fosfolipídios na carne e isto ocorre, pois os probióticos exercem efeito hipocolesterolêmico, no qual assimilam o colesterol, como o *Lactobacillus acidophilus*, assim utilizam o colesterol para seu próprio metabolismo (DÍAZ-LÓPEZ; ÁNGEL-ISAZA; ÁNGEL, 2017). Bactérias como *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* também possuem a capacidade de desconjugar os ácidos biliares, e dessa forma impedem sua reabsorção intestinal, eliminando-os nas fezes, o que acarreta na ressintetização de sais biliares do colesterol no sangue pelo fígado (GILLILAND; WALKER, 1990).

A carne de frango por ser um alimento com alto teor de ácidos graxos insaturados é um alimento susceptível à oxidação lipídica (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009). Esta é retratada como uma deterioração de ácidos graxos saturados e insaturados dependentes de oxigênio (LEÃO *et al.*, 2017) e resulta em

aspectos prejudiciais como sabor indesejado, odor rançoso, mudança na coloração, perda de valor nutritivo, diminuição da vida útil do alimento, além de produzir e acumular compostos tóxicos danosos à saúde (LEÃO *et al.*, 2017), bem como danificar as membranas celulares (TRAESEL *et al.*, 2011).

A oxidação lipídica ocorre principalmente em ácidos graxos insaturados, pois as duplas ligações são mais reativas em relação às ligações simples (SCHAICH, 2005) e como consequência da oxidação lipídica há a formação de produtos indesejados como o malonaldeído (MDA), o qual é o principal produto resultante da peroxidação de ácido graxos polinsaturados (HABIBIAN *et al.*, 2015).

Diante disso, é importante a utilização de antioxidantes, que são substâncias, cuja função é preservar o alimento por desacelerar o efeito danoso causado pelos radicais livres, inibindo a taxa de oxidação (MANFREDI, 2014). Todavia, antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT) (RAMALHO; JORGE, 2006) possuem potencial carcinogênico. Então, nos últimos anos, aumentou-se a busca por alternativas aos antioxidantes sintéticos (LEÃO *et al.*, 2017).

Deste modo, as algas apresentam-se como uma alternativa, pois mesmo expostas à luz e oxigênio, o que poderia originar radicais livres, não apresentam danos oxidativos nos seus ácidos graxos polinsaturados (RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004). Isto sugere então, que tais organismos possuem componentes antioxidantes protetores (HAMED, 2016). Bendich (1988) presumi que os carotenoides são os responsáveis pela ação antioxidante exercida pelas algas, por possuírem duplas ligações conjugadas, diminuindo a oxidação.

Os carotenoides são pigmentos fotossintéticos secundários que exercem função como antioxidante o que atribui aos mesmos à capacidade de prevenir doenças degenerativas por combater radicais livres, além de estimular o sistema imunológico (DERNER *et al.*, 2006).

Estes pigmentos neutralizam os radicais livres nas membranas celulares, o que pode prevenir a oxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados (DELLES *et al.*, 2014). Como também, podem contribuir como pigmentos naturais em produtos de origem animal (OH *et al.*, 2015).

Diante disto, a alga *Chlorella vulgaris* pode exercer atividade antioxidante por possuir carotenoides (PASARIN; ROVINARU, 2018), e ainda ser uma alternativa como corante natural em produtos de origem animal (OH *et al.*,

2015), Além dos carotenoides, a microalga *Chlorella* possui compostos fenólicos e luteína, pigmento carotenóide amarelo, que também desempenham atividades antioxidantes (MUSZYŃSKA *et al.*, 2018). Estes compostos também são um sistema de proteção natural da alga quanto aos radicais livres presentes em seu ambiente (BLEAKLEY; HAYES, 2017). A atividade antioxidante destes compostos ocorre, pois possuem propriedades de oxidorredução, as quais sequestram radicais livres ou decompõem peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

A *Chlorella vulgaris* também pode contribuir como antioxidante por possuir selênio (EL-ABD; HAMOUDA, 2017), pois este mineral atua no sistema antioxidante por meio de selenoproteínas, as quais desempenham a regulação redox e defesa antioxidante dos tecidos e células, como células do sistema imunológico (DALIA *et al.*, 2018). As selenoproteínas glutathione peroxidase, tioredoxina redutase e iodotironina desiodase (KHOSO *et al.*, 2019) exercem importante função na inibição da peroxidação lipídica, supressão de radicais livres (HABIBIAN *et al.*, 2015) e regulação do estresse oxidativo (DALGAARD *et al.*, 2018).

A capacidade de retenção de água, assim como, a cor da carne estão associadas ao estado de oxidação, indicando a qualidade da carne. Quando há oxidação dos fosfolipídios das membranas celulares, ocorrem alterações na permeabilidade celular, o que acarreta em menor retenção de água no músculo. Como também, quando a capacidade antioxidante é melhorada pode ocorrer aumento de mioglobina, havendo benefícios quanto à cor da carne (LI *et al.*, 2018).

Os antioxidantes, de acordo com Asghar *et al.* (1989) e Attia *et al.* (2016), mantêm a funcionalidade das membranas, dessa forma as tornam eficientes quanto barreiras semipermeáveis contra a perda exsudativa. Esta proteção à membrana resulta na redução da oxidação dos fosfolipídios da membrana celular, contribuindo com a integridade das fibras musculares e com a maior capacidade de retenção de água (PARK; LEE; KIM, 2018).

Pesquisas comprovando o efeito benéfico da microalga *Chlorella vulgaris* na qualidade da carne de frangos de corte são escassas, porém Oh *et al.* (2015), ao estudarem a inclusão de 0, 1.000 e 2.000 mg de *Chlorella vulgaris*/ kg de ração para patos, observaram que com o aumento da adição houve aumento do amarelecimento da carne do peito, assim como, da capacidade de retenção de água.

Zheng *et al.* (2012) e Kim; Kang (2015) também observaram efeitos significativos na cor da gema dos ovos de poedeiras ao adicionarem respectivamente 0,1 e 0,2% e 25, 50 e 75 g de *Chlorella*/ kg de ração.

El-Abd; Hamouda; Dawoud (2018), ao estudarem a adição de cinco gramas de *Chlorella vulgaris* congelada, descongelada e fresca/ litro de água, puderam observar que houve redução de malonaldeído no grupo de aves tratadas com *Chlorella vulgaris*, sendo que o grupo tratado com a alga fresca apresentou o menor valor de malonaldeído.

Todavia, An *et al.* (2016), ao adicionarem diferentes níveis (0,05, 0,15 e 0,5%) de *Chlorella vulgaris* na dieta de frangos de corte, observaram que os parâmetros de qualidade da carne, como perda de água por cozimento, pH e cor não foram afetados.

O probiótico também evita danos nocivos ocasionados por espécies reativas ao oxigênio, pois bactérias do ácido láctico produzem superperóxido dismutase, responsável por converter os radicais superperóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio, o que diminui a atividade das espécies reativas ao oxigênio. Além de que *Lactobacillus* também podem produzir catalase, destruindo o peróxido de hidrogênio, bloqueando a formação de radicais peroxil, além de glutathione e tioredoxina (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017).

Logo, os probióticos possuem a capacidade de capturar e inibir o excesso de radicais livres, como *Bacillus subtilis*, que pode ser utilizado para melhorar a qualidade da carne, por aumentar a capacidade antioxidante dos animais, pois inibe o estresse oxidativo (BAI *et al.*, 2016b). Bem como, o probiótico pode hidrolisar grandes moléculas de proteína e formar peptídeos biologicamente ativos, como a glutathione, podendo contribuir com propriedades antioxidantes (OGNIK *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo relaciona-se com a oxidação lipídica, que é um dos principais fatores contribuintes para a geração de radicais livres de oxigênio, responsável por danificar a qualidade dos alimentos (ANANTHI *et al.*, 2010). Este processo de estresse oxidativo pode ser descrito como um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de radicais livres (BAI *et al.*, 2016a), em que ocorre alta produção de radicais livres e enfraquecimento do sistema de defesa antioxidante do organismo (SILVA, 2015).

É visto que as espécies reativas de oxigênio são formadas naturalmente durante processos biológicos do organismo (DALIA *et al.*, 2018), como uma estratégia do sistema imunológico em combater patógenos, sendo que a formação de radicais livres é um meio para destruir patógenos. Ademais, a formação de radicais livres também pode ser oriunda do metabolismo do oxigênio (SURAI; FISININ; KARADAS, 2016). Quando na transição do músculo em carne há alto estresse oxidativo e baixa capacidade antioxidante, tornando-se um fator importante para a qualidade da carne (WARNER *et al.*, 2005).

Bai *et al.* (2016b), ao adicionarem 0; 0,2; 0,3 e 0,4 g de *Bacillus subtilis*/ kg de ração para frangos de corte, observaram melhora na capacidade antioxidante da carne de peito de frangos de corte, além de apresentar estabilidade oxidativa da carne durante o armazenamento de 8 dias a 4°C. O mesmo foi encontrado por Bai *et al.* (2018), ao adicionarem 0; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 g de *Bacillus subtilis*/ kg de ração para frangos de corte.

Com a adição de diferentes probióticos (*Bacillus subtilis natto*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus* ( $10^8$  UFC/kg de ração) na ração de frangos de corte, Gong *et al.* (2018) detectaram uma maior atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, visto que os níveis malonaldeído foram reduzidos.

Park; Kim (2014), ao estudarem *Bacillus subtilis* em dietas para frangos de corte ( $1,1 \times 10^4$ ;  $1,0 \times 10^5$  e  $1,0 \times 10^6$  UFC), observaram que a capacidade de retenção de água aumentou com o aumento dos níveis, assim como houve menor perda de água por gotejamento. Entretanto, não houve efeito significativo da adição do probiótico para pH, luminosidade, intensidade de vermelho e amarelo na carne.

Hossain, Begun e Kim (2015), ao avaliaram a adição de 0,1% e 0,2% de probiótico ( $2 \times 10^8$  UFC de *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* e *Lactobacillus acidophilus*/kg de ração) em rações para frangos de corte, analisaram que a adição de probiótico resultou em carnes com menores valores para luminosidade, não sendo encontrada diferença significativa para intensidade de vermelho e amarelo na carne, pH, perda de água por gotejamento e por cozimento, assim como, para oxidação lipídica.

Zheng *et al.* (2014) relataram, ao estudarem a bactéria *Enterococcus faecium* como probiótico na dieta de frangos de corte ( $> 10^6$  UFC/g de ração), que

as aves que receberam o probiótico obtiveram, com 45 minutos e 24 horas após o abate, maiores pH do peito. Ainda com 45 minutos após o abate houve diminuição da luminosidade, enquanto que com 24 horas após o abate houve menor intensidade de amarelo. Os valores para perda de água por cozimento e gotejamento foram menores, indicando maior capacidade de retenção de água.

Estes resultados sugerem que o probiótico *Enterococcus faecium* pode melhorar a qualidade da carne, pois pode influenciar a expressão de proteínas reguladoras da capacidade de retenção de água e pH da carne, aumentando tal expressão. Esta regulação é benéfica, pois mantém a integridade celular, evitando a perda de água.

Entretanto, Lan, Lee e Kim (2017) concluíram, ao incluírem em rações para frangos de corte 0,05%, 0,10% e 0,20% de *Enterococcus faecium*, que não foram observadas diferenças significativas quanto ao valor de pH, cor perda de água por gotejamento.

## 2.6 EFEITO DO USO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* E DE PROBIÓTICO NO SISTEMA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE

O sistema imune protege o organismo da ave contra agentes infecciosos e dessa forma interfere positivamente no desempenho animal (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Assim, o fornecimento de nutrientes que contribuam com um estado ideal de imunidade é fundamental para a produção dos animais, pois as aves a campo estão susceptíveis a diversos desafios imunitários (FUNARI JÚNIOR, 2008).

O estado ideal de imunidade promove diminuição do estresse imunológico da ave, que é ocasionado quando a ave é exposta a um antígeno, assim menos nutrientes serão utilizados para reestabelecer a homeostasia, sendo direcionados à produção animal (OLIVEIRA *et al.*, 2012), pois para que as reações do sistema imunológico ocorram é preciso de energia e nutrientes para a formação de células e substâncias envolvidas no sistema de defesa do organismo do animal (CARDOSO; TESSARI, 2015).

Há vários mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos que constituem o sistema imune das aves, incluindo barreiras físicas, químicas e biológicas, como pele, mucosa, citocinas, peptídeos antimicrobianos,

células (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos), assim como tecidos e órgãos linfoides (FERNANDES *et al.*, 2013).

O sistema imune das aves é dividido em sistema linfoide primário constituído pelo timo, onde ocorre o desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T, os quais ativam células para combater antígenos, e pela bursa de Fabricius, local onde há o desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos (BASTOS, 2015), e sistema linfoide secundário (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O sistema linfoide secundário é formado pelo baço, em que reações contra antígenos transportados no sangue ocorrem (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000), e tecidos linfoides associados às mucosas, como glândula de Harder, intestino, brônquios, placas de Peyer, divertículo de Meckel, tonsilas cecais e pineal (CARDOSO; TESSARI, 2015), sendo os tecidos linfáticos, como placas de Peyer e tonsilas cecais, responsáveis por captar antígenos, estimulando os linfócitos B e células T, a fim de desenvolver uma imunidade inespecífica e geral (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004).

Nas aves, a medula óssea é o local onde leucócitos, trombócitos e eritrócitos são originados, além de ser na medula óssea que eritrócitos, heterófilos, granulócitos, eosinófilos, basófilos, agranulócitos, linfócitos e monócitos se desenvolvem e maturam, migrando para a circulação sistêmica, tecidos e órgãos linfoides secundários (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002). Estes também se constituem de células não linfoides como células dendríticas, macrófagos, basófilos, heterófilos e eosinófilos, sendo que são locais onde a resposta imune humoral se desenvolve (FERNANDES *et al.*, 2013).

O aumento de peso dos órgãos imunológicos, em animais saudáveis, relaciona-se com o aumento da proliferação de células imunes, indicando melhor imunidade do organismo (SIKANDAR *et al.*, 2017) durante uma resposta imune, pois está relacionado com a capacidade do corpo em fornecer células linfoides (LAN; LEE; KIM, 2017).

A resposta imune é classificada em inata e adaptativa ou adquirida (EFR, 2004). A inata é a primeira resposta manifestada à invasão por patógenos, evitando a multiplicação dos mesmos (KAISER, 2010). É representada por barreiras tanto químicas quanto físicas, como mucosas, cílios, secreções e enzimas, bem como por componentes celulares, como heterófilos e macrófagos (ALMEIDA *et al.*,

2013), células dendríticas, monócitos, células fagocíticas, células não linfoides e anticorpos naturais (IgM, IgA e IgY) (FERNANDES *et al.*, 2013).

As imunoglobulinas das aves são glicoproteínas sintetizadas por linfócitos B, bem como por plasmócitos, sendo divididas em IgM, IgA e IgY (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002). As imunoglobulinas da classe IgM e IgY são encontradas na bursa de Fabrícus, sendo a imunoglobulina da classe IgM, de fase aguda, produzida durante a resposta imune primária, surgindo logo após um processo infeccioso (BASTOS, 2015) e expressa na forma de receptores de membrana plasmática dos linfócitos B (FERNANDES *et al.*, 2013).

A imunoglobulina IgY surge posteriormente, durante a resposta imune secundária, e é específica para reconhecimento pelo linfócito B (BASTOS, 2015), sendo encontrada no soro, fundamental para a defesa contra infecções sistêmicas (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002). A imunoglobulina da classe IgA encontra-se nas secreções e mucosas (BASTOS, 2015) e são produzidas por plasmócitos existentes nas placas de Peyer e nos tecidos linfoides associados às mucosas (MALTs) presentes nas tonsilas cecais (KUMAR *et al.*, 2009).

A adaptativa ou adquirida, no entanto, age de forma lenta com mecanismos de defesa específicos tanto celulares como humorais, os quais são responsáveis por proteger o organismo contra invasores (EFR, 2004), por meio da ação de linfócitos B e T, anticorpos específicos e células apresentadoras de antígenos (FERNANDES *et al.*, 2013), sendo específica a um determinado patógeno, pois desenvolve memória imunológica (PERINI *et al.*, 2010).

A resposta imune adaptativa ou adquirida é denominada de imunidade humoral quando mediada por anticorpos (PERINI *et al.*, 2010), produzidos por linfócitos B (ALMEIDA *et al.*, 2013), em resposta a um antígeno (CARDOSO; TESSARI, 2015). Enquanto que, quando há ativação de células para destruição de antígenos (células T) é denominada imunidade celular, mediada por linfócitos T (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Quando o animal é inoculado por um antígeno, anticorpos são produzidos a fim de destruí-lo, sendo específicos aos antígenos que estimulam sua produção, assim os níveis de anticorpos se elevam, em torno de 10 a 20 dias, quando atingem o pico, porém a quantidade de anticorpos formada em uma primeira resposta ao antígeno é pequena. Caso ocorra uma segunda inoculação do antígeno, os anticorpos atingem níveis mais elevados e persistem por mais tempo, sendo esta

resposta específica, no entanto eventualmente os níveis de anticorpos param de aumentar mesmo que ocorram diversas exposições a antígenos (TIZARD, 2008).

Diante da importância do sistema imune para a proteção do organismo da ave contra agentes infecciosos e para a produção animal, mantendo sua homeostasia, a microalga *Chlorella* pode ocasionar benefícios ao sistema imune animal, já que em humanos e camundongos tal microalga demonstrou melhora na resposta imune. Então, desenvolver pesquisas com esta alga na nutrição de frangos de corte torna-se vantajoso para melhorar a resposta imune em frangos de corte (SUGIHARTO; HENCKEL; LAURIDSEN, 2010).

Esta melhora na resposta imune dos animais pode ser explicada, pois a *Chlorella vulgaris* possui em sua composição ácido  $\alpha$ -linolênico (ácido graxo polinsaturados da família ômega 3) e linoleico (ácido graxo polinsaturado da família ômega 6) (FREITAS, 2017), que possibilitam a produção de imunoglobulinas por meio da modulação da expressão de citocinas (KANG *et al*, 2013). A *Chlorella* também pode aumentar a produção de interferon (IFN)  $-\gamma$  e interleucina (IL) -2, o que ocasiona aumento da produção de IgA (SUGIHARTO; LAURIDSEN, 2016).

Os ácidos graxos polinsaturados da família ômega 3 e ômega 6, podem influenciar na resposta imune e inflamatória (PERINI *et al.*, 2010), pois quando depositados na membrana da célula influenciam na liberação de mediadores inflamatórios, bem como nas propriedades da membrana (GALLES, 2015).

A inflamação quando regulada compõe um mecanismo de defesa do organismo, associada a uma maneira de restaurar a homeostase, porém ela deve ser controlada como por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias, para que não ocorram prejuízos ao hospedeiro (CALDER, 2013).

Os eicosanoides produzidos pelos ácidos graxos polinsaturados essenciais, os quais são metabólitos oxigenados, compostos por prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos (FABBRI, 2013), estão envolvidos com a intensidade e duração da resposta inflamatória, bem como na regulação das funções dos linfócitos T e B (PERINI *et al.*, 2010).

Os ácidos graxos polinsaturados da família ômega 3 agem por meio da redução da formação de eicosanoides com características inflamatórias e com ocorrência de distúrbios imunológicos, sendo que o EPA e o DHA podem inibir a produção de citocinas inflamatórias (BORGES *et al.*, 2014), como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (FU; GUO; SHEN, 2017).

É visto que as citocinas pró-inflamatórias podem ocasionar aumento da degradação de proteína muscular, reduzindo sua síntese, desviando nutrientes para a formação de componentes no sistema imunológico, o que influencia negativamente no crescimento dos animais (FU; GUO; SHEN, 2017).

A inibição na produção de citocinas inflamatórias ocorre, pois quando ácidos graxos da série ômega 3 são incorporados na membrana de células imunes por meio da dieta, aumentam a produção de mediadores anti-inflamatórios, regulando a resposta à inflamação. Além de que os eicosanoides oriundo do ômega 3 apresentam características anti-inflamatórias (PERINI *et al.*, 2010).

Além disso, a alga também é constituída de  $\beta$ -glucano, componente polissacarídeo imunorregulatório, primordial nos processos inflamatórios (KANG; PARK; KIM, 2017), o qual pode estimular a memória imune inata, o que permite maior resposta de monócitos, macrófagos e células natural *Killer* quando em contato com patógenos (OLIVEIRA; VETVICKA; ZANUZZO, 2019).

O  $\beta$ -glucano ainda estimula a produção de interleucina 2, o que também pode resultar no aumento de anticorpos, sendo esta interleucina fundamental para a proliferação e diferenciação de células T, além de ativar células natural *Killer* e citotoxicidade de monócitos (OLIVEIRA; VETVICKA; ZANUZZO, 2019).

O  $\beta$ 1,3-glucano possui, portanto, propriedades imunomoduladoras, sendo reconhecido por receptores da superfície celular em células imunes, constituindo um padrão molecular associado a patógenos, pois quando é reconhecido por macrófagos e células dendríticas, além de outras células imunes, os mesmos são ativados e iniciam uma cascata de sinalização, o que aumenta a fagocitose, apresentação de antígenos, secreção de citocinas, quimiocinas e produção de espécies reativas de oxigênio (LEVINE *et al.*, 2018). Este componente ainda pode aumentar a produção de anticorpos devido à ativação de linfócitos B (MOON *et al.*, 2016).

A *Chlorella* também é constituída de uma substância denominada clorelina, a qual por inibir microrganismos patogênicos, sem causar prejuízos à microbiota intestinal, pode melhorar a saúde das aves (ABDELNOUR *et al.*, 2019). Além disso, a alga é constituída de grandes quantidades de selênio (EL-ABD; HAMOUDA, 2017), mineral essencial importante por contribuir com o aumento da resposta imune às condições de desafios (KARADAS *et al.*, 2016). O selênio pode compor órgãos imunológicos como o timo e o baço, como também pode ser

encontrado em granulócitos, macrófagos, linfócitos (DALGAARD *et al.*, 2018), e pode afetar o crescimento da bursa de Fabricius (YANG *et al.*, 2016).

Este mineral é primordial no desenvolvimento e crescimento de órgãos imunológicos; diretamente relacionado à quantidade de células imunes como linfócitos e fagócitos. Assim, o selênio contribui com o aumento da resposta imune às condições adversas, estando envolvido em respostas imunes inatas, adaptativas, apoptose, regulação, proliferação e diferenciação celular (KHOSO *et al.*, 2019).

A *Chlorella* também possui componentes prebióticos (SAFI *et al.*, 2014; REZVANI; ZAGHARI; MORAVEJ, 2012), o que lhe confere atividade prebiótica (CHOI *et al.*, 2016). Os prebióticos, por estimularem o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, afetam positivamente o sistema imune das aves, pois estas bactérias produzem substâncias imunoestimulatórias (lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicoicos) que estimulam a produção de citocinas, fagocitose macrofágica e síntese de imunoglobulinas. Como também, se ligam a sítios receptores dos macrófagos, os ativando e ativando também a liberação de citocinas, o que estimula a resposta imune adquirida (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

De acordo com An *et al.* (2016), ao analisarem diferentes níveis de suplementação (0,05, 0,15 e 0,5%) de *Chlorella vulgaris* na dieta de frangos de corte, observaram que os níveis de 0,05 e 0,5% da alga ocasionaram aumento da concentração de IgY, e os níveis de 0,05 e 0,15% proporcionaram aumento da concentração de IgM, porém os níveis de IgA não foram afetados, assim como, o peso da Bursa de Fabricius e do baço. O estudo realizado por El-Abd; Hamouda (2017) também demonstra a influência da *Chlorella* no sistema imune, pois ao adicionarem cinco gramas de *Chlorella vulgaris* congelada e descongelada e cinco gramas de *Chlorella* fresca/ litro de água para frangos de corte analisaram que houve efeito significativo para peso do timo.

Kang; Park; Kim (2017) ao testarem 25, 50 e 75 g do subproduto de *Chlorella* (CBP) na ração de frangos de corte verificaram que as concentrações de IgY, IgM e IgA aumentaram com a inclusão de *Chlorella* na dieta, assim como foi encontrado por Kang *et al.* (2013) ao incluírem 1% de *Chlorella vulgaris* na dieta de frangos de corte.

O intestino é o maior órgão imunológico do corpo animal, sendo 25% da sua mucosa composta por tecido linfóide, e estima-se que 70% do sistema imunológico do corpo está localizado no intestino (JOHNSON, 1987). Além disso, o

mesmo é a barreira mais importante que protege o organismo contra toxinas, patógenos, evitando inflamações (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018).

A microbiota intestinal relaciona-se com a defesa imunológica do organismo, logo para que o animal seja capaz de se desenvolver é preciso de uma microbiota equilibrada, sendo os probióticos primordiais ao estímulo da resposta imune por aumentarem a produção de anticorpos e produção de interferon. Também ativam macrófagos, bem como aumentam a quantidade de células T (MONFERDINI; DUARTE, 2010), como os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ANDREATTI FILHO; SAMPAIO, 1999).

O probiótico *Bacillus subtilis* também pode aumentar a função imunológica, pois possibilita a síntese de peptídeos antimicrobianos endógenos (BAI *et al.*, 2016a). As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* podem ser utilizadas como imunomoduladores, estimulando a resposta imune por interagirem com as placas de Peyer e células epiteliais intestinais (COPPOLA; TURNES, 2004).

O uso de *Lactobacillus* também pode estimular a secreção de citocinas por células epiteliais, auxiliando na resposta imune intestinal (BUSANELLO *et al.*, 2012), como IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ , citocinas anti-inflamatórias. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* também podem aumentar citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 liberadas de macrófagos e monócitos, bem como a citocina anti-inflamatória IL-10, a qual é liberada de células dendríticas e monócitos (ADHIKARI; KIM, 2017).

Ainda, a microbiota intestinal por produzir ácidos graxos de cadeia curta (butirato, propionato e acetato), produzidos por bactérias ácido lácticas, contribui para o desenvolvimento da defesa inata e respostas imune adaptativas. Isto ocorre, pois são fundamentais para a renovação e função da barreira do epitélio intestinal, possuindo capacidade de reduzir o pH e exercer função bacteriostática (SUGIHARTO, 2016).

Outro fato que contribui para melhorar o sistema imune é que os probióticos produzem bacteriocinas, que além de atuar inibindo microrganismos nocivos, também reduzem a formação de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF  $\alpha$  (MUHAMMAD; AHMAD; SHAH, 2018).

Os probióticos, quando adicionados à dieta, são transferidos aos linfócitos intra-epiteliais, podendo simular antígenos, e dessa forma estimulam a produção de IgA, por induzirem plasmócitos a secretarem IgA. Ademais, bactérias

ácido lácticas ativam macrófagos e linfócitos, assim como, produção de anticorpos (BUSANELLO *et al.*, 2012).

Assim, com a aderência de bactérias benéficas nas vilosidades do intestino ocorre uma menor degradação das mesmas, sendo que esta degradação é capaz de estimular a imunidade local, o que acarreta na produção de imunoglobulinas que agem na mucosa intestinal, assim evita-se a proliferação de bactérias patogênicas (MACARI; LUNEDO, PEDROSO, 2014).

Ainda, os probióticos podem estimular o desenvolvimento do timo e bursa de Fabricius, importantes órgãos linfoides, o que favorece as aves a apresentarem melhor resposta imunológica quando desafiadas por patógenos (DÍAZ-LÓPEZ; ÁNGEL-ISAZA; ÁNGEL, 2017).

Estudos como o realizado por Bai *et al.* (2018) comprovam o efeito ocasionado pelo probiótico no sistema imune ao incluírem 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 g de *Bacillus subtilis* na dieta de frangos de corte, em que as concentrações das imunoglobulinas IgA e IgY aumentaram, não observando efeito significativo para IgM. Gong *et al.* (2018), ao adicionarem bactérias do gênero *Bacillus* ( $10^8$  UFC) na dieta de frangos de corte, observaram aumento significativo de imunoglobulina da classe IgA, porém também observaram que não houve diferenças significativas para IgY e IgM.

Sikandar *et al.* (2017) observaram que, ao adicionar 0,05 e 0,1 g de *Bacillus subtilis*/kg de ração para frangos de corte inoculados com 5% de hemácia de carneiro e vírus da doença de Newcastle, houve aumento de peso dos órgãos linfoides (timo, baço, bursa de Fabricius). Como também, com 21 dias de idade, não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos para os títulos de anticorpos contra a hemácia de carneiro e o vírus da doença de Newcastle. Com 35 dias de idade as aves que receberam o probiótico apresentaram maior resposta imune humoral para contra o vírus da doença de Newcastle e hemácia de carneiro.

Wu *et al.* (2018), ao avaliarem o efeito de diferentes níveis de *Enterococcus faecium* ( $0,5 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$ ;  $2 \times 10^8$  UFC/kg de ração) na ração de frangos de corte, observaram que as aves alimentadas com  $5 \times 10^7$  UFC de *Enterococcus faecium* apresentaram maior concentração de IgY. As aves alimentadas com  $1 \times 10^8$  e  $2 \times 10^8$  apresentaram maiores títulos de anticorpos contra albumina sérica bovina.

Os autores Hatab, Elsayed e Ibrahim (2016), ao analisarem os efeitos da adição de *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium* (0, 1 e 2 g) na ração de

frangos de corte, observaram que o peso do timo, do baço e da Bursa de Fabricius aumentou nas aves que receberam dois gramas de probiótico. Também relataram que os títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle foram maiores nas aves que receberam o probiótico no 3º, 7º e 9º dia após a vacinação.

Junaid *et al.* (2018), ao adicionarem *Lactobacillus acidophilus* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC) e *Bifidobacterium bifidum* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC/g de ração) na dieta de frangos de corte, verificaram que o peso da bursa de Fabricius foi aumentado e as aves inoculadas com hemácia de carneiro alimentadas com as dietas contendo *Lactobacillus acidophilus* apresentaram maiores títulos de anticorpos contra o antígeno.

Hossain, Begun e Kim (2015) também avaliaram a adição de 0,1% e 0,2% probiótico ( $2 \times 10^8$  UFC de *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* e *Lactobacillus acidophilus*/kg de ração) na dieta de frangos de corte e analisaram que o peso da bursa de Fabricius foi aumentado, não obtendo diferença significativa no peso do baço.

### 3 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**, 4th ed. Philadelphia: **WB Saunders**, p. 553, 2000.
- ABDELNOUR, S. A. *et al.* The application of the microalgae *Chlorella* spp. as a supplement in broiler feed. **World's Poultry Science Journal**, v. 75, n. 2, p. 305-318, 2019.
- ABDULLA, N. R. *et al.* Physico-chemical properties of breast muscle in broiler chickens fed probiotics, antibiotics or antibiotic–probiotic mix. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 64-70, 2018.
- ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**: Relatório Anual 2018.
- ADHIKARI, P. A.; KIM, W. K. Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity—a review. **Annals of animal science**, v. 17, n. 4, p. 949-966, 2017.
- AHMAD, M. T. *et al.* Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, 2018.
- AL-KHALAIFAH, H. S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. **Poultry science**, v. 97, n. 11, p. 3807-3815, 2018.

ALLEGRETTI, L. **Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp.; *Pediococcus* spp. e *Lactococcus* spp. da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, 2009.

ALMEIDA, J.M. *et al.* **Importância da imunidade nas aves the importance of the immunity in poultry**. III Simpósio de Sustentabilidade e Ciência Animal. 2013.

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v.83, p.1093-1098, 2004.

AN, B-K. *et al.* Effect of dried *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* growth factor on growth performance, meat qualities and humoral immune responses in broiler chickens. **Springerplus**, p. 1-7. 2016.

ANANTHI, S. *et al.* In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food And Chemical Toxicology**, v. 48, p.187-192, 2010.

ANDREATTI FILHO, R. L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 2, n. 3, p. 59-71, 1999.

ANTUNES, A. R. **Avaliação do potencial antioxidante de bebidas fermentadas de origem láctea preparadas com *Lactobacillus acidophilus*: uma revisão sistemática**. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

ASGHAR, A. *et al.* Influence of oxidised oil and antioxidant supplementation on membrane bound lipid stability in broiler meat. **Poultry Science**, v.30, p.815–823, 1989.

ATTIA, Y. A. *et al.* Evaluation of the broiler meat quality in the retail market: Effects of type and source of carcasses. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, v.7, p.321–339, 2016.

BAI, K. *et al.* Dietary effects of *Bacillus subtilis* fmbj on growth performance, small intestinal morphology, and its antioxidant capacity of broilers. **Poultry Science**, p. 1-10. 2018.

BAI, K. *et al.* Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, p. 1-9. 2016a.

BAI, W.K. *et al.* Dietary Probiotic *Bacillus subtilis* Strain fmbj Increases Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of Chicken Breast Meat during Storage. **Plos One**, p. 1-17. 2016b.

BARBOSA, F. H. F. *et al.* O gênero *Bifidobacterium*: dominância à favor da vida. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2011.

BASTOS, A.P.A. Imunologia envolvida em aves: Embrapa suínos e aves - artigo em anais de congresso. In: seminário técnico científico de aves e suínos, 16; feira da indústria de produção, processamento e proteína animal - FIPPPA, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Gessulli, p. 1 - 8. 2015.

BENDICH, A. Symposium Conclusions: Biological Actions of Carotenoids. Federation of American Societies for Experimental Biology, Las Vegas. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 135, 1988.

BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. **Journal Foods**, p. 1-34. 2017.

BONOS, E. *et al.* *Spirulina* as a functional ingredient in broiler chicken diets. **South African Journal of Animal Science**, p. 95-102. 2016.

BORDA-MOLINA, D.; SEIFERT, J.; CAMARINHA-SILVA, A. Current perspectives of the chicken gastrointestinal tract and its microbiome. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 16, p. 131-139, 2018.

BORGES, M.C. *et al.* Ácidos graxos polinsaturados ômega-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, p.460-466, dez. 2014.

BOSTAMI, A. B. M. *et al.* Effect of beneficial microorganisms on growth performance, mortality and intestinal microflora in broilers. **Global Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 126-133, 2015.

BUCHON, N. *et al.* Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. **Genes & Development**, v.23, p.2333-2344, 2009.

BUONO, S. *et al.* Functional ingredients from microalgae. **Food & Function**, n. 8, p.1-49, 2014.

BUSANELLO, M. *et al.* Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 4, p. 14-24, 2012.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645-662, 2013.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Interação entre imunidade e nutrição das aves: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Descalvado, v. 24, p.1-20, 2015.

- CHENG, D. *et al.* Dietary *Chlorella vulgaris* ameliorates altered immunomodulatory functions in cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 708, 2017.
- CHENG, J. *et al.* The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1290, 2016.
- CHOI, H. *et al.* Effects of dietary recombinant chlorella supplementation on growth performance, meat quality, blood characteristics, excreta microflora, and nutrient digestibility in broilers. **Poultry Science**, p. 1-7. 2016.
- COPPOLA, M. de M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p.1297-1303, 2004.
- COSTA, F.A.D. *et al.* Enriquecimento com ácidos graxos da série ômega-3 em carne de aves e ovos. **Pubvet**, v. 11, p.113-123, 2017.
- CRUZ, J. P. P.; TEIXEIRA, T.; PAVAN, F. Sistema integrado de produção de frango de corte na região do paraguaçu. **Revista Perspectiva Online: Exatas & Engenharia**, v. 6, p.1-11, 2016.
- CUNNANE, S.C.; ANDERSON, M.J. The Majority of Dietary Linoleate in Growing Rats is  $\beta$ -Oxidized or Stored in Visceral Fat. **The Journal of Nutrition**, p.146-152. 1997.
- DALGAARD, T. S. *et al.* The influence of selenium and selenoproteins on immune responses of poultry and pigs. **Animal feed science and technology**, v. 238, p. 73-83, 2018.
- DALIA, A. M. *et al.* Effects of vitamin E, inorganic selenium, bacterial organic selenium, and their combinations on immunity response in broiler chickens. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 249, 2018.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p.33-40, 2004.
- DELLES, R. M. *et al.* Dietary antioxidant supplementation enhances lipid and protein oxidative stability of chicken broiler meat through promotion of antioxidant enzyme activity. **Poultry Science**, p. 1561-1570. 2014.
- DERAZ, S. F.; ELKOMY, A. E.; KHALIL, A. A. Assessment of probiotic-supplementation on growth performance, lipid peroxidation, antioxidant capacity, and cecal microflora in broiler chickens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. S1, p. 030-039, 2019.
- DERNER, R.B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural**, v. 36, p.1960-1967, 2006.
- DÍAZ-LÓPEZ, E. A.; ÁNGEL-ISAZA, J.; ÁNGEL, D.B. Probióticos en la avicultura: una revisión. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 1, n. 35, p. 175-189, 2017.

DOMINGUES, M. A. F. **Qualidade lipídica da carne de frangos alimentados com ração contendo farelo de coco**. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

DOWARAH, R.; VERMA, A. K.; AGARWAL, N. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: a review. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2017.

DRIESSEN, F.M.; BOER, R. de Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 43, p. 367-382, 1989.

DUBOC, L. H.; MOLLETO, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v.11, p.759-768, 2001.

DUNCAN, H.E.; EDBERG, S.C. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 2, p.85-100, 1995.

EL-ABD, M. N.; HAMOUDA, A. R. Improved productivity and health of broiler chicken by micro green alga *Chlorella vulgaris*. **Asian Journal of Poultry Science**, v. 11, p. 57-63, 2017.

EL-ABD, N. M.; HAMOUDA, R. A.; DAWOUD, G. T. M. Impacts of *Chlorella vulgaris* supplementation to chicken drinking water on amino acids, fatty acids, minerals content of broiler chicken meats. **Egyptian Journal of Nutrition and Feeds**, v. 21, n. 3, p. 595-604, 2018.

ENDO, T.; NAKANO, M. Influence of a probiotic on productivity, meat components, lipid metabolism, caecal flora and metabolites, and raising environment in broiler production. **Nihon Chikusan Gakkaiho**, v. 70, n. 4, p. 207-218, 1999.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**. Arkansas, p. 580-590. 2004.

FABBRI, F. de C. Z. **Os benefícios do ácido graxo e do ômega 3 e 6 na saúde baseados na dieta do mediterrâneo**. 65 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Assis, 2013.

FARIA FILHO, DE *et al* . Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas , v. 8, n. 2, p. 89-98, 2006 .

FERNANDES, D. C. *et al*. Biologia do sistema imune de aves. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 5, p. 131-140, 2013.

FIGUEIREDO JÚNIOR, J.P. *et al*. Caracterização do consumo e perfil do consumidor de frango da cidade de João Pessoa-PB1. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 38, p.153-159, 2017.

FREITAS, H. R. *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids and micronutrients: A brief commentary. **The Open Plant Science Journal**, v. 10, n. 1, 2017.

FU, S. J.; GUO, S. J.; SHEN, Z. Q. Effects of polyunsaturated fatty acids on immune response of avian. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 334-337, 2017.

FU, Z.; SINCLAIR, A.J. Increased  $\alpha$  linolenic acid intake increases tissue  $\alpha$ linolenic acid content and apparent oxidation with little effect on tissue docosahexaenoic acid in the guinea pig. **Lipids**. v.35, p.395-400, 2000.

FUNARI JÚNIOR, P. **Efeitos de diferentes fontes e níveis de selênio sobre o desempenho e a imunidade humoral de frangos de corte**. Dissertação(mestrado)- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2008.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. **Simpósio técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição**, v. 5, p. 6-28, 2004.

GADDE, U. *et al.* Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal health research reviews**, v. 18, n. 1, p. 26-45, 2017.

GALLES, D. P. **Importância da relação dos ácidos graxos ômega-6/ômega-3 na alimentação**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência da Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

GAO, Z. *et al.* Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens. **Animal Nutrition Journal**, v. 3, p.109-113, 2017.

GARCIA, U. S. *et al.* A influência do preço da carne bovina (Boi Gordo) na carne do frango no Brasil, no período de 2007 a 2017. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2018.

GASPAR, C. *et al.* Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 153, 2018.

GADIEV, R. R. *et al.* The use of *Chlorella* in goose breeding. **AIMS Agriculture and Food**, v. 4, n. 2, p. 349, 2019.

GHEISAR, M. M.; HOSSEINDOUST, A.; KIM, I. H. Effects of dietary *Enterococcus faecium* on growth performance, carcass characteristics, faecal microbiota, and blood profile in broilers. **Veterinarni Medicina**, v. 61, n. 1, 2016.

GIAROLA, P. C. M. **Análise da cadeia produtiva avícola de santa catarina**. 2017. 65 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Critical Review - Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **American Institute of Nutrition**, p. 1401-1412, 1995.

GILLILAND, S. E.; WALKER, D. K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. **Journal of dairy science**, v. 73, n. 4, p. 905-911, 1990.

GONG, L. *et al.* Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. **Animal Science Journal**, p. 1-11. 2018.

HABIBIAN, M. *et al.* Selenium as a feed supplement for heat-stressed poultry: a review. **Biological trace element research**, v. 165, n. 2, p. 183-193, 2015.

HAGGARTY P. Fatty acid supply to the human fetus. *Annual Review of Nutrition*, v.30, p. 237-55, 2010.

HAMED, I. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 6, p. 1104-1123, 2016.

HATAB, M. H.; ELSAYED, M. A.; IBRAHIM, N. S. Effect of some biological supplementation on productive performance, physiological and immunological response of layer chicks. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 185-192, 2016.

HAYES, M., *et al.* Microalgal proteins for feed, food and health. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**. Woodhead Publishing, p.347-368, 2017.

HASCÍK, P. *et al.* Fatty acid content in broiler's ross 308 meat muscles after using bee pollen and probiotic as supplementary diet into their feed mixture. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 1, p. 67, 2014.

HOSSAIN, M. M.; BEGUM, M.; KIM, I. H. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. **Veterinarni Medicina**, v. 60, n. 2, p. 77-86, 2015.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343, 2015.

JAHROMI, M. F. *et al.* Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. **International journal of biometeorology**, v. 60, n. 7, p. 1099-1110, 2016.

JENSEN, G.; GINSBERG, D.I.; DRAPEU, C.J. Blue-Green Algae as an Immuno-Enhancer and Biomodulator. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 3, p.24-30, 2001.

JEONG, J.S.; KIM, I.H. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. **Poultry Science**, p. 1-7. 2014.

JOHNSON, D. I. *Enterococcus* spp. In: **Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors**. Springer, Cham, p. 81-91. 2017.

JOHNSON, L.R. Physiology of gastrointestinal tract. **New York: Raven**, 1800p. 1987.

JUNAID, N. *et al.* Production performance, immune response and carcass traits of broiler chickens fed diet incorporated with probiotics. **Indian Journal of Animal Research**, v. 10, 2018.

KADAM, S.U.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.4667–4675, 2013.

KAISER, P. Advances in avian immunology -prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v.39, n.5, p.309-324, 2010.

KANG, H. K.; PARK, S. B.; KIM, C. H. Effects of dietary supplementation with a chlorella by-product on the growth performance, immune response, intestinal microflora and intestinal mucosal morphology in broiler chickens. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 101, n. 2, p. 208-214, 2017.

KANG, H.K. *et al.* Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. **The Journal Of Applied Poultry Research**, p. 101-108. 2013.

KANG, K. S.; COTTRELL, I. W. Polysaccharides in microbial technology. New York: Academic Press, 1979.

KAUD, H.A. Effect of spirulina platensis as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. **Scientific Journal Of Applied Research**, p. 44-48. 2012.

KARADAS, F. *et al.* The effects of different types of antioxidants (Se, vitamin E and carotenoids) in broiler diets on the growth performance, skin pigmentation and liver and plasma antioxidant concentrations. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 18, n. 1, p. 101-116, 2016.

KATIYAR, R. *et al.* Microalgae: an emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 1083-1093, 2017.

KENNETH, G.K. *et al.* The closest living relatives of land plants. **Science**, v.294, p. 2351–2353, 2001.

KHOSO, P. A. *et al.* Selenium deficiency affects immune function by influencing selenoprotein and cytokine expression in chicken spleen. **Biological trace element research**, v. 187, n. 2, p. 506-516, 2019.

KIM, C.H.; KANG, H.K. Effect of dietary supplementation with a chlorella by-product on the performance, immune response and metabolic function in laying hens. **Poultry Science**, p. 1-10. 2015.

KONKOL, D. *et al.* Algae Biomass in Animal Production. In: **Algae Biomass: Characteristics and Applications**. Springer, Cham, p. 123-130. 2018.

KOSMANN, R. C. **Impacto da adição dietética de antibiótico melhorador de desempenho e probiótico sobre a saúde intestinal e diversidade da microbiota intestinal de frangos de corte**. 112 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2018.

KOTRBÁČEK, V.; DOUBEK, J.; DOUCHA, J. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. **Journal Of Applied Phycology**, p. 2173-2180. 2015.

KUMAR, V. *et al.* The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens. **Poultry Science**, n. 88, p. 61-64, 2009.

LAN, R. X.; LEE, S. I.; KIM, I. H. Effects of *Enterococcus faecium* SLB 120 on growth performance, blood parameters, relative organ weight, breast muscle meat quality, excreta microbiota shedding, and noxious gas emission in broilers. **Poultry science**, v. 96, n. 9, p. 3246-3253, 2017.

LAROIA, S.; MARTIN, H. Bifidobacterium as possible dietary adjuncts in cultured dairy products - a review. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 25, n. 4, p. 18-22, 1990.

LEÃO, L.L. *et al.* Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, p.94-100, 2017.

LEE, S.H. *et al.* Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. **Nutrition**, p.175-183. 2010.

LEMOS, M.J. *et al.* Uso de aditivo alimentar equilibrador da flora intestinal em aves de corte e de postura. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, p.1-7, 2016.

LEVINE, R. *et al.* Evaluation of the effects of feeding dried algae containing beta-1, 3-glucan on broilers challenged with *Eimeria*. **Poultry science**, v. 97, n. 10, p. 3494-3500, 2018.

LI, J. L. et al. Effects of different selenium sources on growth performance, antioxidant capacity and meat quality of local Chinese Subei chickens. **Biological trace element research**, v. 181, n. 2, p. 340-346, 2018.

LIMA JÚNIOR, D. M. et al. Alimentos funcionais de origem animal. **Revista Verde (Mossoró–RN–Brasil)** v, v. 6, n. 2, p. 30-40, 2011.

LUO, J. et al. Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*. **Journal of proteomics**, v. 91, p. 226-241, 2013.

MACARI, M.; LUNEDO, M. R.; PEDROSO, A. A. Microbiota intestinal de aves. **Macari, M.; Mendes, AA, Menten, JF; Naas, IA Produção de frangos de corte. 2ª Ed. Campinas: FACTA**, p. 300-319, 2014.

MACARI, M.; FURLAN, R.R.; GONZALES, E. **Fisiologia aplicada a frangos de corte**. 2 ed. São Paulo: FUNEP, 2002.

MADEIRA, M. S. et al. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. **Livestock Science**, v. 205, p. 111-121, 2017.

MAHFUZ, S. U. et al. Inclusion of probiotic on chicken performance and immunity: A review. **International Journal Poultry Science**, v. 16, p. 328-35, 2017.

MALIWAT, G. C. et al. Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). **Aquaculture research**, v. 48, n. 4, p. 1666-1676, 2017.

MANFREDI, D. **Desempenho de frangos de corte suplementados com extrato de algas**. 2014. 32 f. TCC (Graduação) - Curso de Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2014.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p.1-11, 2009.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŹEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. **Journal Of Biological Engineering**, p.1-20. 2018.

MINGMONGKOLCHAI, S.; PANBANGRED, W. Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1334-1346. 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA (Brasil). Projeções do agronegócio 2018/19 a 2028/29. **Projeções de Longo Prazo**, 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA (Brasil). Projeções do agronegócio 2016/2017 a 2026/2027. **Projeções do Agronegócio**, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA (Brasil). **Instrução Normativa, 44 de 15 de dezembro de 2015.**

MIRZA, R. A. Probiotics and Prebiotics for the Health of Poultry. In: **Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety**. Springer, Cham, p. 127-154.2018.

MISRA, A.K.; KUILA, R.K. Bifidus milk: a potential for developing countries. **Indian Dairyman**, v. 43, n.9, p. 390-393, 1991.

MONFERDINI, R.; DUARTE, K. M. R. Uso de probióticos na produção animal. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 944-950, 2010.

MOON, S. H. *et al.* Effect of dietary beta-glucan on the performance of broilers and the quality of broiler breast meat. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 3, p. 384, 2016.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 3, n. 2, 2006.

MORAIS, M. G.,*et al.* Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed research international**, p. 1-15, 2015.

MORONEY, N.C. *et al.* Addition of seaweed (*Laminaria digitata*) extracts containing laminarin and fucoidan to porcine diets: Influence on the quality and shelf-life of fresh pork. **Meat Science**, v. 92, p.423-429, 2012.

MOURA, G. de S. *et al.* Relação ácido araquidônico: ácido docosaexaenóico na composição corporal de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo a microalga *Schizochytrium sp.* 2015.

MOUSAVI, S. M. A. A.; HOSSEINI, H. M.; MIRHOSSEINI, S. A. A Review of Dietary Probiotics in Poultry. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 5, n. 2, p. 48-54, 2018.

MUHAMMAD, I.; AHMAD, A. A.; SHAH, T. Health Promoting and Disease Preventing Properties of Probiotics with Special Reference to Lactobacillus: A Review. **Journal of Probiotics & Health**, v. 6, n. 202, p. 2, 2018.

MUSZYŃSKA, B. *et al.* Bioaccessibility of phenolic compounds, lutein, and bioelements of preparations containing *Chlorella vulgaris* in artificial digestive juices. **Journal Of Applied Phycology**, p. 1-12. 2018.

NADRUZ JÚNIOR, W. Diagnóstico e tratamento dos fatores de risco. **Comciência**, n. 109, p.1-3, 2009

NEUMANN, C.; VELTEN, S.; LIEBERT, F. Improving the Dietary Protein Quality by Amino Acid Fortification with a High Inclusion Level of Micro Algae ( *Spirulina platensis* ) or Insect Meal (*Hermetia illucens* ) in Meat Type Chicken Diets. **Journal of Animal Sciences**, p. 12-26. 2018.

NÉVOA, M.L. *et al.* Antimicrobianos e prebióticos nas dietas de animais não ruminantes. **Revista Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, p.85-95, 2013.

NICOLETTI, M. Microalgae nutraceuticals. **Foods**, v. 5, n. 3, p. 54, 2016.

NOVELLO, D. *et al.* Avaliação bromatológica e perfil de ácidos graxos da carne de frangos de corte alimentados com rações contendo farinha de peixe ou aveia-branca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 9, p. 1660-1668, 2008.

OECD/FAO. **OECD-FAO agricultural outlook: 2014-2023**. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) and The Food and Agriculture Organization (FAO) of The United Nations, 2016.

OGNIK, K. *et al.* The effect of a probiotic containing *Enterococcus faecium* DSM 7134 on redox and biochemical parameters in chicken blood. **Annals of animal science**, v. 17, n. 4, p. 1075-1088, 2017.

OH, S. T. *et al.* Effects of dietary fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 1, p. 95, 2015.

OLIVEIRA, C. A.F.; VETVICKA, V.; ZANUZZO, F. S.  $\beta$ -Glucan successfully stimulated the immune system in different jawed vertebrate species. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 62, p. 1-6, 2019.

OLIVEIRA, M.D. *et al.* Aditivos alternativos na alimentação de aves. **Pubvet**, v. 6, p.1-32, 2012.

PAKRAVAN, S. *Et al.* *Chlorella vulgaris* meal improved growth performance, digestive enzyme activities, fatty acid composition and tolerance of hypoxia and ammonia stress in juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p.594-604, 2017.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut microbes**, v. 5, n. 1, p. 108-119, 2014.

PARK, J H; LEE, S I; KIM, I H. Effect of dietary *Spirulina (Arthrospira) platensis* on the growth performance, antioxidant enzyme activity, nutrient digestibility, cecal microflora, excreta noxious gas emission, and breast meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, p. 1-9. 2018.

PARK, J.H.; KIM, I.H. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. **Poultry Science**, p. 2054-2059. 2014.

PARK, Y. H. *et al.* Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. **Korean journal for food science of animal resources**, v. 36, n. 5, p. 567, 2016.

PASARIN, D.; ROVINARU, C. Sources of carotenoids and their uses as animal feed additives-a review. **Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science**, v. 61, n. 2, 2018.

PATEL, A.; PRAJAPAT, J. B. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Advances in Dairy Research**, p. 1-8, 2013.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review, **3 Biotech**, v. 2, p. 115–125, 2012.

PEDERSOLI, A.G.A. *et al.* Ômega - 3 e redução dos triglicerídeos no paciente com doença cardiovascular. **Revista Saber Científico**, v. 4, p.46-51, 2015.

PERINI, J. A. de L.*et al.* Ácidos graxos polinsaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de nutrição**, p. 1075-1086, 2010.

POPOVA, T. Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. **Current opinion in food science**, v. 14, p. 72-77, 2017.

POTENÇA, A. *et al.* Perfil lipídico e maciez da carne de coxa e sobrecoxa de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes fontes lipídicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1774-1783, 2010.

POURAKBARI, M. *et al.* Probiotic level effects on growth performance, carcass traits, blood parameters, cecal microbiota, and immune response of broilers. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 2, p. 1011-1021, 2016.

PRABAKARAN, G. *et al.* Evaluation of Chemical Composition and In Vitro Antiinflammatory Effect of Marine Microalgae *Chlorella vulgaris*. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-8, 2018.

QUIGLEY, E. M. M. Bifidobacterium bifidum. In: **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology**. Academic Press, p. 131-133. 2017.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RANI, K.; SANDAL, N.; SAHOO, P. K. A comprehensive review on chlorella-its composition, health benefits, market and regulatory scenario. **The Pharma Innovation Journal**, p. 584-589, 2018.

RAYMUNDO, M. DOS S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p.496-503, 2004.

REDONDO, N. C. **Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp jugurti**

416. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

REZVANI, M.; ZAGHARI, M.; MORAVEJ, H. A survey on *Chlorella vulgaris* effect's on performance and cellular immunity in broilers. **International Journal of Agricultural Science and Research**, v. 3, p. 9-15, 2012.

RONDÓN, E. O. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 239-252, 2008.

RUAS-MADIEDO, P. *et al.* Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. **Journal of food protection**, v. 69, n. 8, p. 2011-2015, 2006.

RULE, D.C. *et al.* Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk, and chicken. **Journal Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1202-1211, 2002.

SAFI, C. *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SALVIA, S. *et al.* The Optimizing of Growth and Quality of *Chlorella vulgaris* as asuh feed supplement for Broiler. **International Journal On Advanced Science Engineering Information Technology**, p. 90-93. 2014.

SANTOS, J. S. **Fatores dietéticos que afetam a saúde intestinal e a colonização de microrganismo**. 34 f. Seminário (Doutorado) – Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

SCHAICH, K. M. Lipid oxidation: Theoretical aspects. **Bailey's industrial oil and fat products**. 6th ed., vol. 1, p. 269–356. 2005.

SCHMIDT, N. S.; SILVA, C. L. da. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 3, p. 467-482, 2018.

SEDIGHI, M. *et al.* Potential Health Effects of Enzymatic Protein Hydrolysates from *Chlorella vulgaris*. **Applied Food Biotechnology**, p. 160-169. 2016.

SHANMUGAPRIYA, B. *et al.* Dietary administration of spirulina platensis as probiotics on growth performance and histopathology in broiler chicks. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 6, p. 2650-2653, 2015.

SHARMA, R. *et al.* Microbial and functional feed supplement to improve livestock and poultry productivity with special reference to synbiotics: a review. **The Pharma Innovation Journal**, v.7, p. 62-68, 2018.

SIKANDAR, A. *et al.* Growth performance, immune status and organ morphometry in broilers fed *Bacillus subtilis*-supplemented diet. **South African Journal Of Animal Science**, v. 47, p.379-388, 2017.

SILVA, J. *et al.* Chlorella. In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, p. 187-193, 2019.

SILVA, T. M. **Microencapsulação de Bifidobacterium lactis e Lactobacillus acidophilus por coacervação complexa: estudo da produção, caracterização e viabilidade**. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 2016.

SILVA, A. da L. **Aditivos fitogênicos na dieta de frangos de corte: desempenho, qualidade de carne e estabilidade oxidativa da carne e sangue**. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

SILVA, M.L.C. *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p.669-681, 2010.

SILVA, L. P. da; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.

SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS NA AVICULTURA. **II Simpósio de Sanidade Avícola**, p. 45, 2000..

SOUZA, L. F. *et al.* Probiotics on performance, intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens raised with lower or higher environmental challenge. **Austral journal of veterinary sciences**, v. 50, n. 1, p. 35-41, 2018.

SUGIHARTO, S. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 2, p. 99-111, 2016.

SUGIHARTO, S.; LAURIDSEN, C. Dietary *Chlorella* supplementation effect on immune responses and growth performances of broiler chickens exposed to post hatch holding time. **Livestock Research for Rural Development**, 2016.

SUGIHARTO; HENCKEL, P.; LAURIDSEN, C. Fatty acids profile of meat, mucosal siga concentration and production index of broiler as a response to *Chlorella sp.* administration in the diet. **Journal Of The Indonesian Tropical Animal Agriculture**, p. 172-178. 2010.

SURAI, P. F.; FISININ, V. I.; KARADAS, F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016.

ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WŁOSEK, A.; JÓZEFIAK, D. Application of microalgae biomass in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, p. 663-672. 2015.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C. Enterococcus. In: **Molecular Typing in Bacterial Infections**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 17-26. 2013.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

TOGASHI, C. K. *et al.* Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 2063-2068, 2007.

TORRES-RODRIGUEZ, A. *et al.* Performance and condemnation rate analysis of commercial turkey flocks treated with a Lactobacillus spp.-based probiotic. **Poultry Science**, v. 86, p. 444-446, 2007.

TRAESEL, C. K. *et al.* Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, p.278-284, 2011.

TRAVASSOS, G. F.; COELHO, A. B. Padrão de Substituição entre Carnes no Consumo Domiciliar do Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, p.285-304, 2017.

UBABEF – **União Brasileira de Avicultura: Relatório Anual 2014**.

USDA. **USDA Foreign Agricultural Service**. United States Department of Agriculture (USDA), 2019.

VAQUERO, M.G.; HAYES, M. Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development. **Journal Food Reviews International**, p. 1-72. 2015.

VASILCHENKO, A. S.; ROGOZHIN, E. A.; VALYSHEV, A. V. Purification of a novel bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* ICIS 8 and characterization of its mode of action. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 4, p. 447-456, 2017.

VIECO-SAIZ, N. *et al.* Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 57, 2019.

WARNER, R. D. *et al.* Effects of nitric oxide and oxidation *in vivo* and *post mortem* on meat tenderness. **Meat Science**, Barking, v. 71, p. 205-217, 2005.

WU, Y. *et al.* Effects of dietary *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 supplementation on growth performance and cellular and humoral immune responses in broiler chickens. **Poultry science**, v. 98, n. 1, p. 150-163, 2018.

WULFF, K. N. G. **Probióticos a base de *Bacillus spp.* na cama e na ração de frangos de corte**. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2015.

YAN, L.; LIM, S.U.; KIM, I.H. Effect of fermented *Chlorella* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbial and fecal noxious gas content in growing pigs. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 25, p.1742–1747, 2012.

YANG, Z. *et al.* Selenium deficiency mainly influences antioxidant selenoproteins expression in broiler immune organs. **Biological trace element research**, v. 172, n. 1, p. 209-221, 2016.

ZHANG, L. *et al.* Effects of pre-encapsulated and pro-encapsulated *Enterococcus faecalis* on growth performance, blood characteristics, and cecal microflora in broiler chickens. **Poultry science**, v. 94, n. 11, p. 2821-2830, 2015.

ZHANG, Z. F.; KIM, I. H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry science**, v. 93, n. 2, p. 364-370, 2014.

ZHENG, A. *et al.* Probiotic (*Enterococcus faecium*) induced responses of the hepatic proteome improves metabolic efficiency of broiler chickens (*Gallus gallus*). **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 89, 2016.

ZHENG, A. *et al.* Proteome changes underpin improved meat quality and yield of chickens (*Gallus gallus*) fed the probiotic *Enterococcus faecium*. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1167, 2014.

ZHENG, L. *et al.* The Dietary Effects of Fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on Production Performance, Liver Lipids and Intestinal Microflora in Laying Hens. **Asian-australasian Journal Of Animal Sciences**, p. 261-266. 2012.

ZHU, W. *et al.* Effects of polymannuronate on performance antioxidant capacity, immune status cecal microflora, and volatile fatty acids in broiler chickens. **Poultry Science**, v.94, n.3, p.345-352, 2015.

#### 4 HIPÓTESE

Os constituintes da microalga *Chlorella vulgaris* e a ação protetora concedida pelo probiótico (*Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus subtilis*) na microbiota intestinal podem melhorar o desempenho zootécnico, o sistema imunológico, as características de carcaça e a qualidade da carne de frangos de corte.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inclusão da farinha de microalga *Chlorella vulgaris* associada ou não ao probiótico (*Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus subtilis*) sobre as características produtivas, imunológicas e qualidade da carne de frangos de corte.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o desempenho zootécnico (consumo de ração, conversão alimentar, ganho de peso, viabilidade criatória e índice de eficiência produtiva) de frangos alimentados com dietas adicionadas com diferentes níveis da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico;

Avaliar o rendimento de carcaça e cortes (perna, asas, dorso e peito) de frangos alimentados com dietas adicionadas com diferentes níveis da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico;

Analisar o peso relativo dos órgãos linfoides (baço e bursa de Fabricius), os títulos de anticorpos naturais e específicos de frangos alimentados com dietas adicionadas com diferentes níveis da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico.

Analisar a qualidade de carne do peito (pH, cor, capacidade de retenção de água, perdas de peso por cocção, força de cisalhamento, oxidação lipídica e perfil de ácidos graxos) de frangos alimentados com dietas adicionadas com diferentes níveis da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico.

## 6 ARTIGO 1 - CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS E QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS ADICIONADAS DE FARINHA DE MICROALGA (*Chlorella vulgaris*) E PROBIÓTICO

### PRODUCTIVE CHARACTERISTICS AND MEAT QUALITY OF BROILER CHICKENS FED DIETS WITH MICROALGAE FLOUR (*Chlorella vulgaris*) AND PROBIOTIC

#### RESUMO

A microalga *Chlorella vulgaris* por possuir constituintes com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, e o probiótico, importante por manter a microbiota intestinal equilibrada, podem ser utilizados para melhorar a produção animal e a qualidade do produto final. Objetivou-se avaliar a adição de diferentes níveis de inclusão de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico sobre as características produtivas e qualidade da carne de frangos de corte. Foram utilizados 1.040 pintainhos de corte machos da linhagem Cobb, com um dia de idade, por um período de 42 dias. Os tratamentos experimentais consistiam na adição de diferentes níveis de inclusão da farinha de microalga *Chlorella vulgaris* (0; 0,25; 0,50 e 1%) associados ou não (0,02%) ao probiótico ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g de *Bifidobacterium bifidum*,  $2,6 \times 10^9$  UFC/g de *Enterococcus faecium*,  $1,3 \times 10^9$  UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* e  $3,6 \times 10^9$  UFC/g de *Bacillus subtilis*). Foi adotado um delineamento em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4X2 (níveis da inclusão de *Chlorella vulgaris* x inclusão ou não de probiótico). Os resultados mostram que na fase pré-inicial a adição de *Chlorella vulgaris* proporcionou melhora linear na conversão alimentar, quando associada ao probiótico aumentou linearmente o ganho de peso e ocasionou efeito quadrático quando não associada. A dieta com apenas probiótico proporcionou menor ganho de peso. No período de um a 35 dias e no período total de criação o probiótico melhorou a conversão alimentar. Foi observada interação entre o nível de 0,25% de *Chlorella vulgaris* e probiótico no período total de criação, aumentando o Índice de Eficiência Produtiva. A adição de *Chlorella vulgaris* aumentou linearmente a intensidade de amarelo e o teor de ácido  $\alpha$ -linolênico, efeito quadrático para o teor de ácido araquidônico e efeito linear decrescente sobre a relação ômega 6/ômega 3. A adição de probiótico reduziu a capacidade de retenção de água, sem comprometer os demais parâmetros de qualidade da carne, e aumentou o teor de ácido araquídico. Conclui-se que a microalga *Chlorella vulgaris* ocasionou melhora no desempenho na fase pré-inicial, contribuiu com a relação ômega 6/ômega 3, como corante natural, por aumentar a intensidade de amarelo na carne de peito, e com o aumento do teor de ácido  $\alpha$ -linolênico e ácido araquidônico, não comprometendo a estabilidade oxidativa da carne. O probiótico melhorou o desempenho de um a 35 dias e no período total de criação. A interação de 0,25% de *Chlorella vulgaris* com probiótico foi benéfica à produtividade das aves, e com 1% de inclusão da alga na ração houve aumento de ácidos graxos polinsaturados da família ômega 3 e ômega 6 na carne.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos polinsaturados. Aditivos. Aves. Desempenho.

## ABSTRACT

The microalgae *Chlorella vulgaris* for having constituents with antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties, and the probiotic, important for keeping the intestinal microbiota balanced, can be used to improve the intestinal microbiota, and the quality of the final product. The objective was to evaluate the addition of different levels of inclusion of flour from the microalgae *Chlorella vulgaris* associated or not to the probiotic on the productive characteristics and quality of meat of broilers. A total of 1,040 one-day-old male Cobb broiler chicks were used for a period of 42 days. The experimental treatments consisted of the addition of different levels of inclusion of flour from the microalgae *Chlorella vulgaris* (0, 0.25, 0.50 and 1%) associated or not (0.02%) with probiotic ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g of *Bifidobacterium bifidum*,  $2,6 \times 10^9$  UFC/g of *Enterococcus faecium*,  $1,3 \times 10^9$  UFC/g of *Lactobacillus acidophilus* and  $3,6 \times 10^9$  UFC/g of *Bacillus subtilis*). A randomized block design in a 4X2 factorial arrangement (levels of *Chlorella vulgaris* inclusion x inclusion or not of probiotic) was adopted. The results show that in the pre-initial phase the addition of *Chlorella vulgaris* provided a linear improvement in feed conversion, when associated with the probiotic, linearly increased the weight gain and caused a quadratic effect when not associated. The diet with only probiotic provided less weight gain. In the period of one to 35 days and in the total breeding period, the probiotic improved the feed conversion. An interaction was observed between the level of 0.25% of *Chlorella vulgaris* and probiotic in the total breeding period, increasing the Productive Efficiency Index. The addition of *Chlorella vulgaris* linearly increased the yellow intensity and the content of  $\alpha$ -linolenic acid, a quadratic effect for the content of arachidonic acid and a decreasing linear effect on the omega 6/omega 3 ratio. The addition of probiotic reduced the water retention capacity, without compromising the other meat quality parameters, and increased the arachidic acid content. It is concluded that the microalgae *Chlorella vulgaris* caused an improvement in performance in the pre-initial phase, contributed to the omega 6 / omega 3 ratio, as a natural dye, by increasing the intensity of yellow in the breast meat, and with the increase in the content of  $\alpha$ -linolenic acid and arachidonic acid, without compromising the oxidative stability of the meat. The probiotic improved the performance of one to 35 days and in the total breeding period. The interaction of 0.25% of *Chlorella vulgaris* with probiotic was beneficial to the productivity of the birds, and with 1% of inclusion of the algae in the diet there was an increase of polyunsaturated fatty acids of the omega 3 and omega 6 family in the meat.

**Key words:** Polyunsaturated fatty acids. Additions. Birds. Performance.

## Introdução

O setor avícola tem buscado por alternativas nutricionais que melhorem a produção e a saúde animal (KAOUD, 2012). Neste aspecto, há a incorporação de aditivos naturais e funcionais nas rações, pois são constituídos de substâncias benéficas com funções antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (HAYES *et al.*, 2017). Além de que os aditivos podem contribuir com

os processos metabólicos e digestibilidade dos nutrientes (GADIEV *et al.*, 2019), sendo estes, segundo a Instrução Normativa 44 de 15 de dezembro de 2015, substâncias, microrganismos ou produto formulado adicionado intencionalmente, possuindo ou não valor nutritivo, que melhoram as características dos produtos destinados à alimentação animal, estando diretamente relacionados com a saúde e produção animal (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018).

As microalgas, organismos unicelulares microscópicos, podem ser utilizadas como aditivo em rações (ŚWIAŹKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JÓZEFIAK, 2015), sendo as microalgas verdes da classe *Chlorophyceae* as mais relevantes na nutrição (ABDELNOUR *et al.*, 2019), como a *Chlorella vulgaris* (PRABAKARAN *et al.*, 2018). Esta alga se caracteriza pelo seu elevado potencial de crescimento (KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015), adaptabilidade às condições ambientais (SALVIA *et al.*, 2014) e alta produtividade (AN *et al.*, 2016). Além disso, é utilizada como um alimento funcional devido aos seus componentes (OH *et al.*, 2015), que exercem atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (PRABAKARAN *et al.*, 2018), ocasionando assim benefícios à produção e saúde animal e, conseqüentemente, à qualidade do produto final (MADEIRA *et al.*, 2017).

A *Chlorella vulgaris* é constituída por alto teor de proteína, polissacarídeos, minerais, vitaminas (PRABAKARAN *et al.*, 2018), ácidos graxos polinsaturados (FREITAS, 2017), pigmentos carotenoides (PASARIN; ROVINARU, 2018; SILVA *et al.*, 2019), compostos fenólicos (MUSZYŃSKA *et al.*, 2018), fibras (KIM; KANG, 2015) e ainda tem atividade prebiótica (CHOI *et al.*, 2016) aumentando a diversidade microbiana benéfica do trato digestório (EL-ABD; HAMOUDA, 2017). Portanto, ocasiona benefícios fisiológicos, antioxidantes, bioquímicos (LEE *et al.*, 2010), imunológicos, no crescimento e produtividade das aves (KIM; KANG, 2015).

Outro aditivo de interesse é o probiótico por ser um produto natural, seguro e não tóxico (BAI *et al.*, 2018), composto de culturas únicas ou mistas de microrganismos vivos (ADHIKARI; KIM, 2017) não patogênicos, que mantêm o equilíbrio da microbiota intestinal, e beneficiam a saúde do hospedeiro (WU *et al.*, 2018). Diversas espécies são utilizadas como probióticos, entre elas *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* (SUGIHARTO, 2016), *Bacillus subtilis* e *Bifidobacterium bifidum* (LUO *et al.*, 2013).

O uso de probiótico na nutrição animal é benéfico devido a sua capacidade de inibir o desenvolvimento de patógenos, por manter equilibrada a microbiota intestinal, promovendo melhora na produtividade (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018). Ainda, o probiótico ativa o sistema imunológico, aumenta a atividade de enzimas digestivas (MOUSAVI; HOSSEINI; MIRHOSSEINI, 2018), afetando positivamente a absorção de nutrientes (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018), melhora a capacidade antioxidante dos animais (GONG *et al.*, 2018) e a qualidade da carne (LAN; LEE; KIM, 2017).

A *Chlorella vulgaris* e o probiótico podem contribuir, portanto, com a produtividade das aves, sendo alternativas viáveis aos antibióticos, já que o setor avícola tem buscado por produtos naturais, seguros e não tóxicos (BAI *et al.*, 2018), pois o uso excessivo de antibióticos pode desencadear o desenvolvimento de bactérias resistentes, com desequilíbrio da microbiota intestinal (KAOUD, 2012), e deixar resíduos na carne (FARIA FILHO *et al.*, 2006). Assim como, alternativas ao uso de antioxidantes sintéticos, visto que os mesmos possuem potencial carcinogênico (LEÃO *et al.*, 2017).

Assim, objetivou-se avaliar as características produtivas e de qualidade da carne de frangos de corte alimentados com dietas adicionadas de diferentes níveis de inclusão da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico (*Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis*).

## Material e métodos

No experimento, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), protocolo CEUA 10985.2019.33, foram utilizados 1.040 pintainhos de corte machos de um dia de idade da linhagem Cobb, os quais foram criados por um período de 42 dias. Este período foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 35 dias de idade) e terminação (36 a 42 dias de idade).

As aves foram alojadas em boxes com dimensões de 2,10m<sup>2</sup>, em uma densidade de 12 aves por m<sup>2</sup>. O manejo que as mesmas receberam era semelhante às granjas comerciais, com água e ração *ad libitum* durante todo período

experimental. As rações experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja atendendo as exigências mínimas preconizadas por Rostagno *et al.* (2017). A composição percentual e calculada das rações experimentais é apresentada na Tabela 1.

Os tratamentos experimentais consistiam em dietas adicionadas de diferentes níveis de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* (0; 0,25; 0,50 e 1%) associados ou não (0,02%) ao probiótico (*Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis*). Para a formulação das rações experimentais, a composição nutricional da farinha da microalga *Chlorella vulgaris* (Tabela 2) foi considerada. O probiótico utilizado, de origem comercial, era constituído de *Bacillus subtilis* ( $3,6 \times 10^9$  UFC/g); *Bifidobacterium bifidum* ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g); *Enterococcus faecium* ( $2,6 \times 10^9$  UFC/g) e *Lactobacillus acidophilus* ( $1,3 \times 10^9$  UFC/g) e foi incluído na formulação como inerte, já que não possui valor nutricional, na quantidade recomendada pelo fabricante.

**Tabela 1** - Composição percentual e calculada das rações experimentais nas diferentes fases de criação.

Fases de criação	Pré-inicial				Inicial				Crescimento				Terminação			
Níveis <i>Chlorella vulgaris</i> (%)	0	0,25	0,50	1	0	0,25	0,50	1	0	0,25	0,50	1	0	0,25	0,50	1
<b>Ingredientes</b>																
Milho grão	51,69	51,89	52,09	52,48	53,94	54,13	54,33	54,72	61,44	61,64	61,83	62,23	67,90	68,10	68,29	68,69
Farelo de soja 46%	41,98	41,62	41,25	40,53	39,50	39,14	38,77	38,04	32,14	31,78	31,41	30,68	26,61	26,25	25,88	25,15
Calcário	0,94	0,95	0,96	0,98	0,86	0,87	0,88	0,90	0,74	0,75	0,76	0,78	0,71	0,72	0,73	0,75
Fosfato bicálcico	1,80	1,79	1,78	1,76	1,58	1,57	1,56	1,54	1,39	1,38	1,37	1,35	1,00	0,99	0,98	0,96
Óleo de soja	2,09	2,01	1,92	1,76	2,75	2,67	2,59	2,42	2,96	2,88	2,80	2,63	2,53	2,45	2,37	2,20
Sal comum	0,53	0,53	0,53	0,53	0,51	0,51	0,51	0,51	0,48	0,48	0,48	0,48	0,45	0,45	0,45	0,45
<sup>1</sup> Suplemento vitam. + min.	0,50	0,50	0,50	0,50	0,40	0,40	0,40	0,40	0,35	0,35	0,35	0,35	0,30	0,30	0,30	0,30
DL-Metionina	0,25	0,24	0,24	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23	0,21	0,21	0,20	0,20	0,18	0,18	0,18	0,18
L-Lisina HCL	0,14	0,13	0,13	0,13	0,15	0,15	0,14	0,14	0,21	0,21	0,20	0,20	0,24	0,23	0,23	0,22
L-Treonina	0,06	0,07	0,07	0,08	0,06	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,09	0,06	0,07	0,08	0,09
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,00	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00
Inerte/probiótico	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total (kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Composição nutricional calculada</b>																
Cálcio (%)	0,97	0,97	0,97	0,97	0,88	0,88	0,88	0,88	0,76	0,76	0,76	0,76	0,63	0,63	0,63	0,63
Energia metab. (kcal/kg)	2,975	2,975	2,975	2,975	3,050	3,050	3,050	3,050	3,150	3,150	3,150	3,150	3,200	3,200	3,200	3,200
Fósforo disp. (%)	0,46	0,46	0,46	0,46	0,42	0,42	0,42	0,42	0,37	0,37	0,37	0,37	0,30	0,30	0,30	0,30
Lisina total (%)	1,44	1,44	1,44	1,44	1,38	1,38	1,38	1,38	1,24	1,24	1,24	1,24	1,12	1,12	1,12	1,12
Metionina total (%)	0,59	0,59	0,59	0,59	0,57	0,57	0,57	0,57	0,51	0,51	0,51	0,51	0,46	0,46	0,46	0,46
Treonina total (%)	0,99	0,99	0,99	0,99	0,96	0,96	0,96	0,96	0,86	0,86	0,86	0,86	0,77	0,77	0,77	0,77
Proteína bruta (%)	24,27	24,27	24,27	24,27	23,31	23,31	23,31	23,31	20,58	20,58	20,58	20,58	18,57	18,57	18,57	18,57
Sódio (%)	0,23	0,23	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico+mineral, quantidade/kg de ração: vit. A – 2.758.000UI/kg; vit. E – 689.000UI/kg; vit. B1 – 608mg/kg; vit. B2 – 1.655mg/kg; vit. B6 – 819mg/kg; vit. B12 – 4.150mcg/kg; vit. K3 – 537mg/kg; vit. D3 – 689UI/kg; pantotenato cálcio – 3.230mg/kg; niacina – 9.800mg/kg; ácido fólico – 200mg/kg; biotina – 20mg/kg; zinco – 12g/kg; ferro – 12g/kg; manganês – 14g/kg; cobre – 3.120mg/kg; iodo – 252mg/kg; cobalto – 76mg/kg; selênio – 75mg/kg; etoxiquim – 52mg/kg; B.H.A. – 40mg/kg; veículo Q. S. P. – 1.000mg/kg.

**Tabela 2** - Composição nutricional da microalga *Chlorella* em pó.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Matéria seca (%)	94,80
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.720
Proteína bruta (%)	60,60
Gordura (%)	12,80
Fibra bruta (%)	13,00
Cinzas (%)	4,50
Lisina (%)	4,88
Metionina (%)	1,20
Cálcio (%)	0,01
Fósforo (%)	1,06

**Fonte:** Kang *et al.* (2013, p.102 )

No final de cada fase de criação, os parâmetros de desempenho zootécnico, consumo de ração/ave; ganho de peso/ave e conversão alimentar, foram determinados, sendo as aves e as rações pesadas no início e final de cada fase. A viabilidade criatória foi determinada utilizando-se a fórmula: VC (%) = (número total de animais existentes/ número de animais alojados com um dia de idade) x 100 e o índice de eficiência produtiva foi calculado por meio da fórmula: IEP =(ganho de peso diário (kg) x viabilidade criatória (%)/ conversão alimentar) x100.

Aos 43 dias de idade, duas aves que representavam o peso médio da parcela experimental foram submetidas a um período de jejum pré-abate de oito horas. Em seguida, as aves foram pesadas individualmente na plataforma de abate, insensibilizadas eletricamente por meio do aparelho da marca Fluxo, modelo FX 2.0, (Chapecó, Brasil), no qual foram expostas por dez segundos a 42 volts e 800 Hertz e posteriormente, sangradas, escaldadas, depenadas e evisceradas.

Em seguida, as carcaças foram submetidas a cortes comerciais de peito, asas, dorso e pernas (coxa e sobrecoxa) a fim de determinar o rendimento de carcaça e cortes. Para obter o rendimento de carcaça considerou-se a relação entre o peso da carcaça sangrada, depenada e eviscerada, sem cabeça, pescoço e pés, e o peso vivo de abate. Os rendimentos dos cortes de peito, pernas (coxa + sobrecoxa), dorso e asas foram determinados em relação ao peso da carcaça eviscerada (MOREIRA *et al.*, 2004).

Para a realização das análises de qualidade de carne utilizou-se 144 amostras do músculo *pectoralis major*, sendo 16 amostras por tratamento, que após serem coletadas, foram resfriadas em solução de água com gelo e armazenadas a

4°C por 24 horas para a realização das seguintes análises de qualidade de carne: pH, cor, capacidade de retenção de água (CRA), perdas de água durante a cocção e força de cisalhamento.

O pH das amostras do músculo *Pectoralis major* foi aferido em duplicata por meio da inserção do eletrodo na parte crânio dorsal do músculo, usando um potenciômetro modelo 205, Testo AG (Lenzkirch, Alemanha), conforme procedimento realizado por Bridi *et al.* (2012).

As medidas de cor foram realizadas em triplicata, na superfície dorsal do músculo *pectoralis major*, em três diferentes pontos (OLIVIO *et al.*, 2001). Para esta análise utilizou-se o colorímetro Konica Minolta CR 10 (Osaka, Japão) e os resultados foram expressos em L\* (luminosidade), a\*(componente vermelho-verde) e b\*(componente amarelo-azul), conforme o sistema CIE L\*a\*b\* de cores.

A análise de CRA foi realizada em duplicata, avaliada conforme a metodologia descrita por Hamm (1961), em que foram pesados 2,0 g ( $\pm 0,10$  g) de amostra da parte cranial do músculo *Pectoralis major*. Após cortadas, as amostras foram colocadas entre dois papéis filtros e posteriormente colocadas entre duas placas de acrílico, sobre as quais depositou-se um peso de 10kg, permanecendo assim por cinco minutos. Em seguida, as amostras foram pesadas novamente e então a CRA foi determinada pela porcentagem de água exsudada por meio da seguinte equação:

$$CRA = 100 - [(P_i - P_f / P_i) \times 100]$$

Em que: P<sub>i</sub> e P<sub>f</sub> são os pesos iniciais e finais das amostras, respectivamente.

Para determinar a perda de água durante a cocção, foram pesadas aproximadamente 90 g de carne de peito em balança semi-analítica, embaladas em sacos plásticos, e depois imersas em banho-maria a 85°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram retiradas do banho e resfriadas em temperatura ambiente e novamente pesadas, sendo que a diferença entre o peso inicial e final das amostras correspondeu às perdas durante a cocção, de acordo com Cason; Lyon; Papa (1997).

As amostras de carne do peito anteriormente cozidas, usadas na análise de determinação das perdas por cocção, foram utilizadas para determinar a força de cisalhamento, em que foram cortadas, no sentido das fibras, em pedaços de

1x1x2 cm<sup>3</sup> para altura, largura e comprimento, respectivamente. Em seguida, foram submetidas ao texturômetro universal TA-XT2i, no qual as amostras foram dispostas com as fibras orientadas no sentido perpendicular à lâmina Warner-Bratzler e determinou-se a força máxima necessária para efetuar seu corte, como descrito por Froning; Babji; Mather (1978), sendo a força máxima necessária para efetuar os cortes expressa em Newton.

Para a análise de oxidação lipídica, realizada segundo metodologia proposta por Mendes; Cardoso; Pestana (2009), amostras do peito foram armazenadas por 60 dias a -20°C. Foram pesados 10 g de amostra para posterior homogeneização com 15 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% em turrax por um minuto (7000 rpm) para posterior centrifugação por 10 minutos (6000 rpm a 20°C). O sobrenadante foi filtrado e alíquotas de 5 mL foram coletadas e nestas foram adicionadas 5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após, a solução foi inserida em banho-maria a 100°C por 35 minutos. Depois de resfriadas, foram medidas em espectrofotômetro a 532 nm, e os resultados foram expressos em mg de MDA/kg de amostra, segundo a curva padrão  $y = 1,565.10^8x + 0,0017$  ( $R^2 = 0,9991$ ).

O perfil de ácidos graxos da carne do peito foi avaliado por meio de cromatografia gasosa com coluna capilar e detector de chama, sendo a extração de lipídios realizada conforme metodologia adaptada de Bligh; Dyer (1959). As amostras de peito, aproximadamente 25 g, foram homogeneizadas com 15 ml de metanol e 30 ml de clorofórmio em placa agitadora. Posteriormente, 15 ml de água destilada foram adicionados à solução e o homogenato foi filtrado a vácuo em funil de *Buchner*. Em seguida, o filtrado foi transferido para um funil de separação, no qual foi acrescentado 10 ml de NaCl 0,9%. Com a separação de fases, foi coletada a fase inferior contendo clorofórmio e a matéria graxa total, sendo o solvente evaporado em um rotaevaporador com temperatura controlada de 33-34°C. A hidrólise e transesterificação foram realizadas de acordo com o método da ISO (1978), em que para 200 mg da matéria graxa foram adicionados 2ml de NaOH 2M em metanol e n-heptano.

A fase superior foi recolhida, contendo n-heptano e ésteres metílicos de ácidos graxos, e transferida para um *ependorf* armazenado a -18°C até o momento da análise. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados utilizando cromatógrafo Shimadzu modelo 17<sup>a</sup> GasChromatograph, equipado com

detector de ionização de chama e coluna capilar (100m x 0,25 mm) com 0,25 $\mu$ m de cianopropilpolisiloxano CP SII 88.

A rampa de temperatura da coluna foi programada para: 65°C por 15 minutos; 10°C.min<sup>-1</sup> até 165°C mantido por 2 minutos; 4°C.min<sup>-1</sup> até 185°C mantido por 8 minutos; 4°C.min<sup>-1</sup> até 235°C mantido por 5 minutos, sendo o detector e o injetor mantidos a 260°C, utilizado Split de 1/100. O fluxo de gases foi de 1,2ml.min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (H<sub>2</sub>), 30ml.min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (N<sub>2</sub>), 30 e 300ml.min<sup>-1</sup> para os gases da chama, H<sub>2</sub> e ar sintético, respectivamente.

Para a identificação dos ácidos graxos realizou-se uma comparação dos tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (SIGMA-SUPELCO 18919), sendo os resultados expressos em porcentagem de área normalizada dos ácidos graxos. Também foram identificados segundo a nomenclatura recomendada pela IUPAC (IUPAC-IUB; 1978).

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 4X2, com quatro níveis de inclusão de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* (0; 0,25; 0,50; 1%) associados ou não à adição de probiótico, com cinco repetições de 26 aves por parcela experimental. Os resultados foram submetidos à análise de regressão para os diferentes níveis de inclusão da farinha de microalga e submetidos à análise de variância (Teste F) para o fator probiótico por meio do programa estatístico R e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas a um nível de significância de 5%.

Quando a interação entre os níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* e probiótico foi significativa, realizou-se o desdobramento a fim de identificar o comportamento das respostas em função dos níveis de *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico e o fator probiótico associado ou não aos níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris*, sendo utilizada análise de variância (Teste F) para o fator probiótico e análise de regressão para os níveis de *Chlorella vulgaris*, as equações de regressão (linear ou quadrática) foram determinadas quando necessário.

## **Resultados e discussão**

Os resultados obtidos para o consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar, viabilidade criatória e índice de eficiência produtiva nas fases de criação pré-inicial, período de 21 dias de idade, 35 dias e no período de um a 42

dias de idade (Tabela 3) mostram que na fase pré-inicial houve efeito significativo na interação dos diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* e probiótico para o ganho de peso (Tabela 4), sendo que no tratamento sem probiótico houve efeito quadrático da adição dos níveis de inclusão da alga ( $y = 0,1315 + 0,0329x - 0,0313x^2$ ), com melhor nível de inclusão de 0,50%, e no tratamento com adição de probiótico observou-se aumento linear ( $y = 0,1227 + 0,0222x$ ), podendo ser verificado que à medida que o nível de inclusão da alga aumenta, juntamente com o probiótico, obtém-se maior ganho de peso.

Também foi observado efeito do probiótico no tratamento sem adição de alga, em que a ausência de probiótico e de alga proporcionou maior ganho de peso em relação ao tratamento sem alga e com probiótico. Ainda, na fase pré-inicial, houve melhora linear na conversão alimentar à medida que o nível de inclusão da alga na ração aumentou ( $1,2521 - 0,0925x$ ). Neste período, a viabilidade criatória é de 100% em todos os tratamentos e observa-se que o índice de eficiência produtiva não foi alterado pelos diferentes tratamentos.

No período de 21 dias de idade não foram observadas diferenças no desempenho das aves alimentadas com diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico ( $p > 0,05$ ). Enquanto que no período de um a 35 dias e de um a 42 dias de idade observa-se que a adição de probiótico na ração proporcionou melhor conversão alimentar nos dois períodos. Além disso, no período de um a 42 dias observa-se efeito significativo na interação da microalga *Chlorella vulgaris* com o probiótico (Tabela 4), em que o tratamento com adição de 0,25% de *Chlorella vulgaris* com probiótico proporcionou o melhor índice de eficiência produtiva.

A ausência de efeito do probiótico nas fases de um a sete dias e de um a 21 dias pode ser proveniente da ausência de fatores desafiantes, estressantes do ambiente que proporcionou um bom estado sanitário das aves, visto que o bem-estar dos animais está inversamente relacionado às respostas ao probiótico (FARIA *et al.*, 2009). No período de um a 35 dias e de um a 42 dias a exposição das aves aos microrganismos e às condições adversas do ambiente foi maior, o que pode explicar o efeito benéfico do probiótico no desempenho das aves nestas fases.

**Tabela 3** – Valores médios referentes ao consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), viabilidade criatória (VC) e índice de eficiência produtiva (IEP) de frangos alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico.

Parâmetros	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alga)				Probiótico			p-valor		
	0%	0,25%	0,50%	1,00%	Sem	Com	CV (%)	Alga	Probiótico	Alga x Probiótico
1-7 dias de idade										
CR (kg/ave)	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	4,42	0,080	0,076	0,155
GP (kg/ave)	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,13	6,27	<0,005	0,421	0,030
CA (kg/kg)	1,28	1,22	1,20	1,18	1,21	1,23	4,55	<0,005*	0,831	0,062
IEP (%)	143,81	152,47	167,12	167,14	161,16	154,11	13,53	0,052	0,305	0,075
1-21 dias de idade										
CR (kg/ave)	1,21	1,18	1,20	1,20	1,19	1,20	5,49	0,857	0,784	0,086
GP (kg/ave)	0,83	0,82	0,85	0,84	0,82	0,84	7,77	0,738	0,334	0,180
CA (kg/kg)	1,46	1,45	1,41	1,44	1,46	1,42	4,3	0,324	0,113	0,379
VC (%)	94,87	92,69	91,54	94,61	93,93	92,88	5,07	0,384	0,487	0,538
IEP (%)	252,19	249,72	263,11	262,63	251,27	262,55	12,52	0,707	0,276	0,101
1-35 dias de idade										
CR (kg/ave)	3,41	3,39	3,44	3,39	3,41	3,40	3,43	0,715	0,897	0,114
GP (kg/ave)	2,08	2,03	2,08	2,06	2,05	2,08	3,92	0,503	0,254	0,148
CA (kg/kg)	1,64	1,67	1,65	1,65	1,67	1,64	1,92	0,187	0,011	0,417
VC (%)	82,69	84,23	82,69	85,04	83,00	84,23	7,63	0,753	0,637	0,283
IEP (%)	309,73	292,58	297,02	306,49	297,55	304,75	7,19	0,340	0,288	0,129
1-42 dias de idade										
CR (kg/ave)	4,92	4,91	4,94	4,89	4,91	4,92	2,63	0,843	0,842	0,058
GP (kg/ave)	2,84	2,82	2,81	2,81	2,80	2,84	2,72	0,800	0,100	0,088
CA (kg/kg)	1,73	1,74	1,76	1,74	1,76	1,73	1,68	0,419	0,023	0,978
VC (%)	81,15	81,92	81,92	84,62	82,31	82,50	7,97	0,662	0,927	0,276
IEP (%)	316,37	315,41	312,16	324,46	312,27	321,93	6,84	0,486	0,429	0,032

Médias comparadas à diferença significativa de 5% de significância pelo teste F.

CV = Coeficiente de Variação.

\*Efeito linear:  $y = 1,2521 - 0,0925x$   $R^2: 0,620$

**Tabela 4** - Desdobramento da interação entre os níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico para o ganho de peso na fase de um a sete dias de idade e índice de eficiência produtiva de um a 42 dias de idade.

Ganho de peso (kg/ave) de 1 a 7 dias de idade		
Níveis <i>Chlorella vulgaris</i> (%)	Sem probiótico*	Com probiótico**
0	0,13 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>
0,25	0,13	0,13
0,50	0,15	0,13
1,00	0,13	0,14
Índice de eficiência produtiva (%) de 1 a 42 dias de idade		
Níveis <i>Chlorella vulgaris</i> (%)	Sem probiótico	Com probiótico
0	328,93	323,24
0,25	299,87 <sup>b</sup>	330,94 <sup>a</sup>
0,50	325,27	299,05
1,00	314,41	334,51

\*Efeito quadrático:  $y = 0,1315 + 0,0329x - 0,0313x^2$   $R^2: 0,343$

\*\*Efeito linear:  $y = 0,1227 + 0,0222x$   $R^2: 0,824$

A melhora ocasionada na conversão alimentar pela *Chlorella vulgaris* na fase pré-inicial é devido aos seus componentes que apresentam atividade antimicrobiana, como a substância clorelina (ABDELNOUR *et al.*, 2019), fibras (KIM; KANG, 2015) e polissacarídeos (PRABAKARAN *et al.*, 2018), como mananoligossacarídeo (REZVANI; ZAGHARI; MORAVEJ, 2012), ramnose, galactose, glicose, xilose, arabinose e manose (SAFI *et al.*, 2014), que são digeridos por microrganismos presentes na flora intestinal, aumentando a proliferação de bactérias benéficas no trato gastrintestinal, o que favorece a eficiência de absorção dos nutrientes (KANG; PARK; KIM, 2017). Além disso, é constituída de ácidos graxos polinsaturados essenciais, prevalecendo altos teores de ácido  $\alpha$ -linolênico (ácido graxo da série ômega 3) (FREITAS, 2017), que reduz a formação de eicosanoides com características inflamatórias e com ocorrência de distúrbios imunológicos (BORGES *et al.*, 2014).

Esta alga também é abundante em nutrientes, como alto teor de proteína (KANG *et al.* 2013), em torno de 60% (SALVIA *et al.*, 2014), podendo conter até 62% de proteína (GADIEV *et al.*, 2019), 9-18% de fibra, vitaminas e minerais (RANI, SANDAL; SAHOO, 2018), como vitamina A e C (SALVIA *et al.*, 2014), potássio, sódio, magnésio, ferro, cálcio (BLEAKLEY; HAYES, 2017), selênio (EL-ABD; HAMOUDA, 2017) e aminoácidos essenciais (PRABAKARAN *et al.*, 2018).

Por estas características, a *Chlorella vulgaris* pode ter contribuído com o melhor aproveitamento dos nutrientes pelos animais, por afetar positivamente o trato digestório e o desenvolvimento do trato gastrintestinal das aves, já que o sistema digestório do pintainho é imaturo do ponto de vista funcional, portanto não ocorre a adequada digestão e absorção dos nutrientes na primeira semana de vida, sendo necessário o fornecimento de alimentos de qualidade para o melhor desenvolvimento do trato gastrintestinal das aves (SANTOS *et al.*, 2012).

O melhor resultado na conversão alimentar das aves alimentadas com probiótico no período de um a 35 dias e de um a 42 dias de idade é em função de que o probiótico age na inibição de patógenos por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias bacteriostáticas, assim como, disputa pelos sítios de ligação no epitélio intestinal (DERAZ; ELKOMY; KHALIL, 2019) e por meio de estimulação do sistema imune (MIRZA, 2018).

O probiótico mantém a integridade intestinal, pois é capaz de proteger e equilibrar a microbiota intestinal, o que diminui a transferência de bactérias e seus produtos metabólicos para a circulação, e assim evita que ocorra aumento das respostas inflamatórias com consequente piora no desempenho animal (GADDE *et al.*, 2017).

A integridade do epitélio intestinal é fundamental para a saúde do animal, pois atua como uma barreira natural contra bactérias patogênicas, e para substâncias tóxicas presentes no lúmen intestinal (SHANMUGAPRIYA *et al.*, 2015). Ainda, segundo Borda-Molina, Seifert e Silva (2018), o probiótico aumenta a atividade de enzimas digestivas, como lipase, protease e amilase, melhorando assim o desempenho das aves.

O desdobramento da interação entre os diferentes níveis de inclusão da microalga *Chlorella vulgaris* e probiótico para ganho de peso e índice de eficiência produtiva evidenciou que o probiótico contribuiu com a digestibilidade da alga, que é um alimento rico em fibras, lipídeos e proteína, pois o mesmo pode aumentar a atividade de enzimas digestivas (DERAZ; ELKOMY; KHAIL, 2019), sendo a secreção de enzimas menor nos primeiros dias de vida das aves e apresentam devida eficiência conforme a idade do frango aumenta (SANTOS *et al.*, 2012).

A ausência de probiótico associado a não inclusão de *Chlorella vulgaris* proporcionou maior ganho de peso em relação ao tratamento com adição de probiótico devido à ausência de fatores desafiadores, estressantes do ambiente, visto que o efeito do probiótico é inversamente proporcional ao estado sanitário das aves (FARIA *et al.*, 2009). Além disso, para que o probiótico exerça benefícios ao desempenho é importante que ocorra equilíbrio da microbiota intestinal, o que ocasiona a maturidade do trato gastrintestinal, favorecendo a absorção dos nutrientes, porém a estabilidade da microbiota intestinal leva um determinado tempo para ocorrer, e na ausência de desafios o probiótico pode ocasionar disbiose, desequilíbrio da microbiota, o que pode afetar o desempenho das aves não desafiadas (LEANDRO *et al.*, 2010).

Para o índice de eficiência produtiva no período de um a 42 dias de idade, o probiótico associado ao nível de inclusão de 0,25% de *Chlorella vulgaris* aumentou este parâmetro, podendo comprovar que a combinação entre a alga e o probiótico pode aumentar a eficiência produtiva de criação dos frangos de corte, promovendo resultados positivos no desempenho zootécnico das aves.

Este resultado sugere que a *Chlorella vulgaris* pode apresentar atividade prebiótica por possuir polissacarídeos, como mananoligossacarídeo (REZVANI; ZAGHARI; MORAVEJ, 2012), ramnose, galactose, glicose, xilose, arabinose, manose e  $\beta$ 1-3 glucano (SAFI *et al.*, 2014), além de fibras (KIM; KANG, 2015), sendo que o prebiótico funciona como substrato seletivo para bactérias benéficas (PAN; YU, 2014) por serem resistentes às enzimas do trato gastrintestinal superior, fermentados no intestino grosso (PATEL; GOYAL, 2012). Assim, estimulam o desenvolvimento do probiótico, o qual exerce efeitos benéficos no desempenho animal, porém este efeito só é observado em um nível de 0,25% de alga, indicando que o excesso de carboidratos não-digeríveis, enquanto não são fermentados, pode ocasionar efeito osmótico no trato gastrintestinal, resultando na incidência de diarreia (SAAD, 2006), o que pode prejudicar o aproveitamento destes nutrientes pelo probiótico.

Os resultados de rendimento de carcaça e cortes (Tabela 5) mostram que os diferentes níveis de inclusão da *Chlorella vulgaris* e/ou probiótico não influenciaram nestas características. Também não houve interação entre estes dois aditivos ( $p > 0,05$ ). Estes resultados eram esperados, visto que não houve efeito

dos diferentes tratamentos sobre o peso das aves no decorrer das fases de criação, apesar de ter ocorrido uma melhor conversão alimentar.

**Tabela 5** – Valores médios de rendimentos de carcaça e cortes de frangos alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico.

Parâmetros	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alga)				Probiótico			p-valor		
	0%	0,25%	0,50%	1,00%	Sem	Com	CV (%)	Alga	Probiótico	Alga x Probiótico
Rendimentos (%)										
Carcaça	70,64	71,16	71,42	70,97	70,82	71,22	1,85	0,584	0,346	0,086
Pernas	31,13	31,41	31,48	31,19	31,40	31,21	4,12	0,914	0,653	0,967
Dorso	17,82	18,09	17,74	17,90	18,01	17,77	6,04	0,903	0,504	0,975
Asas	10,61	10,69	10,42	10,70	10,61	10,60	3,43	0,287	0,894	0,834
Peito	40,44	39,81	40,36	40,21	39,99	40,42	4,49	0,867	0,454	0,922

Médias comparadas à diferença significativa de 5% de significância pelo teste F.

CV = Coeficiente de Variação.

Estes resultados se assemelham aos encontrados por Junaid *et al.* (2018) que não verificaram resultado significativo para rendimento da carcaça, coxa, peito e asas ao utilizar o probiótico *Lactobacillus acidophilus* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC) e o *Bifidobacterium bifidum* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC). An *et al.* (2016) ao estudarem a adição de *Chlorella vulgaris* (0,05, 0,15 e 0,5%) na dieta de frangos de corte observaram que os rendimentos do peito e de pernas não foram afetados.

Os resultados de qualidade de carne (Tabela 6) mostram que a luminosidade, intensidade de vermelho, pH, força de cisalhamento e oxidação lipídica não foram influenciados pela alimentação das aves com adição de diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico ( $p > 0,05$ ). A capacidade de retenção de água foi reduzida com adição de probiótico na ração das aves ( $p < 0,05$ ) e a adição de *Chlorella vulgaris* aumentou linearmente ( $y = 13,2633 + 3,4048x$ ) a intensidade de amarelo ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6** – Valores médios correspondentes à perda de água por cocção (PPC), capacidade de retenção de água (CRA), L\* (luminosidade), a\*(componente vermelho-verde), b\*(componente amarelo-azul), potencial hidrogeniônico (pH), textura e oxidação lipídica de frangos alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico.

Parâmetros	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alga)				Probiótico			p-valor		
	0%	0,25%	0,50%	1,00%	Sem	Com	CV (%)	Alga	Probiótico	Alga x Probiótico
PPC (%)	26,86	26,59	25,31	26,40	25,83	26,75	7,94	0,381	0,178	0,518
CRA (%)	67,02	67,29	66,72	66,38	67,75	65,96	3,04	0,778	0,009	0,593
L*	49,36	49,51	49,45	49,58	49,08	49,87	2,98	0,989	0,098	0,964
a*	1,88	2,13	2,23	2,46	2,30	2,05	26,4	0,179	0,185	0,170
b*	12,94	14,33	15,30	16,45	14,89	14,62	7,79	0,000*	0,454	0,380
pH	6,12	6,16	6,17	6,11	6,14	6,14	1,58	0,375	0,870	0,986
Textura (Newton)	17,46	17,07	14,74	15,89	16,26	16,32	23,26	0,386	0,963	0,397
Oxidação lipídica (mg TBARS/kg)	0,10	0,10	0,09	0,11	0,10	0,11	17,94	0,412	0,139	0,724

Médias comparadas à diferença significativa de 5% de significância pelo teste F.

CV = Coeficiente de Variação.

\*Efeito linear:  $y = 13,2633 + 3,4048x$   $R^2: 0,953$

Apesar desta menor capacidade de retenção de água, obtida no presente trabalho, este resultado não influenciou negativamente nos demais parâmetros de qualidade da carne, como pH, cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), perda de água por cocção e força de cisalhamento. Segundo Palma (2017), a capacidade de retenção de água interfere na cor, na maciez e suculência da carne, pois quanto maior a quantidade de água fixada na carne, maior a suculência, o que melhora a maciez (ANADÓN, 2002).

Assim, se a capacidade de retenção de água é baixa, há maior perda de água e a cor da carne é afetada, apresentando aparência pálida devido ao aumento da dispersão da luz (BATISTA, 2010), e também se a carne reter menos água menos pigmentos serão mantidos (FLETCHER, 2002). Porém, no presente trabalho, apesar da menor capacidade de retenção de água, observa-se que a luminosidade não foi afetada e os valores obtidos são de carnes normais, visto que, segundo Olivio, Guarnieri e Shimokomaki (2001), a faixa ideal de luminosidade para carnes de frango encontra-se em torno de 50.

A inclusão de *Chlorella vulgaris* exerceu efeito linear significativo para a intensidade de amarelo, comprovando seu potencial como corante natural devido aos pigmentos carotenoides que a compõe como a luteína, astaxantina, fucoxantina,  $\beta$ -caroteno e cantaxantina (PASARIN; ROVINARU, 2018), bem como clorofila a e b, feofitina a (SILVA *et al.*, 2019), sendo que produtos mais corados são desejáveis pelos consumidores (KONKOL *et al.*, 2018), pois a cor influencia a aparência visual da carne (ABDULLA *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Oh *et al.* (2015) também foi possível comprovar o aumento da intensidade de amarelo da carne do peito de patos com a adição da alga (0, 1.000 e 2.000 mg). Enquanto que Zheng *et al.* (2012) e Kim; Kang (2015) observaram resultados semelhantes em ovos de galinhas poedeiras ao adicionarem respectivamente 0,1 e 0,2% e 25, 50 e 75 g de *Chlorella*/ kg de ração.

Quanto à oxidação lipídica não foram observadas diferenças nestes resultados com os diferentes tratamentos. Resultados diferentes foram obtidos por Bai *et al.* (2016b), que adicionaram 0; 0,2; 0,3 e 0,4 g de *Bacillus subtilis* / kg de ração e Bai *et al.* (2018), ao adicionaram 0; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 g de *Bacillus subtilis*/kg de ração. Estes autores observaram redução na oxidação lipídica de frangos de corte ao fornecer probiótico nas rações, sendo que esta discrepância de

resultado pode ser devido à quantidade de probiótico adicionada à dieta, pois os autores trabalharam com maiores níveis de inclusão.

O probiótico pode reduzir a oxidação lipídica devido à capacidade de evitar que ocorram danos nocivos ocasionados por espécies reativas ao oxigênio, pois bactérias lácticas produzem superperóxido dismutase, responsável por converter os radicais superperóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio, o que diminui a atividade das espécies reativas ao oxigênio (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017).

Além disso, podem produzir catalase, como os *Lactobacillus*, destruindo o peróxido de hidrogênio, bloqueando a formação de radicais peroxil, além de glutatona e tioredoxina (DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017). O probiótico também pode hidrolisar grandes moléculas de proteína e formar peptídeos biologicamente ativos, como a glutatona, podendo contribuir com propriedades antioxidantes (OGNIK *et al.*, 2017).

A adição de *Chlorella vulgaris* também não influenciou na oxidação lipídica ( $p > 0,05$ ), apesar desta alga apresentar componentes antioxidantes, como carotenoides, compostos fenólicos e selênio, que desempenham atividade antioxidante devido às propriedades de oxidorredução, as quais absorvem e neutralizam radicais livres ou decompõem peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Resultado este diferente do observado por El-Abd, Hamouda e Dawoud (2018), os quais estudaram a adição de cinco gramas de *Chlorella vulgaris* congelada, descongelada e fresca / litro de água.

Em relação ao perfil de ácidos graxos encontrado na carne de peito dos frangos de corte (Tabela 7) é possível observar que houve efeito linear crescente ( $y = 1,9134 + 0,3490x$ ) dos diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* sobre a quantidade de ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3), assim como efeito quadrático ( $y = 0,7100 - 0,8010x + 0,6818x^2$ ) para a quantidade de ácido araquidônico (C20:4n-6) e efeito linear decrescente ( $y = 11,9722 - 1,0764x$ ) sobre a relação ômega 6/ômega 3. Ainda, o probiótico aumentou ( $p < 0,05$ ) a quantidade de ácido araquídico (C20:0) e não foi observado efeito da interação entre a inclusão de *Chlorella vulgaris* e probiótico sobre o perfil de ácidos graxos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 7** - Perfil de ácidos graxos da carne de peito de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* (Alga) associados ou não ao probiótico.

Ácidos graxos (%)	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alga)				Probiótico		CV (%)	p-valor		
	0%	0,25%	0,50%	1,00%	Sem	Com		Alga	Probiótico	Alga x Probiótico
Ácido mirístico (C14:0)	0,45	0,44	0,44	0,47	0,45	0,45	12,26	0,573	0,820	0,485
Ácido palmítico (C16:0)	20,87	19,85	21,67	20,14	21,36	19,91	19,18	0,737	0,257	0,649
Ácido palmitoleico (C16:1n-9)	4,59	4,33	4,30	4,68	4,42	4,53	18,34	0,655	0,670	0,956
Ácido esteárico (C18:0)	5,47	5,36	5,84	5,02	5,75	5,10	26,97	0,662	0,170	0,786
Ácido oleico (C18:1n-9)	38,32	39,32	38,47	39,39	38,70	39,05	6,00	0,639	0,636	0,244
Ácido linoleico (C18:2n-6)	26,62	26,91	25,76	26,47	25,66	27,22	12,01	0,870	0,130	0,940
Ácido araquídico (C20:0)	0,35	0,36	0,37	0,34	0,33	0,38	20,8	0,770	0,022	0,745
Ácido $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3)	1,83	2,11	2,10	2,23	1,99	2,14	13,98	0,029*	0,117	0,555
Ácido eicosadienoico (C20:2)	0,17	0,19	0,16	0,17	0,17	0,18	19,47	0,146	0,516	0,053
Ácido $\gamma$ -linolênico (C20:3n-6)	0,25	0,25	0,22	0,23	0,24	0,23	15,49	0,193	0,687	0,536
Ácido araquidônico (C20:4n-6)	0,69	0,59	0,45	0,60	0,63	0,54	29,67	0,031**	0,114	0,734
Ácido clupanodônico (C22:5n-3)	0,23	0,20	0,17	0,19	0,21	0,18	30,00	0,172	0,094	0,556
Ácido cervônico (C22:6n-3)	0,08	0,09	0,04	0,08	0,07	0,07	63,71	0,106	0,770	0,524
Total saturados	27,14	26,01	28,33	25,97	27,88	25,85	19,63	0,720	0,232	0,681
Total monoinsaturados	42,91	43,65	42,77	44,07	43,12	43,58	6,11	0,660	0,583	0,384
Total polinsaturados	29,94	30,34	28,90	29,96	29,00	30,57	11,6	0,811	0,161	0,931
Ômega 3 (n-3)	2,32	2,45	2,31	2,50	2,39	2,40	8,82	0,114	0,951	0,546
Ômega 6 (n-6)	27,57	27,75	26,43	27,29	26,52	28,00	11,79	0,803	0,158	0,937
Relação n-6/n-3	12,98	11,59	11,43	10,93	11,27	11,70	5,92	0,009***	0,080	0,373

Médias comparadas à diferença significativa de 5% de significância pelo teste F.

CV = Coeficiente de Variação.

\*Efeito linear:  $y = 1,9134 + 0,3490x$   $R^2: 0,764$

\*\*Efeito quadrático:  $y = 0,7100 - 0,8010x + 0,6818x^2$   $R^2: 0,908$

\*\*\*Efeito linear:  $y = 11,9722 - 1,0764x$   $R^2: 0,942$

A *Chlorella vulgaris* é constituída por ácidos graxos polinsaturados essenciais, sendo assim, a incorporação da microalga *Chlorella vulgaris* na ração das aves contribuiu com uma maior deposição de ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3), além de diminuir a relação ômega 6/ômega 3 na carne de peito, pois em sua composição predominam, em torno de 27%, maiores teores de ácido  $\alpha$ -linolênico. Além disso, houve aumento do ácido araquidônico (C20:4n-6) quando adicionado maiores níveis de *Chlorella vulgaris*, pois a mesma também é composta por 24% de ácido linoleico (FREITAS, 2017), que após ingerido é convertido em ácido araquidônico (TOGASHI *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos polinsaturados essenciais são beneficiadores da saúde do hospedeiro (NOVELLO *et al.*, 2008). Os ácidos graxos da série ômega 3 exercem atividades anti-inflamatórias, anticoagulantes, vasodilatadoras (MORAES; COLLA, 2006), reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares (COSTA *et al.*, 2017) e a formação de eicosanoides com características inflamatórias e com ocorrência de distúrbios imunológicos (BORGES *et al.*, 2014). A série ômega 6, no entanto, associa-se à reação inflamatória, permeabilidade dos vasos, viscosidade sanguínea (MORAES; COLLA, 2006), bem como com a ocorrência de doenças inflamatórias, cardiovasculares e distúrbios imunológicos (BORGES *et al.*, 2014).

No entanto, quando o consumo de ácidos graxos da série ômega 6 é excessivo em relação aos ácidos graxos da séries ômega 3, pode ocorrer aumento da produção de eicosanoides com características inflamatórias e peróxidos da séries leucotrienos, prostaglandina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub>, sendo que quantidades pequenas de eicosanoides são produzidas em um organismo saudável, porém quantidades elevadas de eicosanoides são produzidas em organismos em condições patológicas (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2011).

Logo, é importante, para o bom funcionamento do sistema imune, ingerir uma menor relação ômega 6/ ômega 3, sendo a mesma favorecida neste estudo, pois se esta relação for alta pode ocorrer aumento excessivo de resposta inflamatória devido ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (SWIATKIEWICZ; ARCZEWSKA-WLOSEK; JOZEFIAK, 2015), uma vez que nos processos de alongamento e dessaturação, o ácido  $\alpha$ -linolênico e o ácido linoleico, por serem comuns a ambas vias metabólicas, competem pelas mesmas enzimas, o que resulta na produção de eicosanoides com diferentes funções (POTENÇA *et al.*, 2010).

A adição de probiótico ocasionou aumento do teor de ácido araquídico (C20:0) na carne, isto pode ter ocorrido pois a microbiota intestinal é capaz de modificar o perfil de ácidos graxos da ração e dos tecidos, além de hidrogenizar ácidos orgânicos insaturados em saturados e dessaturar alguns ácidos orgânicos. Como também, bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem ácido butírico como principal produto metabólico, o que pode interferir na composição de ácidos graxos gerados na carne (ABDULLA *et al.*, 2018).

Entretanto, mesmo obtendo maiores teores de ácidos graxos polinsaturados, como o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3) e ácido araquidônico (C20:4n-6) com a adição de *Chlorella vulgaris*, não houve comprometimento da estabilidade oxidativa, o que sugere que a microalga pode contribuir com a estabilidade oxidativa da carne.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de *Chlorella vulgaris* melhorou o desempenho na fase pré-inicial e tornou a carne mais amarelada, com maiores teores de ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3), menor relação ômega 6/ômega 3 e aumento do ácido araquidônico (C20:4n-6) quando adicionado maiores níveis da alga. Enquanto que, a adição de probiótico na ração proporcionou melhor desempenho no período de um a 35 dias e no período total de criação, reduziu a capacidade de retenção de água, sem alterar os demais parâmetros de qualidade da carne e aumentou o teor de ácido araquídico (C20:0) na carne.

Ainda, houve interação entre a *Chlorella vulgaris* e o probiótico sobre o ganho de peso na fase pré-inicial e sobre o índice de eficiência produtiva no período total de criação, obtendo melhor índice com a associação de probiótico com 0,25% de *Chlorella vulgaris*, o que pode indicar que neste nível de inclusão a alga apresentou atividade prebiótica. Porém, há a necessidade de futuros estudos que possam abordar a interação da *Chlorella vulgaris* com o probiótico, e que utilizem maiores níveis de adição da *Chlorella vulgaris* e probiótico nas dietas a fim de melhor comprovar seus efeitos nos parâmetros de qualidade da carne, além de melhor identificar os fatores que interferem nos efeitos ocasionados pelo probiótico e pela microalga.

## REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR, S. A. *et al.* The application of the microalgae *Chlorella* spp. as a supplement in broiler feed. **World's Poultry Science Journal**, v. 75, n. 2, p. 305-318, 2019.
- ABDULLA, N. R. *et al.* Physico-chemical properties of breast muscle in broiler chickens fed probiotics, antibiotics or antibiotic–probiotic mix. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 64-70, 2018.
- ADHIKARI, P. A.; KIM, W. K. Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity—a review. **Annals of animal science**, v. 17, n. 4, p. 949-966, 2017.
- AN, B-K. *et al.* Effect of dried *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* growth factor on growth performance, meat qualities and humoral immune responses in broiler chickens. **Springerplus**, p. 1-7. 2016.
- ANADÓN, H. L. S. **Biological, nutrition and processing factors affecting breast meat quality of broilers**. Dissertação (Mestrado), Faculty of Virginia, 2002.
- BAI, K. *et al.* Dietary effects of *Bacillus subtilis* fmbj on growth performance, small intestinal morphology, and its antioxidant capacity of broilers. **Poultry Science**, p. 1-10. 2018.
- BAI, W.K. *et al.* Dietary Probiotic Bacillus subtilis Strain fmbj Increases Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of Chicken Breast Meat during Storage. **Plos One**, p. 1-17. 2016b.
- BATISTA, D. F. A. Influência do pH 24 horas da carne sobre duas características de qualidade de carne: cor e drip loss. **Horizonte Científico**, v. 4, n. 1, 2010.
- BORDA-MOLINA, D.; SEIFERT, J.; CAMARINHA-SILVA, A. Current perspectives of the chicken gastrointestinal tract and its microbiome. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 16, p. 131-139, 2018.
- BORGES, M.C. *et al.* Ácidos graxos polinsaturados ômega-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, p.460-466, dez. 2014.
- BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. **Journal Foods**, p. 1-34. 2017.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BRIDI, A.M. *et al.* Indicadores de estresse e qualidade da carne em frangos abatidos pelo método “Halal”. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p.2451-2460, 2012.

CASON, J.A.; LYON, C.E.; PAPA, C.M. Effect of muscle opposition during rigor on development of broiler breast meat tenderness. **Poultry Science**, v.76, p.725-787, 1997.

CHOI, H. *et al.* Effects of dietary recombinant *chlorella* supplementation on growth performance, meat quality, blood characteristics, excreta microflora, and nutrient digestibility in broilers. **Poultry Science**, p. 1-7. 2016.

COSTA, F.A.D. *et al.* Enriquecimento com ácidos graxos da série ômega-3 em carne de aves e ovos. **Pubvet**, v. 11, p.113-123, 2017.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p.33-40, 2004.

DERAZ, S. F.; ELKOMY, A. E.; KHALIL, A. A. Assessment of probiotic-supplementation on growth performance, lipid peroxidation, antioxidant capacity, and cecal microflora in broiler chickens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. S1, p. 030-039, 2019.

DOWARAH, R.; VERMA, A. K.; AGARWAL, N. The use of Lactobacillus as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: a review. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2017.

EL-ABD, M. N.; HAMOUDA, A. R. Improved productivity and health of broiler chicken by micro green alga *Chlorella vulgaris*. **Asian Journal of Poultry Science**, v. 11, p. 57-63, 2017.

FARIA, D. E. *et al.* Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 18-28, 2009.

FARIA FILHO, DE *et al.* Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 89-98, 2006.

FLETCHER, D. L. Poultry meat quality. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 58, n. 2, p.131– 145, 2002.

FREITAS, H. R. *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids and micronutrients: A brief commentary. **The Open Plant Science Journal**, v. 10, n. 1, 2017.

FRONING, G.W.; BABJI, A.S.; MATHER, F.B. The effect of preslaughter temperatures, stress, struggle and anesthetization on color and textural characteristics of turkey muscle. **Poultry Science**, v.57, n.3, p.630-633, 1978.

GADDE, U. *et al.* Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal health research reviews**, v. 18, n. 1, p. 26-45, 2017.

GADIEV, R. R. *et al.* The use of chlorella in goose breeding. **AIMS Agriculture and Food**, v. 4, n. 2, p. 349, 2019.

GONG, L. *et al.* Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. **Animal Science Journal**, p. 1-11. 2018.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances and Food Research**, v.10, p.355-463, 1961.

HOSSAIN, M. M.; BEGUM, M.; KIM, I. H. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. **Veterinarni Medicina**, v. 60, n. 2, p. 77-86, 2015.

ISO: International Organization for Standardization. **Animal and vegetable fats and oils Preparation of methyl esters of fatty acids**. Geneve, 1978. P.1-6. (Method ISO 5509).

IUPAC-IUB. The nomenclature of lipids (recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. **The Journal of Lipid Research**, v.19, p.114-128, 1978.

JUNAID, N. *et al.* Production performance, immune response and carcass traits of broiler chickens fed diet incorporated with probiotics. **Indian Journal of Animal Research**, v. 10, 2018.

KANG, H.K. *et al.* Effect of various forms of dietary Chlorella supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. **The Journal Of Applied Poultry Research**, p. 101-108. 2013.

KANG, H. K.; PARK, S. B.; KIM, C. H. Effects of dietary supplementation with a chlorella by-product on the growth performance, immune response, intestinal microflora and intestinal mucosal morphology in broiler chickens. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 101, n. 2, p. 208-214, 2017.

KAUD, H.A. Effect of *Spirulina platensis* as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. **Scientific Journal Of Applied Research**, p. 44-48. 2012.

KIM, C.H.; KANG, H.K. Effect of dietary supplementation with a chlorella by-product on the performance, immune response and metabolic function in laying hens. **Poultry Science**, p. 1-10. 2015.

KONKOL, D. *et al.* Algae Biomass in Animal Production. In: **Algae Biomass: Characteristics and Applications**. Springer, Cham, p. 123-130. 2018.

KOTRBÁČEK, V.; DOUBEK, J.; DOUCHA, J. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. **Journal Of Applied Phycology**, p. 2173-2180. 2015.

LAN, R. X.; LEE, S. I.; KIM, I. H. Effects of *Enterococcus faecium* SLB 120 on growth performance, blood parameters, relative organ weight, breast muscle meat quality, excreta microbiota shedding, and noxious gas emission in broilers. **Poultry science**, v. 96, n. 9, p. 3246-3253, 2017.

LEANDRO, N. S. M. *et al.* Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados: 1. desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1509-1516, 2010.

LEÃO, L.L. *et al.* Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, p.94-100, 2017.

LEE, S.H. *et al.* Six-week supplementation with chlorella has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. **Nutrition**, p.175-183. 2010.

LIMA JÚNIOR, D. M. *et al.* Alimentos funcionais de origem animal. **Revista Verde (Mossoró–RN–Brasil)** v. 6, n. 2, p. 30-40, 2011.

LUO, J. *et al.* Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*. **Journal of proteomics**, v. 91, p. 226-241, 2013.

MADEIRA, M. S. *et al.* Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. **Livestock Science**, v. 205, p. 111-121, 2017.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. **Journal Of Biological Engineering**, p.1-20. 2018.

MENDES, R.; CARDOSO, C.; PESTANA, C. Measurement of malondialdehyde in fish: a compararison study between HPLC methods and the traditional aspectrophotometric test. **Food Chemistry**, v.112, n.4, p.1038-1045, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA (Brasil). **Instrução Normativa, 44 de 15 de dezembro de 2015**.

MIRZA, R. A. Probiotics and Prebiotics for the Health of Poultry. In: **Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety**. Springer, Cham, p. 127-154.2018.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 3, n. 2, 2006.

MOREIRA, J. *et al.* Efeito da densidade populacional sobre desempenho, rendimento de carcaça e qualidade da carne em frangos de corte de diferentes linhagens comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, p.1507-1519, 2004.

MOUSAVI, S. M. A. A.; HOSSEINI, H. M.; MIRHOSSEINI, S. A. A Review of Dietary Probiotics in Poultry. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 5, n. 2, p. 48-54, 2018.

NOVELLO, D. *et al.* Avaliação bromatológica e perfil de ácidos graxos da carne de frangos de corte alimentados com rações contendo farinha de peixe ou aveia-branca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 9, p. 1660-1668, 2008.

OGNIK, K. *et al.* The effect of a probiotic containing *Enterococcus faecium* DSM 7134 on redox and biochemical parameters in chicken blood. **Annals of animal science**, v. 17, n. 4, p. 1075-1088, 2017.

OH, S. T. *et al.* Effects of dietary fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 1, p. 95, 2015.

OLIVO, R. *et al.* Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal of Food Biochemistry**, v.25, n.4, p.271-283, 2001.

OLIVIO, R.; GUARNIERI, P. D.; SHIMOKOMAKI, M. Fatores que influenciam na cor de files de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 25, n. 289, p. 44-49, 2001.

PALMA, S. F. **Transformação do músculo em carne: influência na qualidade da carne**. 2017.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut microbes**, v. 5, n. 1, p. 108-119, 2014.

PARK, J.H.; KIM, I.H. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. **Poultry Science**, p. 2054-2059. 2014.

PASARIN, D.; ROVINARU, C. Sources of carotenoids and their uses as animal feed additives-a review. **Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science**, v. 61, n. 2, 2018.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review, **3 Biotech**, v. 2, p. 115–125, 2012.

POTENÇA, A. *et al.* Perfil lipídico e maciez da carne de coxa e sobrecoxa de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes fontes lipídicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1774-1783, 2010.

PRABAKARAN, G. *et al.* Evaluation of Chemical Composition and In Vitro Antiinflammatory Effect of Marine Microalgae *Chlorella vulgaris*. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-8, 2018.

RANI, K.; SANDAL, N.; SAHOO, P. K. A comprehensive review on chlorella-its composition, health benefits, market and regulatory scenario. **The Pharma Innovation Journal**, p. 584-589, 2018.

REZVANI, M.; ZAGHARI, M.; MORAVEJ, H. A survey on *Chlorella vulgaris* effect's on performance and cellular immunity in broilers. **International Journal of Agricultural Science and Research**, v. 3, p. 9-15, 2012.

ROSTAGNO, H.S. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4.ed. Departamento de Zootecnia, UFV, Viçosa, MG, p.488, 2017.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAFI, C. *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SALVIA, S. *et al.* The Optimizing of Growth and Quality of *Chlorella vulgaris* as asuh feed supplement for Broiler. **International Journal On Advanced Science Engineering Information Technology**, p. 90-93. 2014.

SANTOS, F. R. *et al.* Desenvolvimento digestivo e aproveitamento energético em frangos de corte. **PUBVET**, v. 6, p. Art. 1369-1374, 2012.

SHANMUGAPRIYA, B. *et al.* Dietary administration of spirulina platensis as probiotics on growth performance and histopathology in broiler chicks. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 6, p. 2650-2653, 2015.

SILVA, J. *et al.* Chlorella. In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, p. 187-193, 2019.

SUGIHARTO, S. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 2, p. 99-111, 2016.

ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WŁOSEK, A.; JÓZEFIAK, D. Application of microalgae biomass in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, p. 663-672. 2015.

TOGASHI, C. K. *et al.* Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 2063-2068, 2007.

WU, Y. *et al.* Effects of dietary *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 supplementation on growth performance and cellular and humoral immune responses in broiler chickens. **Poultry science**, v. 98, n. 1, p. 150-163, 2018.

ZANDER, F.V.; MALLISON, E.T. **Principles of disease prevention and control**. In: CALNEX, B.W. Disease of Poultry. 4 ed. Ames: Iowa State University Press, p. 120-124, 1991.

ZHENG, A. *et al.* Proteome changes underpin improved meat quality and yield of chickens (*Gallus gallus*) fed the probiotic *Enterococcus faecium*. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1167, 2014.

ZHENG, L. *et al.* The Dietary Effects of Fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on Production Performance, Liver Lipids and Intestinal Microflora in Laying Hens. **Asian-australasian Journal Of Animal Sciences**, p. 261-266. 2012.

## 7 ARTIGO 2 – PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS ADICIONADAS DE FARINHA DE MICROALGA (*Chlorella vulgaris*) E PROBIÓTICO

### IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BROILER CHICKENS FED DIETS WITH MICROALGAE FLOUR (*Chlorella vulgaris*) AND PROBIOTIC

#### RESUMO

A microalga *Chlorella vulgaris* e o probiótico, alternativas naturais e funcionais, podem ser adicionados à ração a fim de melhorar a saúde das aves. A *Chlorella vulgaris* se destaca por ser constituída por componentes com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, e o probiótico é importante por manter equilibrada a microbiota intestinal, inibindo o desenvolvimento de patógenos. Objetivou-se avaliar a adição de diferentes níveis de inclusão de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico sobre as características imunológicas de frangos de corte. Foram utilizados 1.040 pintainhos de corte machos da linhagem Cobb, com um dia de idade, por um período de 42 dias. Os tratamentos experimentais consistiam na adição de diferentes níveis de inclusão da farinha de microalga *Chlorella vulgaris* (0; 0,25; 0,50 e 1%) associados ou não (0,02%) ao probiótico ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g de *Bifidobacterium bifidum*,  $2,6 \times 10^9$  UFC/g de *Enterococcus faecium*,  $1,3 \times 10^9$  UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* e  $3,6 \times 10^9$  UFC/g de *Bacillus subtilis*). Foi adotado um delineamento em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4X2 (níveis da inclusão de *Chlorella vulgaris* x inclusão ou não de probiótico). Os resultados mostram que houve redução do peso do baço aos 42 dias de idade nas aves alimentadas com probiótico e aumento linear do título de anticorpo natural anti-KLH IgY aos 13 dias de idade no soro das aves alimentadas com *Chlorella vulgaris*. Foi observada interação entre os aditivos, em que a adição de níveis crescentes de *Chlorella vulgaris* associados ao probiótico aumentou linearmente o anticorpo natural contra-KLH IgA aos 13 dias de idade, bem como nas aves alimentadas com 1% de *Chlorella vulgaris* e probiótico. Em relação aos anticorpos específicos anti-hemácia de carneiro, apenas as aves que receberam probiótico apresentaram menor título do anticorpo específico IgA no soro aos 21 dias de idade. Conclui-se que o probiótico proporcionou maior proteção às aves contra desafios sendo, portanto, eficiente em proteger a microbiota intestinal contra patógenos e manter a mesma equilibrada. A adição da microalga *Chlorella vulgaris*, assim como, a interação dos aditivos, foram benéficas ao sistema imune das aves aos 13 dias de idade, período em que o sistema imunológico é imaturo e os animais ainda não são imunocompetentes, em que favoreceram o desenvolvimento da resposta imune nas aves.

**Palavras-chave:** Aditivos. Anticorpos. Aves. Imunologia. Órgãos linfoides.

## ABSTRACT

The microalgae *Chlorella vulgaris* and the probiotic, natural and functional alternatives, can be added to the feed in order to improve the health of the birds. The *Chlorella vulgaris* stands out for its nutritional composition, for its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties, and probiotic is important for keeping the intestinal microbiota balanced, inhibiting the development of pathogens. Aimed to evaluate the addition of different levels of inclusion of *Chlorella vulgaris* microalgae flour associated or not with probiotic on the immunological characteristics of broilers. A total of 1,040 one-day-old male Cobb broiler chicks were used for a period of 42 days. The experimental treatments consisted of the addition of different levels of inclusion of *Chlorella vulgaris* microalgae flour (0, 0.25, 0.50 and 1%) associated or not (0.02%) with probiotic ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g of *Bifidobacterium bifidum*,  $2,6 \times 10^9$  UFC/g of *Enterococcus faecium*,  $1,3 \times 10^9$  UFC/g of *Lactobacillus acidophilus* and  $3,6 \times 10^9$  UFC/g of *Bacillus subtilis*). A randomized block design in a 4X2 factorial arrangement (levels of *Chlorella vulgaris* inclusion x inclusion or not of probiotic) was adopted. The results show that there was a reduction in spleen weight at 42 days of age in birds fed with probiotic and a linear increase in the title of natural anti-KLH IgY antibody at 13 days of age in the serum of birds fed with *Chlorella vulgaris*. An interaction was observed between the additives, in which the addition of increasing levels of *Chlorella vulgaris* associated with the probiotic linearly increased the natural anti-KLH IgA antibody at 13 days of age, as well as in birds fed with 1% *Chlorella vulgaris* and probiotic. Regarding specific sheep anti-red blood cell antibodies, only birds that received probiotic had lower title of IgA specific antibody in the serum at 21 days of age. It is concluded that the probiotic provided greater protection to birds against challenges, being, therefore, efficient in protecting the intestinal microbiota against pathogens and keeping it balanced. The addition of the microalgae *Chlorella vulgaris*, as well as the interaction of the additives, were beneficial to the immune system of the birds at 13 days of age, a period in which the immune system is immature and the animals are not yet immunocompetent, in which they favored the development of immune response in birds.

**Key words:** Additives. Antibody. Birds. Immunology. Lymphoid organs.

## Introdução

A produção avícola está diretamente relacionada com a sanidade, uma vez que o sistema imune protege a ave contra patógenos e dessa forma promove diminuição do estresse imunológico da ave, ocasionado pela exposição a um antígeno. Assim, menos nutrientes são utilizados para manter a homeostasia, sendo direcionados à produção animal (OLIVEIRA *et al.*, 2012), pois as reações do sistema imunológico são dependentes de energia e nutrientes para a formação de células e substâncias envolvidas no sistema de defesa do organismo do animal (CARDOSO; TESSARI, 2015).

A nutrição é fundamental para manter a homeostase dos animais, modulando o sistema imune e permitindo adequada resposta aos patógenos (PICKLER; HAYASHI, 2012), já que as aves a campo estão susceptíveis a diversos desafios imunitários (FUNARI JÚNIOR, 2008). O uso de aditivos, que são substâncias, microrganismos ou produto formulado adicionado intencionalmente, possuindo ou não valor nutritivo, que melhoram as características dos produtos destinados à alimentação animal, de acordo com a Instrução Normativa 44 de 15 de dezembro de 2015, afeta a saúde animal e conseqüentemente a produtividade (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018). Logo, o setor avícola tem buscado por aditivos naturais e funcionais por serem seguros, não tóxicos (BAI *et al.*, 2018) e por exercerem funções antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (HAYES *et al.*, 2017).

A resposta imune pode ser dividida em inata ou natural e adaptativa ou adquirida. Após o primeiro contato com patógeno, há o desenvolvimento da imunidade inata, como primeira resposta manifestada, evitando a multiplicação de microrganismos patogênicos (KAISER, 2010), sendo representada por barreiras químicas e físicas, como mucosas, cílios, secreções, macrófagos, heterófilos (ALMEIDA *et al.*, 2013), monócitos, células fagocíticas, células não linfóides e anticorpos naturais (IgM, IgA e IgY) (FERNANDES *et al.*, 2013).

A resposta imune adquirida age de forma lenta, por mecanismos de defesa específicos, que protegem o organismo contra invasores (EFR, 2004), sendo específica a um determinado patógeno, devolvendo então memória imunológica. Quando mediada por anticorpos, produzidos por linfócitos B, em resposta a um antígeno, é denominada imunidade humoral (PERINI *et al.*, 2010; CARDOSO; TESSARI, 2015) e quando mediada por linfócitos T, com ativação de células para destruição de antígenos (células T) é denominada imunidade celular (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Assim, a *Chlorella vulgaris*, microalga verde unicelular, pertence ao filo *Chlorophyta* (PRABAKARAN *et al.*, 2018), pode ser utilizada como um alimento funcional devido aos seus componentes (OH *et al.*, 2015), que exercem atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (PRABAKARAN *et al.*, 2018), ocasionando benefícios à saúde do animal (MADEIRA *et al.*, 2017), sendo constituída por elevado teor de proteína (PRABAKARAN *et al.*, 2018), ácido  $\alpha$ -linolênico (ácido graxo polinsaturados da família ômega 3), em torno de 27%, e

linoleico (ácido graxo polinsaturado da família ômega 6), em torno de 24% (FREITAS, 2017), e clorelina, substância que inibe microrganismos patogênicos (ABDELNOUR *et al.*, 2019).

Além disso, é composta por selênio (EL-ABD; HAMOUDA, 2017),  $\beta$ 1,3-glucano (MOON *et al.*, 2016), fibras (KIM; KANG, 2015) e polissacarídeos (PRABAKARAN *et al.*, 2018), como mananoligossacarídeo (REZVANI; ZAGHARI; MORAVEJ, 2012), ramnose, galactose, glicose, xilose, arabinose e manose (SAFI *et al.*, 2014), componentes prebióticos, que lhe confere atividade prebiótica (CHOI *et al.*, 2016).

A defesa imunológica também se relaciona com a microbiota intestinal, sendo que para o animal se desenvolver é preciso de uma microbiota equilibrada (MONFERDINI; DUARTE, 2010). Logo, o probiótico é utilizado como um aditivo natural, seguro e não tóxico (BAI *et al.*, 2018), composto de culturas únicas ou mistas de microrganismos vivos (ADHIKARI; KIM, 2017) não patogênicos (WU *et al.*, 2018), para proteger e manter a microbiota intestinal equilibrada (WU *et al.*, 2018), inibindo o desenvolvimento de patógenos (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018), além de estimular a resposta imune (MONFERDINI; DUARTE, 2010). Diversas espécies são utilizadas como probióticos, entre elas *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* (SUGIHARTO, 2016), *Bacillus subtilis* e *Bifidobacterium bifidum* (LUO *et al.*, 2013).

Assim, objetivou-se avaliar as características imunológicas de frangos de corte alimentados com dietas adicionadas de diferentes níveis de inclusão da microalga *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico (*Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus subtilis*).

## Material e métodos

Para a realização do experimento, foram utilizados 1.040 pintainhos de corte machos, da linhagem Cobb, com um dia de idade. As aves foram alocadas em boxes com dimensões de 2,10m<sup>2</sup>, em uma densidade de 12 aves por m<sup>2</sup> e receberam água e alimento *ad libitum* durante o período experimental de 42 dias, que foi dividido em quatro diferentes fases: pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8

a 21 dias de idade), crescimento (22 a 35 dias de idade) e terminação (36 a 42 dias de idade).

As rações experimentais consistiram em dietas adicionadas de diferentes níveis de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* (0; 0,25; 0,50 e 1%) associados ou não ao probiótico (0,02%), em que atenderam as exigências mínimas preconizadas por Rostagno *et al.* (2017) (Tabela 1). Para a formulação das rações, a composição nutricional da farinha da microalga *Chlorella vulgaris* foi considerada (Tabela 2) e o probiótico, produto comercial, por não possuir valor nutricional, foi adicionado na formulação como inerte na quantidade recomendada pelo fabricante, sendo constituído de *Bacillus subtilis* ( $3,6 \times 10^9$  UFC/g); *Bifidobacterium bifidum* ( $2,5 \times 10^9$  UFC/g); *Enterococcus faecium* ( $2,6 \times 10^9$  UFC/g) e *Lactobacillus acidophilus* ( $1,3 \times 10^9$  UFC/g). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), protocolo CEUA 10985.2019.33.

**Tabela 1** - Composição percentual e calculada das rações experimentais nas diferentes fases de criação.

Fases de criação	Pré-inicial				Inicial				Crescimento				Terminação			
Níveis <i>Chlorella vulgaris</i> (%)	0	0,25	0,50	1	0	0,25	0,50	1	0	0,25	0,50	1	0	0,25	0,50	1
<b>Ingredientes</b>																
Milho grão	51,69	51,89	52,09	52,48	53,94	54,13	54,33	54,72	61,44	61,64	61,83	62,23	67,90	68,10	68,29	68,69
Farelo de soja 46%	41,98	41,62	41,25	40,53	39,50	39,14	38,77	38,04	32,14	31,78	31,41	30,68	26,61	26,25	25,88	25,15
Calcário	0,94	0,95	0,96	0,98	0,86	0,87	0,88	0,90	0,74	0,75	0,76	0,78	0,71	0,72	0,73	0,75
Fosfato bicálcico	1,80	1,79	1,78	1,76	1,58	1,57	1,56	1,54	1,39	1,38	1,37	1,35	1,00	0,99	0,98	0,96
Óleo de soja	2,09	2,01	1,92	1,76	2,75	2,67	2,59	2,42	2,96	2,88	2,80	2,63	2,53	2,45	2,37	2,20
Sal comum	0,53	0,53	0,53	0,53	0,51	0,51	0,51	0,51	0,48	0,48	0,48	0,48	0,45	0,45	0,45	0,45
<sup>1</sup> Suplemento vitam. + min.	0,50	0,50	0,50	0,50	0,40	0,40	0,40	0,40	0,35	0,35	0,35	0,35	0,30	0,30	0,30	0,30
DL-Metionina	0,25	0,24	0,24	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23	0,21	0,21	0,20	0,20	0,18	0,18	0,18	0,18
L-Lisina HCL	0,14	0,13	0,13	0,13	0,15	0,15	0,14	0,14	0,21	0,21	0,20	0,20	0,24	0,23	0,23	0,22
L-Treonina	0,06	0,07	0,07	0,08	0,06	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,09	0,06	0,07	0,08	0,09
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,00	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	1,00
Inerte/probiótico	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total (kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Composição nutricional calculada</b>																
Cálcio (%)	0,97	0,97	0,97	0,97	0,88	0,88	0,88	0,88	0,76	0,76	0,76	0,76	0,63	0,63	0,63	0,63
Energia metab. (kcal/kg)	2,975	2,975	2,975	2,975	3,050	3,050	3,050	3,050	3,150	3,150	3,150	3,150	3,200	3,200	3,200	3,200
Fósforo disp. (%)	0,46	0,46	0,46	0,46	0,42	0,42	0,42	0,42	0,37	0,37	0,37	0,37	0,30	0,30	0,30	0,30
Lisina total (%)	1,44	1,44	1,44	1,44	1,38	1,38	1,38	1,38	1,24	1,24	1,24	1,24	1,12	1,12	1,12	1,12
Metionina total (%)	0,59	0,59	0,59	0,59	0,57	0,57	0,57	0,57	0,51	0,51	0,51	0,51	0,46	0,46	0,46	0,46
Treonina total (%)	0,99	0,99	0,99	0,99	0,96	0,96	0,96	0,96	0,86	0,86	0,86	0,86	0,77	0,77	0,77	0,77
Proteína bruta (%)	24,27	24,27	24,27	24,27	23,31	23,31	23,31	23,31	20,58	20,58	20,58	20,58	18,57	18,57	18,57	18,57
Sódio (%)	0,23	0,23	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico+mineral, quantidade/kg de ração: vit. A – 2.758.000UI/kg; vit. E – 689.000UI/kg; vit. B1 – 608mg/kg; vit. B2 – 1.655mg/kg; vit. B6 – 819mg/kg; vit. B12 – 4.150mcg/kg; vit. K3 – 537mg/kg; vit. D3 – 689UI/kg; pantotenato cálcio – 3.230mg/kg; niacina – 9.800mg/kg; ácido fólico – 200mg/kg; biotina – 20mg/kg; zinco – 12g/kg; ferro – 12g/kg; manganês – 14g/kg; cobre – 3.120mg/kg; iodo – 252mg/kg; cobalto – 76mg/kg; selênio – 75mg/kg; etoxiquim – 52mg/kg; B.H.A. – 40mg/kg; veículo Q. S. P. – 1.000mg/kg.

**Tabela 2** - Composição nutricional da microalga *Chlorella* em pó.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Matéria seca (%)	94,80
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.720
Proteína bruta (%)	60,60
Gordura (%)	12,80
Fibra bruta (%)	13,00
Cinzas (%)	4,50
Lisina (%)	4,88
Metionina (%)	1,20
Cálcio (%)	0,01
Fósforo (%)	1,06

**Fonte:** Kang *et al.* (2013, p.102 )

Aos 21 e 43 dias de idade duas aves por parcela experimental, que representavam o peso médio da parcela, foram pesadas e abatidas segundo o método preconizado por Zander; Mallison (1991), por meio da insensibilização elétrica. As aves foram necropsiadas para a coleta de órgãos linfoides (baço e bursa de Fabricius), em que os mesmos foram pesados, a fim de se obter o peso relativo destes órgãos, conforme Park; Kim (2014), e os valores foram expressos em porcentagem do peso vivo da ave.

Para as análises imunológicas, foram realizadas coletas de sangue de duas aves por parcela experimental para obtenção do soro aos 13 dias, 21 dias e 42 dias de idade e as amostras de soro foram armazenadas a -20°C até o momento de uso. Para avaliar a resposta imune humoral, duas aves de cada parcela experimental foram inoculadas via intramuscular com 5% de hemácia de carneiro em tampão fosfato-salina pH 7,2, sendo inoculados 200 µL em cada animal no 14° e 35° dias do experimento. Assim, as análises sorológicas para avaliar o título de anticorpos anti-hemácia de carneiro foram realizadas com os soros de 21 (após a primeira imunização) e 42 dias de idade (após a segunda imunização).

A hemácia de carneiro (HE) foi obtida por meio da coleta de um volume de sangue de carneiro armazenado em um mesmo volume de solução Alsever (4,2 g de NaCl, 8,0 g de citrato de sódio, 0,55 g de ácido cítrico e 20,5 g de glicose diluído em água deionizada). A seguir, o sangue foi centrifugado por dois minutos a 5.000 rpm, foi retirado o sobrenadante e as hemácias foram lavadas com salina (0,9%), centrifugadas e lavadas mais duas vezes com salina (0,9%). Depois

de centrifugar e retirar o sobrenadante, a solução de hemácia foi ajustada com salina (0,9%) para 5% para posterior inoculação nas aves.

O teste de anticorpos específicos contra hemácia de carneiro foi realizado por meio do teste de ELISA em microplacas de 96 poços, com fundo chato, sensibilizadas com antígeno HE (367 µg/ml), na concentração de 0,5 µg/ml, e armazenadas em câmara úmida a 4°C *overnight*. No dia seguinte, foi realizado o bloqueio com 125 µL de PBS leite 5% em cada poço e a placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada com 200 µL de PBS 1X, 100 µL de amostra de soro diluídas em PBS leite 1% (1:80) foram colocadas nos poços e a placa foi armazenada em estufa por uma hora. Após, a placa foi lavada três vezes com 200 µL de PBS Tween 0,05%, e na sequência foi colocado 100 µL por poço do conjugado a uma diluição de 1:1000 (anti-IgY, anti-IgM ou anti-IgA (1:25) diluído em PBS leite 1%), incubando a placa na estufa por uma hora. Em seguida, realizou-se três lavagens com 200 µL de PBS Tween 0,05% e foi colocado 100 µL por poço do substrato (TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + tampão citrato) seguido de incubação da placa à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a densidade óptica foi determinada por meio da leitura em espectrofotômetro a 450 nm. Para a determinação do título de anticorpos naturais anti-KLH, foram utilizados os soros das aves com 13, 21 e 42 dias de idade, seguindo os mesmos procedimentos da análise de títulos de anticorpos específicos contra hemácia de carneiro, porém as placas foram sensibilizadas com KLH (*Keyhole limpet hemocyanin* a 5000 µg/ml), na concentração de 10 µg/ml, e as amostras de soro foram diluídas 1:40 em PBS leite 1%.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 4X2, com quatro níveis de inclusão de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* (0; 0,25; 0,50; 1%) associados ou não à adição de probiótico, com cinco repetições e 26 aves por parcela experimental. Os dados obtidos para peso relativos dos órgãos linfoides foram analisados por meio do programa estatístico R e os títulos de anticorpos específicos contra hemácia de carneiro e anticorpos naturais anti-KLH foram transformados segundo a equação  $\sqrt{x+0,5}$ , a fim de atender os pressupostos básicos exigidos para a análise de variância, e analisados por meio do programa estatístico SISVAR. Foi aplicada análise de regressão para os diferentes níveis de inclusão de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* e análise de variância (Teste F) para o fator probiótico a um nível de significância de 5%.

O desdobramento dos níveis de *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico e do fator probiótico associado ou não aos níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* foi realizado quando a interação entre os níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* e probiótico foi significativa para identificar o comportamento das respostas, sendo para isso, utilizada análise de regressão para os diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris*, em que as equações de regressão (linear ou quadrática) foram determinadas, e análise de variância (Teste F) para o fator probiótico.

### **Resultados e discussão**

Os resultados da adição dos diferentes níveis de *Chlorella vulgaris* e/ou probiótico na alimentação de frangos de corte sobre o peso dos órgãos linfoides baço e bursa de Fabricius (Tabela 3) mostram que aos 21 dias de idade nenhum tratamento exerceu efeito significativo sobre o peso de ambos os órgãos linfoides.

Aos 43 dias de idade, é possível observar que os diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* não influenciaram no peso dos órgãos linfoides ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a adição de probiótico proporcionou um menor (18%) peso do baço ( $p < 0,05$ ), sem alterar o peso da bursa de Fabricius.

**Tabela 3** - Peso relativo dos órgãos linfoides (baço e bursa de Fabricius) de frangos de corte aos 21 e 43 dias de idade alimentados com rações contendo diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* (Alga) e/ou probiótico.

Parâmetros (%)	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alga)				Probiótico			p-valor		
	0%	0,25%	0,50%	1,00%	Sem	Com	CV (%)	Alga	Probiótico	Alga x Probiótico
21 dias de idade										
Baço	0,14	0,13	0,14	0,15	0,14	0,14	18,54	0,221	0,881	0,200
bursa de Fabricius	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,22	22,37	0,825	0,716	0,611
43 dias de idade										
Baço	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,09	16,78	0,927	0,036	0,722
bursa de Fabricius	0,16	0,15	0,16	0,15	0,16	0,15	18,76	0,551	0,581	0,480

Médias comparadas à diferença significativa de 5% de significância pelo teste F.

CV = Coeficiente de Variação.

Estes resultados mostram que o sistema linfoide primário (bursa de Fabrícus), responsável pelo desenvolvimento e maturação dos linfócitos, sendo a Bursa de Fabricius o local onde ocorre o desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos (BASTOS, 2015), não foi influenciado pelos diferentes tratamentos. Entretanto, o sistema linfoide secundário (baço) foi afetado pela inclusão do probiótico, que proporcionou um menor peso relativo deste órgão ( $p < 0,05$ ) aos 43 dias de idade, visto que o sistema linfoide secundário exerce a função de capturar antígenos, estimulando os linfócitos B e células T, a fim de desenvolver uma imunidade inespecífica e geral (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004), e é no baço que reações contra antígenos transportados no sangue acontecem (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A diminuição no peso do baço pode estar relacionada ao equilíbrio e proteção da microbiota intestinal pelo probiótico (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018), que age por meio da disputa pelos sítios de ligação no epitélio intestinal, competição por nutrientes, produção de substâncias bacteriostáticas (DERAZ; ELKOMY; KHALIL, 2019), bem como pela produção de bacteriocinas, compostos tóxicos aos patógenos, e pela estimulação do sistema imune (AL-KHALAIFAH, 2018), mantendo a integridade da mucosa intestinal, a qual é uma barreira contra a colonização de microrganismos patogênicos (ASML *et al.*, 2015) e, desta forma, promove proteção contra toxinas e patógenos, evitando inflamações (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2018). Com a exposição de desafios reduzida, o baço não é exigido e conseqüentemente não precisa se hipertrofiar em resposta aos antígenos.

A manutenção deste equilíbrio proporcionado pelo probiótico é fundamental, pois o intestino é o maior órgão imunológico do corpo animal, visto que 25% da sua mucosa é composta por tecido linfoide, e ainda 70% do sistema imunológico do corpo está localizado no intestino (JOHNSON, 1987). Além disso, manter uma microbiota composta por microrganismos benéficos auxilia na ativação das respostas adaptativas e inatas, e para o desenvolvimento e formação do sistema imune intestinal (AL-KHALAIFAH, 2018).

Com a integridade intestinal estabelecida, não ocorre transferência de bactérias e seus produtos metabólicos para a circulação e, portanto, não há resposta inflamatória, o que favorece a produção animal, pois para que esta resposta inflamatória ocorra é preciso de energia e nutrientes para a formação de células e substâncias componentes do sistema de defesa do organismo do animal

(CARDOSO; TESSARI, 2015), não sendo direcionados para a produção animal (OLIVEIRA *et al.*,2012).

A inclusão de *Chlorella vulgaris* não demonstrou efeito significativo sobre o peso dos órgãos linfoides avaliados ( $p>0,05$ ), assim como no resultado obtido por An *et al.* (2016), que ao estudarem à adição de *Chlorella vulgaris* (0,05, 0,15 e 0,5%) na dieta de frangos de corte, também observaram que a inclusão da *Chlorella vulgaris* não afetou o peso da bursa de Fabricius e do baço. Isto pode sugerir que as condições de desafios reduzidas e os níveis de adição da alga estudados não foram fatores suficientes para que a microalga manifestasse efeito no peso dos órgãos linfoides.

Para o título de anticorpos naturais anti-KLH, avaliados aos 13, 21 e 42 dias de idade, e anti-hemácia de carneiro pós-primeira imunização (21 dias) e pós-segunda imunização (42 dias) (Tabela 4), é possível observar que houve efeito ( $p<0,05$ ) apenas para o título do anticorpo natural anti-KLH IgY, aos 13 dias de idade, em que a adição da alga aumentou linearmente ( $y= 0,0221 + 0,0341x$ ) a produção desta imunoglobulina. Também é observada interação significativa entre os níveis de inclusão da *Chlorella vulgaris* com o probiótico sobre o título do anticorpo natural anti-KLH IgA, aos 13 dias de idade (Tabela 5), em que o tratamento com probiótico e diferentes níveis de alga proporcionou um aumento linear no título do anticorpo natural IgA, e com o fornecimento de 1% da alga o tratamento com probiótico ocasionou um aumento de 450% na produção de IgA. Porém, não houve influência dos tratamentos ( $p>0,05$ ) sobre o título de anticorpos naturais anti-KLH aos 21 e 42 dias de idade.

Aos 21 dias de idade, a adição do probiótico ocasionou efeito significativo sobre o título de anticorpo específico contra hemácia de carneiro IgA, em que houve diminuição da produção desta imunoglobulina. Os tratamentos não proporcionaram efeito significativo sobre o título de anticorpos anti-hemácia de carneiro aos 42 dias de idade.

**Tabela 4** - Título de anticorpos naturais aos 13, 21 e 42 dias de idade e título de anticorpos anti-hemácia de carneiro aos 21 e 42 dias de idade em frangos alimentados com rações contendo diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* (Alga) e/ou probiótico.

Parâmetros	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alga)				Probiótico			p-valor		
	0%	0,25%	0,50%	1,00%	Sem	Com	CV (%)	Alga	Probiótico	Alga X Probiótico
Título de anticorpos naturais										
13 dias										
IgY	0,02	0,04	0,04	0,06	0,04	0,04	2,28	0,024*	0,608	0,919
IgM	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	2,69	0,663	0,606	0,775
IgA	0,03	0,02	0,02	0,05	0,02	0,04	2,89	0,126	0,115	0,026
21 dias										
IgY	0,10	0,11	0,09	0,08	0,10	0,09	4,56	0,669	0,623	0,364
IgM	0,13	0,14	0,12	0,12	0,13	0,12	4,50	0,852	0,757	0,640
IgA	0,34	0,19	0,18	0,26	0,29	0,19	14,99	0,481	0,256	0,349
42 dias										
IgY	0,33	0,30	0,33	0,34	0,35	0,30	8,88	0,926	0,269	0,980
IgM	0,23	0,25	0,28	0,30	0,28	0,25	5,62	0,306	0,440	0,319
IgA	0,76	0,47	0,56	0,56	0,60	0,57	16,42	0,343	0,787	0,943
Título de anticorpos anti-hemácia de carneiro										
21 dias										
IgY	0,12	0,15	0,13	0,10	0,11	0,13	15,58	0,730	0,641	0,824
IgM	0,03	0,003	0,008	0,002	0,02	0,002	4,64	0,471	0,134	0,381
IgA	0,06	0,02	0,01	0,01	0,05	0,03	8,79	0,172	0,017	0,386
42 dias										
IgY	0,42	0,43	0,28	0,48	0,41	0,39	17,27	0,556	0,948	0,131
IgM	0,61	0,56	0,57	0,66	0,62	0,59	11,63	0,831	0,801	0,287
IgA	0,60	0,30	0,69	0,60	0,49	0,61	22,27	0,348	0,414	0,966

Médias comparadas à diferença significativa de 5% de significância pelo teste F.

CV = Coeficiente de Variação.

\*Efeito linear:  $y = 0,0221 + 0,0341x$   $R^2: 0,947$

**Tabela 5** - Desdobramento da interação entre os níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* associados ou não ao probiótico para o título de anticorpo natural IgA aos 13 dias de idade.

Níveis <i>Chlorella vulgaris</i> (%)	Sem probiótico	Com probiótico*
0	0,03	0,02
0,25	0,01	0,03
0,50	0,02	0,01
1,00	0,02b	0,09a

\*Efeito linear:  $y = 0,0110 + 0,0622x$   $R^2: 0,659$

A microalga *Chlorella vulgaris* possui componentes que contribuem com o sistema imune das aves, como o alto teor de ácidos graxos polinsaturados essenciais, que possibilitam a produção de imunoglobulinas por meio da modulação da expressão de citocinas (KANG *et al.*, 2013) e influencia na resposta imune e inflamatória (PERINI *et al.*, 2010), prevalecendo altos teores de ácido  $\alpha$ -linolênico (FREITAS, 2017), sendo que os ácidos graxos da família ômega 3 reduzem a formação de eicosanoides com características inflamatórias e com ocorrência de distúrbios imunológicos (BORGES *et al.*, 2014).

Outro componente que contribui com a resposta imune é o  $\beta$ -1,3-glucano (SAFI *et al.*, 2014), o qual possui propriedades imunomoduladoras, sendo reconhecido por receptores da superfície celular em células imunes, constituindo um padrão molecular associado a patógenos, e dessa forma ativa macrófagos e células dendríticas, além de outras células imunes (LEVINE *et al.*, 2018), e ainda pode aumentar a produção de anticorpos devido à ativação de linfócitos B (MOON *et al.*, 2016).

A *Chlorella vulgaris* também contém a substância clorelina, que inibe microrganismos patogênicos, melhorando a saúde das aves (ABDELNOUR *et al.*, 2019), e pode aumentar a produção de interferon (IFN)  $\gamma$  e interleucina (IL) -2, o que ocasiona aumento da produção de IgA (SUGIHARTO; LAURIDSEN, 2016). Esta alga também possui em sua composição fibras (KIM; KANG, 2015) e polissacarídeos (PRABAKARAN *et al.*, 2018), como mananoligossacarídeo (REZVANI; ZAGHARI; MORAVEJ, 2012), ramnose, galactose, glicose, xilose, arabinose e manose (SAFI *et al.*, 2014), os quais lhe conferem atividade prebiótica (CHOI *et al.*, 2016).

Os prebióticos contribuem com o equilíbrio da microbiota intestinal (LEMOS *et al.*, 2016) por estimularem o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, ocasionando benefícios ao sistema imune das aves, pois estas bactérias produzem substâncias imunoestimulatórias (lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicoicos) que estimulam a produção de citocinas, e síntese de imunoglobulinas (SILVA; NÖRNBERG, 2003). Este efeito pode ser comprovado pelo desdobramento da interação entre os diferentes níveis de inclusão da microalga *Chlorella vulgaris* e probiótico para o título de anticorpo natural anti-KLH IgA, pelo qual observa-se que a inclusão de níveis crescentes da alga associada ao probiótico na ração das aves aumentou linearmente esta imunoglobulina no soro das aves, como a associação do probiótico com 1% de inclusão da *Chlorella vulgaris*, pois os probióticos também estimulam a produção de IgA, induzem plasmócitos a secretarem IgA, por serem transferidos aos linfócitos intra-epiteliais, podendo simular antígenos (BUSANELLO *et al.*, 2012).

Assim, a microalga *Chlorella vulgaris*, por conter estes constituintes, contribuiu com o aumento da resposta imune inata das aves, pelo aumento do título de anticorpo natural anti-KLH IgY, sendo esta imunoglobulina abundante no soro e fundamental para a defesa contra infecções sistêmicas (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002). O aumento da resposta imune evita a multiplicação de patógenos, já que as aves, por volta dos 14 dias de idade, apresentam diminuição da imunidade materna e começam a se tornar imunocompetentes. Portanto, nesta fase, é importante que o sistema imune esteja eficiente para o reconhecimento de patógenos, permitindo que ave desenvolva resposta imune para sobreviver diante de desafios (SMITH; MITCHELL; PEACOCK, 1990).

No entanto, a inclusão da alga não influenciou no título de anticorpos naturais anti-KLH IgM e IgA aos 13, e IgY, IgM e IgA aos 21 e 42 dias de idade, assim como, o probiótico não causou efeito significativo no título de anticorpos naturais aos 13, 21 e 42 dias de idade. Este resultado pode sugerir que houve poucos desafios e condições estressoras do ambiente para desencadear uma resposta imune contra patógenos, contribuindo com o estado sanitário das aves, visto que a imunoglobulina IgM é produzida durante a resposta imune primária, surgindo logo após um processo infeccioso (BASTOS, 2015).

Em relação ao título de anticorpos anti-hemácia de carneiro, aos 21 dias de idade, apenas o probiótico ocasionou efeito sobre a imunidade humoral,

diminuindo a produção de IgA. Como esta imunoglobulina surge após uma infecção, isto sugere que, mesmo com a imunização com a hemácia de carneiro, não houve alteração do sistema de defesa das aves, não induzindo ao estresse imunológico, ocasionado pela exposição da ave a um antígeno. Logo, o probiótico pode ter mantido o estado ideal de imunidade, pois por manter a integridade intestinal, sendo uma barreira contra patógenos, o probiótico evita que antígenos ocasionem resposta inflamatória (CARDOSO; TESSARI, 2015), sendo a imunidade estimulada quando há uma resposta inflamatória, o que acarreta na produção de imunoglobulinas. Também não houve efeito significativo para a interação entre os aditivos.

Aos 42 dias, com a inoculação do antígeno os diferentes tratamentos não causaram efeito significativo sobre a produção de imunoglobulinas, bem como não houve interação entre os diferentes níveis de inclusão de *Chlorella vulgaris* com o probiótico, visto que nesta fase as aves já possuem sistema imune totalmente formado e são imunocompetentes.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As aves alimentadas com ração adicionada de farinha da microalga *Chlorella vulgaris* apresentaram aumento da produção do anticorpo natural anti-KLH IgY aos 13 dias de idade, contribuindo com o desenvolvimento da resposta imune inata em uma fase que o sistema imune ainda é imaturo, sendo que os animais ainda não são imunocompetentes. O probiótico foi eficiente em proteger e manter a microbiota intestinal equilibrada, uma vez que proporcionou maior proteção às aves contra desafios aos 43 dias de idade, além de diminuir a produção de anticorpo específico anti-hemácia de carneiro IgA aos 21 dias de idade.

A associação entre os diferentes níveis de inclusão da *Chlorella vulgaris* com o probiótico foi benéfica ao sistema de defesa das aves, visto que aumentou a produção do anticorpo natural anti-KLH IgA aos 13 dias de idade. Assim, há a necessidade de futuros estudos que possam abordar a interação da *Chlorella vulgaris* com o probiótico, e que utilizem maiores níveis de adição da *Chlorella vulgaris* e probiótico nas dietas a fim de melhor comprovar seus efeitos no sistema imune, além de melhor identificar como o probiótico e a microalga agem no

sistema imune das aves e quais os fatores que interferem nos efeitos ocasionados pelos aditivos.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**, 4th ed. Philadelphia: **WB Saunders**, p. 553, 2000.

ABDELNOUR, S. A. *et al.* The application of the microalgae *Chlorella* spp. as a supplement in broiler feed. **World's Poultry Science Journal**, v. 75, n. 2, p. 305-318, 2019.

ADHIKARI, P. A.; KIM, W. K. Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity—a review. **Annals of animal science**, v. 17, n. 4, p. 949-966, 2017.

AL-KHALAIFAH, H. S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. **Poultry science**, v. 97, n. 11, p. 3807-3815, 2018.

ALMEIDA, J.M. *et al.* **Importância da imunidade nas aves the importance of the immunity in poultry**. III Simpósio de Sustentabilidade e Ciência Animal. 2013.

AN, B-K. *et al.* Effect of dried *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* growth factor on growth performance, meat qualities and humoral immune responses in broiler chickens. **Springerplus**, p. 1-7. 2016.

ASML, A. *et al.* The beneficial role of probiotics in monogastric animal nutrition and health. **Journal of Dairy Veterinary & Animal Research**, v. 2, p. 116-132, 2015.

BAI, K. *et al.* Dietary effects of *Bacillus subtilis* fmbj on growth performance, small intestinal morphology, and its antioxidant capacity of broilers. **Poultry Science**, p. 1-10. 2018.

BASTOS, A.P.A. Imunologia envolvida em aves: Embrapa suínos e aves - artigo em anais de congresso. In: seminário técnico científico de aves e suínos, 16; feira da indústria de produção, processamento e proteína animal - FIPPPA, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Gessulli, p. 1 - 8. 2015.

BORGES, M.C. *et al.* Ácidos graxos polinsaturados ômega-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, p.460-466, dez. 2014.

BUSANELLO, M. *et al.* Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 4, p. 14-24, 2012.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Interação entre imunidade e nutrição das aves: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Descalvado, v. 24, p.1-20, 2015.

CHENG, J. *et al.* The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1290, 2016.

CHOI, H. *et al.* Effects of dietary recombinant chlorella supplementation on growth performance, meat quality, blood characteristics, excreta microflora, and nutrient digestibility in broilers. **Poultry Science**, p. 1-7. 2016.

DERAZ, S. F.; ELKOMY, A. E.; KHALIL, A. A. Assessment of probiotic-supplementation on growth performance, lipid peroxidation, antioxidant capacity, and cecal microflora in broiler chickens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. S1, p. 030-039, 2019.

EL-ABD, M. N.; HAMOUDA, A. R. Improved productivity and health of broiler chicken by micro green alga *Chlorella vulgaris*. **Asian Journal of Poultry Science**, v. 11, p. 57-63, 2017.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**. Arkansas, p. 580-590. 2004.

FERNANDES, D. C. *et al.* Biologia do sistema imune de aves. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 5, p. 131-140, 2013.

FREITAS, H. R. *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids and micronutrients: A brief commentary. **The Open Plant Science Journal**, v. 10, n. 1, 2017.

FUNARI JÚNIOR, P. **Efeitos de diferentes fontes e níveis de selênio sobre o desempenho e a imunidade humoral de frangos de corte**. Dissertação (mestrado)- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2008.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. **Simpósio técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição**, v. 5, p. 6-28, 2004.

HAYES, M., *et al.* Microalgal proteins for feed, food and health. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**. Woodhead Publishing, p.347-368, 2017.

JOHNSON, L.R. Physiology of gastrointestinal tract. **New York**: Raven, 1800p. 1987.

KAISER, P. Advances in avian immunology -prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v.39, n.5, p.309-324, 2010.

KANG, H.K. *et al.* Effect of various forms of dietary Chlorella supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. **The Journal Of Applied Poultry Research**, p. 101-108. 2013.

KIM, C.H.; KANG, H.K. Effect of dietary supplementation with a chlorella by-product on the performance, immune response and metabolic function in laying hens. **Poultry Science**, p. 1-10. 2015.

LEMOS, M.J. *et al.* Uso de aditivo alimentar equilibrador da flora intestinal em aves de corte e de postura. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, p.1-7, 2016.

LEVINE, R. *et al.* Evaluation of the effects of feeding dried algae containing beta-1, 3-glucan on broilers challenged with *Eimeria*. **Poultry science**, v. 97, n. 10, p. 3494-3500, 2018.

LUO, J. *et al.* Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*. **Journal of proteomics**, v. 91, p. 226-241, 2013.

MACARI, M.; FURLAN, R.R.; GONZALES, E. **Fisiologia aplicada a frangos de corte**. 2 ed. São Paulo: FUNEP, 2002.

MADEIRA, M. S. *et al.* Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. **Livestock Science**, v. 205, p. 111-121, 2017.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. **Journal Of Biological Engineering**, p.1-20. 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA (Brasil). **Instrução Normativa, 44 de 15 de dezembro de 2015**.

MONFERDINI, R.; DUARTE, K. M. R. Uso de probióticos na produção animal. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 944-950, 2010.

MOON, S. H. *et al.* Effect of dietary beta-glucan on the performance of broilers and the quality of broiler breast meat. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 3, p. 384, 2016.

OH, S. T. *et al.* Effects of dietary fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 1, p. 95, 2015.

OLIVEIRA, M.D. *et al.* Aditivos alternativos na alimentação de aves. **Pubvet**, v. 6, p.1-32, 2012.

PARK, J.H.; KIM, I.H. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. **Poultry Science**, p. 2054-2059. 2014.

PERINI, J. A. de L. *et al.* Ácidos graxos polinsaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de nutrição**, p. 1075-1086, 2010.

PICKLER, L.; HAYASHI, R.M. Imunidade e aditivos nutricionais no controle de *Salmonella*. **Aveworld**, Campinas, v.10, n.58, p.58-61, 2012.

PRABAKARAN, G. *et al.* Evaluation of Chemical Composition and In Vitro Antiinflammatory Effect of Marine Microalgae *Chlorella vulgaris*. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-8, 2018.

REZVANI, M.; ZAGHARI, M.; MORAVEJ, H. A survey on *Chlorella vulgaris* effect's on performance and cellular immunity in broilers. **International Journal of Agricultural Science and Research**, v. 3, p. 9-15, 2012.

ROSTAGNO, H.S. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4.ed. Departamento de Zootecnia, UFV, Viçosa, MG, p.488, 2017.

SAFI, C. *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SALVIA, S. *et al.* The Optimizing of Growth and Quality of *Chlorella vulgaris* as asuh feed supplement for Broiler. **International Journal On Advanced Science Engineering Information Technology**, p. 90-93. 2014.

SILVA, L. P. da; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.

SMITH, M. W.; MITCHELL, M. A.; PEACOCK, M. A. Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97 A, n. 1, p. 57-63, 1990.

SUGIHARTO, S. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 2, p. 99-111, 2016.

SUGIHARTO, S.; LAURIDSEN, C. Dietary *Chlorella* supplementation effect on immune responses and growth performances of broiler chickens exposed to post hatch holding time. **Livestock Research for Rural Development**, 2016.

ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WŁOSEK, A.; JÓZEFIAK, D. Application of microalgae biomass in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, p. 663-672. 2015.

WU, Y. *et al.* Effects of dietary *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 supplementation on growth performance and cellular and humoral immune responses in broiler chickens. **Poultry science**, v. 98, n. 1, p. 150-163, 2018.

ZANDER, F.V.; MALLISON, E.T. **Principles of disease prevention and control**. In: CALNEX, B.W. *Disease of Poultry*. 4 ed. Ames: Iowa State University Press, p. 120-124, 1991.

## 8 CONCLUSÕES

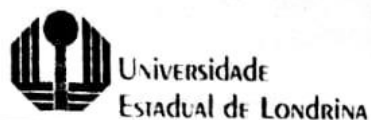
O desempenho zootécnico das aves apenas período pré-inicial foi melhorado com a adição da farinha de microalga *Chlorella vulgaris*, afetando positivamente a produtividade das aves em uma fase que o sistema digestório do pintainho é imaturo do ponto de vista funcional. Quanto a qualidade da carne, a alga demonstrou potencial quanto corante natural, aumentando a intensidade de amarelo na carne do peito, bem como contribuiu com a maior deposição dos ácidos graxos  $\alpha$ -linolênico e linoleico sem afetar a estabilidade oxidativa da carne, além de diminuir a relação entre ácidos graxos polinsaturados  $\omega$ 6/ $\omega$ 3. A alga também proporcionou aumento da resposta imune inata aos 13 dias de idade, fase em que os pintainhos ainda não são imunocompetentes.

Quando adicionado probiótico na ração das aves, no período de um a 35 dias e no período total de criação, o desempenho zootécnico foi melhorado, assim como o sistema de defesa das aves contra desafios, comprovando seu potencial em manter a integridade intestinal, porém não proporcionou melhora na qualidade da carne.

O sinergismo entre os aditivos promoveu aumento no ganho de peso na fase pré-inicial e melhora na produtividade das aves no período total de criação com a associação do probiótico com 0,25% de *Chlorella vulgaris*, demonstrando a atividade prebiótica da alga. Ainda, a associação dos aditivos afetou positivamente o desenvolvimento do sistema de defesa das aves aos 13 dias de idade.

**ANEXOS**

**ANEXO A**  
Comissão de Ética no Uso de Animais



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**OF. CIRC. CEUA N° 92/2019**

Londrina, 06 de agosto de 2019.

**Prezado (a) professor (a),**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Efeito da inclusão de probiótico e diferentes níveis de farinha de microalga (*Chlorella vulgaris*) na nutrição de frangos de corte**" protocolo CEUA n° 10985.2019.33 sob a responsabilidade de **Alexandre Oba**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **23/07/2019**.

Este projeto tem por objetivo avaliar o efeito ocasionado pela inclusão de probiótico e de diferentes percentuais de inclusão da farinha de microalga *Chlorella vulgaris* sobre a qualidade da carne, microbiota intestinal, sistema imunológico e desempenho de frangos de corte. Grau de invasividade: 1.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	19/08/2019 a 01/10/2019
Especie linhagem raça	Ave (Cobb)
N° de animais	1040
Peso Idade	48g 1 dia
Sexo	Machos
Origem	Incubatório Avesingá
Amostras a serem coletadas	Sangue, ceco, órgãos linfoides (baço e bursa de Fabricius).

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira  
Vice-Coordenador da CEUA/UEL

**Hmo.(a) Sr.(a)**  
**Prof. (a) Dr (a). Alexandre Oba**  
**Responsável pelo projeto**  
Departamento de Zootecnia/CCA  
C.C para a Chefia do Depto. de Zootecnia/CCA  
C.C para a Direção de Centro do CCA