

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Nível sanguíneo de carotenoides totais como biomarcador de funcionalidade
intestinal em ensaios experimentais com frangos de corte

Letícia Cardoso Bittencourt

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2023

Leticia Cardoso Bittencourt
Médica Veterinária

**Nível sanguíneo de carotenoides totais como biomarcador de funcionalidade intestinal
em ensaios experimentais com frangos de corte**
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Bittencourt, Leticia Cardoso.

Nível sanguíneo de carotenoides totais como biomarcador de funcionalidade intestinal em ensaios experimentais com frangos de corte / Leticia Cardoso Bittencourt. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

43 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Biomarcadores 2. Sanguíneo 3. Funcionalidade intestinal 4. Invasividade I. Título

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Carotenoides.....	8
1.2. Eimerias.....	8
1.3. Desafios por eimerias e absorção de carotenoides	9
1.4. Mecanismos de absorção e biodisponibilidade de carotenoides	10
1.5. Biomarcador de eficiência digestiva.....	10
1.6. Integridade, permeabilidade e inflamação de mucosa intestinal.....	10
1.7. Justificativa, hipóteses e objetivos.....	11
Referências.....	12
2. ETAPA 1 – DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE FRANGOS DE CORTE EM UMA SÉRIE DE ENSAIOS EXPERIMENTAIS	15
Resumo.....	15
Abstract	15
2.1. Introdução	15
2.2. Material e Métodos	16
2.2.1. Experimento de Campo 1	18
2.2.2. Experimento de Campo 2	19
2.2.3. Experimento de Campo 3	19
2.2.4. Experimento de Campo 4	19
2.2.5. Experimento de Campo 5	20
2.2.6. Experimento de Campo 6	20
2.2.7. Experimento de Campo 7	21
2.2.8. Análise Estatística.....	21
2.3. Resultados e Discussão.....	22
2.4. Conclusão.....	24
Referências.....	24
3. ETAPA 2 – CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE CAROTENOIDES TOTAIS COM OUTRA METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE INTESTINAL.....	25

Resumo.....	25
Abstract	25
3.1. Introdução	25
3.3.1. Permeabilidade de mucosa intestinal – método FITC-d	26
3.2. Material e Métodos	27
3.2.1. Experimento de campo 1 – etapa 2.....	29
3.2.2. Experimento de campo 2 – etapa 2.....	29
3.2.3. Experimento de campo 3 – etapa 2.....	29
3.2.4. Análise Estatística.....	30
3.3. Resultados e Discussão.....	30
3.4. Conclusão.....	33
Referências.....	33
4. ETAPA 3 – RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE CAROTENOIDES COM O USO DE ADITIVOS NUTRICIONAIS E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO – UMA ABORDAGEM DE APRENDIZADO DE MÁQUINA.....	35
Resumo.....	35
Abstract	35
4.1. Introdução	35
4.2. Material e Métodos	36
4.2.1. Análise Estatística.....	36
4.3. Resultados e Discussão.....	37
4.3.1. Influência dos aditivos nutricionais na absorção dos carotenoides.....	37
4.3.2. Relação da absorção dos carotenoides com desempenho zootécnico.....	38
4.4. Conclusão.....	40
Referências.....	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

RESUMO

Nível sanguíneo de carotenoides totais como biomarcador de funcionalidade intestinal em ensaios experimentais com frangos de corte

Identificar biomarcadores para avaliação de funcionalidade gastrointestinal de frangos de corte é hoje o grande desafio de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. O objetivo principal deste trabalho foi a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte, mensurada através de um método analítico pouco invasivo, rápido e de baixo custo, como um potencial biomarcador para avaliação da funcionalidade intestinal de frangos de corte em ensaios experimentais. Para atingir os objetivos descritos o estudo seguiu por 3 etapas: (1) Determinação dos níveis sanguíneos de carotenoides totais em diferentes ensaios experimentais, cujo objetivo foi verificar o comportamento deste biomarcador no sangue de frangos de corte recebendo diferentes aditivos melhoradores da saúde intestinal em sete diferentes estudos; as determinações sanguíneas foram realizadas no mesmo dia da coleta, usando o equipamento iCheck™ CAROTENE. O método e equipamentos utilizados demonstraram ser de fácil aplicação, pouco invasivo e respondeu aos tratamentos que foram aplicados, ou seja, as aves que receberam algum aditivo nutricional, que promove influência na manutenção da funcionalidade intestinal, mostraram maior capacidade de absorção dos carotenoides refletidos nos níveis sanguíneos ($P < 0.05$); (2) Correlação dos níveis sanguíneos de carotenoides totais com outra metodologia de avaliação de integridade intestinal, o método *Fluorescein Isothiocyanate Dextran* (FITC-d). Esperava-se uma correlação linear negativa entre os métodos, porém, os dados se comportaram de forma muito distinta entre as duas metodologias aplicadas, não sendo possível demonstrar uma relação direta entre os marcadores; uma vez que o FITC-d avalia a permeabilidade das junções celulares da mucosa intestinal, os carotenoides alcançam um espectro mais amplo, indicando a funcionalidade intestinal das aves. Desta forma, o método de mensuração dos carotenoides totais no sangue com o uso do equipamento portátil mostrou-se ser mais simples, rápido e de menor custo, além de apresentar menor coeficiente de variação, podendo desta forma ser aplicado em número maior de análises, associando-se as duas metodologias em etapas estratégicas das avaliações experimentais; (3) Determinar, com os dados gerados nas etapas 1 e 2, se a metodologia em estudo é uma potencial ferramenta para avaliações experimentais de aditivos nutricionais e se existe correlação entre o biomarcador em estudo com os dados de desempenho zootécnico. Para tal, foi realizada a avaliação da relação dos níveis de carotenoides sanguíneos com o uso de aditivos nutricionais e com os resultados de desempenho zootécnico utilizando-se uma abordagem de máquina. Foi possível observar que a inclusão de aditivo nutricional na dieta de frangos de corte submetidos ou não a desafio sanitário aumenta significativamente a concentração sanguínea de carotenoides totais em aves, independente do desenho experimental ou tratamento nutricional aplicado. A análise dos dados também mostrou presença de correlação moderada significativa entre o marcador carotenoide com o ganho de peso e negativa com conversão alimentar nos períodos de 0 a 35 e 0 a 42 dias de idade. Diante dos resultados das três etapas, foi possível concluir que a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte com o uso de um equipamento portátil é uma ferramenta eficiente e de baixo custo e pode ser considerado um potencial biomarcador para avaliações experimentais de aditivos nutricionais, pois indica que houve melhoria na funcionalidade intestinal, que está diretamente relacionada com a melhora em desempenho zootécnico.

Palavras-chave: Biomarcadores, Sanguíneo, Funcionalidade intestinal, Invasividade

ABSTRACT

Blood level of total carotenoids as a biomarker of intestinal functionality in broilers experimental trials

Identifying biomarkers for the evaluation of broilers gastrointestinal functionality currently is the great challenge of several research groups around the world. The main objective of this study was the determination of broilers total blood carotenoids, measured through a non-invasive, fast, and low-cost analytical method, is a potential biomarker for evaluating broiler intestinal functionality in experimental trials. To achieve the objectives described, the study followed 3 steps: (1) Determination of blood levels of total carotenoids in different experimental trials, whose objective was to verify the behavior of this biomarker in the blood of broilers receiving different additives that improve intestinal health in seven different studies; blood determinations were performed on the same day of collection, using the iCheck™ CAROTENE equipment; the method and equipment used proved to be easy to apply, little invasive and responded to the treatments that were applied, that is, the birds that received some nutritional additive, which promotes influence on the maintenance of intestinal functionality, showed greater absorption capacity of carotenoids reflected in blood levels ($P < 0.05$); (2) Correlation of blood levels of total carotenoids with another methodology for assessing intestinal integrity, in order to verify whether the method proposed in this study behaved similarly to the Fluorescein Isothiocyanate Dextran method (FITC-d); a negative linear correlation between the methods was expected, however, the data behaved very differently between the two methodologies applied, and it was not possible to demonstrate a direct relationship between the markers; FITC-d evaluates the permeability of the tight junctions of enterocytes, while carotenoids reach a broader spectrum, indicating the intestinal functionality of birds; Thus, the method of measuring total carotenoids in the blood with the use of portable equipment proved to be simpler, faster and of lower cost, in addition to presenting a lower coefficient of variation, and can thus be applied in a larger sample in the studies, associating the two methodologies in strategic stages of the experimental evaluations; (3) Determine, with the data generated in steps 1 and 2, whether the methodology under study is a potential tool for experimental evaluations of nutritional additives and whether there is a correlation between the biomarker under study and the zootechnical performance data; To this end, the relationship between blood carotenoid levels and the use of nutritional additives and zootechnical performance results was evaluated using a machine learning analysis; it was observed that the inclusion of nutritional additive in the diet of broilers submitted or not to sanitary challenge significantly increases the blood concentration of total carotenoids in birds, regardless of the experimental design or nutritional treatment applied; Data analysis also showed the presence of a moderate significant correlation between the carotenoid marker with weight gain and negative correlation with feed conversion in the periods from 0 to 35 and 0 to 42 days of age. Given the results of the three stages, it was concluded that the determination of broiler total blood carotenoids using a portable equipment is a potential biomarker for experimental evaluations of nutritional additives, as it indicates that there was an improvement in intestinal functionality, which is directly related to the improvement in zootechnical performance.

Keywords: Biomarkers, Blood, Intestinal functionality, Invasiveness

1. INTRODUÇÃO

A busca por aditivos e estratégias nutricionais que melhorem a funcionalidade gastrointestinal de frangos de corte, com consequente melhorias em desempenho zootécnico, é cada vez maior nas entidades de pesquisa acadêmica e nas empresas de tecnologia em nutrição animal. Isto tem levado ao aumento de estudos científicos e desenvolvimento de metodologias que comprovem estes benefícios nos animais. Melhorias em funcionalidade gastrointestinal estão relacionadas principalmente com o melhor aproveitamento da dieta, através da manutenção da integridade e função da mucosa intestinal, modulação da microbiota intestinal, melhor capacidade de digestão e absorção dos nutrientes e modulação do sistema imunológico dos animais (Celi et al., 2017). O equilíbrio da função de barreira intestinal, da inflamação e homeostase da microbiota são essenciais para a melhor eficiência alimentar e desempenho zootécnico (Baxter et al., 2019).

É na região do trato gastrointestinal que ocorre a primeira interação entre o meio externo e o animal, portanto a mucosa tem um papel fundamental em funções fisiológicas que envolvem digestão, absorção e metabolismo. Essa barreira permite a passagem e absorção de nutrientes e, simultaneamente, tem a função de regular o contato entre os antígenos e o sistema imunológico (Farré et al., 2020; Schoultz and Keita, 2020).

Diversas são as metodologias utilizadas, desde as mais complexas como estudos de metagenômica, metatranscriptômica, metaproteômica e metabolômica, respostas imunológicas e estudos completos do microbioma, bem como as mais simples, ainda muito utilizadas, como análises histológicas de altura de vilos e profundidade de criptas da mucosa intestinal.

Revisões recentes relatam que tanto na medicina humana como animal, pesquisadores do mundo todo tentam identificar biomarcadores que estejam fortemente correlacionados com melhorias de funcionalidade gastrointestinal, que sejam estáveis, de fácil e rápida medição e preferencialmente pouco invasivos. No entanto, citam também que provavelmente será necessária uma combinação de múltiplos biomarcadores para se chegar a um diagnóstico mais completo e assertivo (Ducatelle et al., 2018; Schoultz and Keita, 2020).

Com base em estudos que avaliam o impacto da coccidiose em frangos, observou-se que o nível sanguíneo de carotenoides pode ser um biomarcador simples e pouco invasivo para avaliação dos impactos causados na integridade intestinal. Estes estudos mostram que lesões causadas por eimerias estão relacionadas com redução na absorção de carotenoides e redução em desempenho zootécnico (Ruff, 1978; Conway et al., 1993; Adams et al, 1996; Zhu et al., 2000; Allen & Fetterer, 2002; Holdsworth et al., 2004; Hernandez-Velasco et al., 2014; Rochell et al., 2016).

Diante destes relatos, esta tese busca identificar na mensuração dos níveis sanguíneos de carotenoides um potencial biomarcador para estudos experimentais de aditivos que auxiliam na manutenção da funcionalidade gastrointestinal. Importante ressaltar que a investigação de um potencial biomarcador deve passar por diversos estudos científicos e pelo grande desafio das validações de campo, onde está a maior complexidade quando trata de funcionalidade gastrointestinal (Ducatelle et al., 2018). Deve-se reconhecer ainda que marcadores de inflamação intestinal ou composição da microbiota são fatores que desempenham um papel essencial na homeostase, sendo também essencial que sejam adicionados quando da avaliação complementar dos estudos (Schoultz and Keita, 2020).

1.1. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipo solúveis encontrados em plantas, microalgas, bactérias e fungos, não sendo sintetizado pelos animais. São comumente utilizados na nutrição das aves para pigmentação principalmente de gema de ovos e carne de peito, e também, são adicionados nas dietas para conferir ações antioxidantes e promotoras de saúde (Nabi et al, 2020).

Com base na estrutura química, os carotenóides são classificados em hidrocarbonetos puros como os licopeno, α -caroteno e β -caroteno. E os que contêm oxigênio como grupo funcional na estrutura são as xantofilas, como a luteína, β -criptoxantina e zeaxantina. Na figura 1 está representada a estrutura química básica dos carotenóides (Nabi, e al. 2020).

Os carotenoides são também conhecidos como precursores da vitamina A, mas as atividades de provitamina A variam substancialmente entre os diferentes tipos de carotenoides. Nos frangos, a maior parte da conversão de provitamina A carotenoides em vitamina A ocorre na mucosa intestinal, porém na nutrição avícola moderna, os ésteres de retinil sintéticos são a principal fonte de vitamina A, os carotenóides fornecidos nas dietas contribuem com apenas uma pequena parte do requerimento total (Surai, et al. 2001).

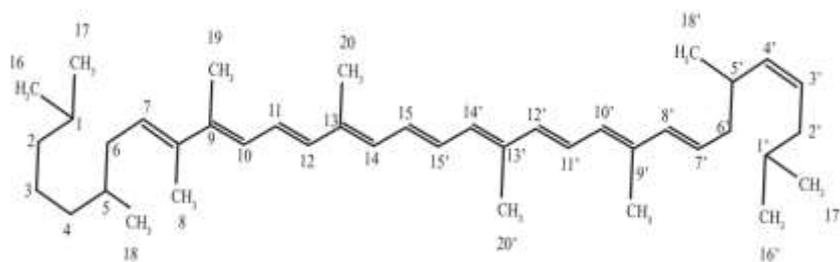


Figura 1 – Estrutura química básica dos carotenoides (Nabi et al., 2020).

Neste estudo são mensurados os carotenoides totais por espectrofotometria, não sendo possível a identificação dos tipos, pois o objetivo principal é avaliar este parâmetro como um biomarcador de funcionalidade intestinal.

1.2. Eimerias

A coccidiose é uma doença que acomete as aves, resultado de infecções intestinais parasitárias por espécies de protozoários do gênero *Eimeria* spp., as espécies mais importantes que acometem as aves são: *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. mitis*, e *E. praecox* (López-Osorio et al., 2020). É uma das doenças mais comuns e de maior impacto econômico na avicultura, causando principalmente impactos em redução de desempenho zootécnico por causar danos ao epitélio intestinal e redução em consumo de ração. O controle desta infecção faz-se com o uso de coccidiostáticos na ração das aves ou uso de vacinação (Hamzic et al., 2015; Rochell et al., 2016; López-Osorio et al., 2020).

A infecção por eimerias causam má absorção dos nutrientes, segundo os autores Allen & Fetterer (2002) através de mecanismos como: redução do pH do lúmen intestinal, diminuindo assim a eficácia de atuação das

hidrolases; alteram qualitativa e quantitativamente a absorção de lipídios através da formação de gotículas aprisionadas em células epiteliais vilosas pareadas com trofozoítos de *E. acervulina*; causam descamação e atrofia das vilosidades, aumentando assim a taxa de renovação celular e portanto as atividades metabólicas das células o que afeta a eficiência de absorção e transporte dos nutrientes.

1.3. Desafio por eimerias e absorção de carotenoides

A maioria dos estudos disponíveis na literatura que correlacionam negativamente os níveis sanguíneos de carotenoides com integridade intestinal utilizam o desafio por eimerias como modelo experimental.

Os impactos causados pela infecção por eimerias na capacidade de absorção de carotenoides estão relacionados com o comprometimento da capacidade de absorção de lipídeos, pela redução na formação de micelas (Adams et al, 1996) e, adicionalmente, com o aumento do estresse oxidativo causado pela infecção, o qual aumenta a oxidação dos carotenoides. Resposta semelhante também foi observada na redução dos níveis plasmáticos de α -tocoferol (Allen & Fetterer, 2002). Rochell et al. (2016), em estudo mais recente também com desafio por *Eimeria acervulina*, observaram impactos em níveis de carotenoides no plasma, associados à redução de desempenho zootécnico e de digestibilidade ileal de aminoácidos.

Inúmeros biomarcadores são estudados para verificar a severidade de lesões de coccidiose. Há três décadas, Conway et al. (1993) consideram a determinação de níveis plasmáticos de carotenoides como um dos melhores indicadores para medir os impactos em integridade intestinal. Estes impactos, observados mesmo em infecções com níveis baixos de oocistos e com mínima redução de desempenho zootécnico descritos por estes autores, foram corroborados em estudos que se seguiram (Holdsworth et al., 2004; Hernandez-Velasco et al., 2014; Hamzic et al., 2015).

A redução dos níveis plasmáticos de carotenoides também se reflete em diminuição da eficiência de pigmentação de pele dos frangos, importante parâmetro para os mercados de alguns países latinoamericanos. Estudo realizado no México (Hernández-Velasco et al., 2014) relaciona pigmentação de pele de frango com saúde, mostrando que a deposição de xantofilas na pele é influenciada pelos impactos negativos em digestão e absorção causados por lesões de coccidiose. Neste mesmo estudo foi observado, além de redução na pigmentação de pele, também redução de níveis sanguíneos de carotenoides e piora em desempenho zootécnico. A pigmentação uniforme geralmente indica o estado de saúde e qualidade dos produtos avícolas (Nabi et al., 2020).

Níveis sanguíneos de carotenoides e ganho de peso possuem correlação negativa com o nível de contaminação por eimerias e contagem de oocistos na cama, sendo que o primeiro é considerado por alguns autores como um excelente indicador de integridade intestinal (Conway et al., 1993; Rochell et al., 2016; Zhu et al., 2000).

Estudos com pássaros silvestres também relatam o efeito de infecções por parasitas intestinais na redução de coloração das penas, por comprometimento da absorção de carotenoides, devido a inflamação da mucosa intestinal. Para testar esta hipótese, Lind et al., (2021), realizaram um estudo com o pássaro *Chloris chloris* (verdilhão), avaliando o uso de dois medicamentos antiparasitários e o impacto nos níveis plasmáticos de carotenoides e na coloração das penas. Observaram que a coloração das penas sinaliza a carga parasitária das aves, porém não foi observada diferença nos níveis plasmáticos de carotenoides entre os grupos tratados e o controle.

1.4. Mecanismos de absorção e biodisponibilidade de carotenoides

Os animais não são capazes de sintetizar carotenoides, portanto, estes compostos são provenientes da dieta. A eficiência de assimilação via dieta é dependente de diversos fatores, e a absorção ocorre preferencialmente no intestino (Surai, 2001).

O mecanismo como ocorre a absorção dos carotenoides está intimamente relacionado ao metabolismo lipídico. Inicia-se pela digestão enzimática do alimento, seguido da emulsificação e formação de micelas, entrada através das células da mucosa intestinal e distribuição através do plasma via sistema linfático em mamíferos, muito similar ao que ocorre com a vitamina E. Em aves, que não possuem sistema linfático bem desenvolvido, acredita-se que os carotenoides sejam distribuídos diretamente ao fígado e outros tecidos por lipoproteínas liberadas das células intestinais para a veia porta hepática (Surai et al., 2001).

Em aves, o maior sítio de absorção lipídica é o jejuno, ocorrendo com menor intensidade no íleo (Hurwitz et al., 1973). Acredita-se que a absorção ocorra na forma de álcool livre por difusão passiva, na borda em escova das vilosidades intestinais (Cohn, 1997).

Os principais fatores que influenciam a biodisponibilidade dos carotenoides são resumidos por Castenmiller & West (1998) em nove pontos: tipo de carotenoide, a ligação molecular, quantidade presente na dieta, matriz em que o carotenoide está incorporado, fatores que afetam a absorção e conversão, condição nutricional do animal, fatores genéticos, fatores relacionados aos animais e interações nutricionais. Fatores nutricionais como níveis de gordura e proteína da dieta, quantidade de fibra solúvel, micotoxinas, status de vitamina A, ferro e zinco e altos níveis de carotenoides afetam a absorção dos carotenoides (Rock, 1997; Hudon, 1994; Nys, 2000).

1.5. Biomarcador de eficiência digestiva

Estudo realizado por Beauclercq et al. (2019) demonstra haver relação entre eficiência digestiva e composição sorológica em frangos de corte. Ao compararem duas linhagens de frangos, de alta e baixa eficiência digestiva, observaram diferenças de coloração na porção lipofílica do soro das duas linhagens, o que foi confirmado por espectrofotometria. Foram relatados espectros entre 430 e 516 nm, o que corresponde à zona de absorção dos carotenoides luteína e zeaxantina. Aves com baixa capacidade digestiva apresentaram coloração sérica 31% menor comparado às aves de alta capacidade digestiva, indicando desta forma que a abordagem colorimétrica pode ser uma possibilidade rápida e fácil de determinação da eficiência digestiva.

No mesmo grupo de pesquisadores, Mignon-Grasteau et al. (2020), dando continuidade nas avaliações, consideram a coloração sérica na absorbância 492 nm um potencial biomarcador para a seleção genética de frangos com maior eficiência digestiva, como alternativa aos ensaios metabólicos para cálculo de energia metabolizável. Como vantagens, relatam a avaliação em um número maior de animais em piso e redução dos testes em gaiolas, acrescentando, porém, que novos estudos precisam ser realizados em diferentes dietas e genéticas.

1.6. Integridade, permeabilidade e inflamação de mucosa intestinal

Uma principal função do epitélio intestinal é a manutenção de uma função de barreira, permitindo a permeabilidade seletiva de nutrientes da dieta, água e íons, mas limitando a entrada de patógenos, bactérias e toxinas

(Schoultz and Keita, 2020), portanto é responsável pela manutenção da homeostase, regulação da passagem de moléculas pró-inflamatórias, microrganismos, toxinas e antígenos (Farré et al., 2020). Fatores que ocasionam a perda de integridade intestinal, ou seja, ruptura das junções entre os enterócitos, resultam não apenas em um aumento da permeabilidade aos antígenos luminais e translocação de bactérias, mas também em diminuição da capacidade de absorção de nutrientes e consequente perda de produtividade dos animais (Awad et al., 2017).

O comprometimento da integridade da mucosa intestinal está relacionado com o aumento da inflamação local e má absorção (Awad et al., 2017). Como consequência, estes autores apontam o comprometimento do crescimento das aves por interferir na síntese e degradação de proteínas, prejudicar a atividade de transportadores de nutrientes, aumentar o uso de nutrientes por microrganismos patogênicos no lúmen intestinal, aumentar as necessidades para manutenção do sistema imune e reduzir a capacidade digestiva (menor síntese e atividade enzimática).

A permeabilidade da mucosa intestinal pode ser medida pela passagem de marcadores de permeabilidade entre as células epiteliais (via paracelular) ou através das células (via transcelular). As ferramentas metodológicas para investigar a função de barreira intestinal estão se expandindo rapidamente com novas abordagens metodológicas em desenvolvimento (Schoultz and Keita, 2020).

Considerando-se os carotenoides, objetivo de estudo nesta tese, a menor absorção poderia estar relacionada com o estresse oxidativo causado pela inflamação local, que consome os carotenoides (Allen & Fetterer, 2002), associada à redução da capacidade do enterócito em absorver os nutrientes (Awad et al., 2017).

1.7. Justificativa, hipóteses e objetivos

Identificar biomarcadores para avaliação de funcionalidade gastrointestinal de frangos de corte é hoje o grande desafio de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Esse desafio implica que este biomarcador possa ser determinado por uma metodologia estável, de fácil medição, pouco invasiva e de baixo custo para uso como potencial ferramenta pelos produtores de frangos de corte, em galpões comerciais e em larga escala.

A determinação sanguínea de carotenoides foi selecionada como potencial biomarcador para avaliação neste projeto com base nos relatos de literatura, que correlacionam uma redução de absorção na presença de infecções por eimerias e pela possibilidade de determinação em um equipamento portátil disponível no mercado.

De acordo com as referências citadas na introdução desta tese, muitos são os fatores que afetam a absorção dos carotenoides. A hipótese a ser testada neste projeto é que, em condições experimentais, conseguimos isolar alguns destes fatores, como a dieta e a genética, por exemplo, podendo considerar alterações de absorção através de medições de níveis sanguíneos, como medida indireta da condição nutricional e saúde intestinal em que se encontra o animal.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte, mensurada através de um método analítico pouco invasivo, rápido e de baixo custo é uma potencial ferramenta para avaliação de funcionalidade intestinal de frangos de corte em ensaios experimentais.

Importante ressaltar que a investigação de um potencial biomarcador deve passar por diversos estudos científicos e pelo grande desafio das validações de campo, onde está a maior complexidade quando se fala em funcionalidade gastrointestinal (Ducatelle et al., 2018). Diante deste contexto, é de extrema importância ressaltar que não é objetivo neste projeto extrapolar esta mensuração de carotenoides no sangue para situações de campo, não controladas, pois sem um comparativo (grupo controle) será necessária a mensuração de uma gama maior de

variáveis para que seja possível chegar a similar conclusão em relação à saúde dos animais. Também não é objetivo determinar níveis sanguíneos de carotenoides máximos e mínimos de referência em frangos de corte.

Para atingir os objetivos descritos e testar as hipóteses levantadas, o estudo seguiu por 3 etapas:

Etapa 1: Determinação de carotenoides totais em amostras de sangue de frangos de corte em diferentes ensaios experimentais, cujo objetivo foi verificar o comportamento da determinação dos níveis sanguíneos de carotenoides totais de frangos de corte recebendo diferentes aditivos melhoradores da saúde intestinal em diferentes ensaios experimentais;

Etapa 2: Correlação dos níveis sanguíneos de carotenoides totais com outra metodologia de avaliação de integridade intestinal, cujo objetivo era verificar se o método proposto neste estudo, a mensuração dos níveis sanguíneos de carotenoides, se comportava de forma similar à outra metodologia de avaliação da integridade intestinal em ensaios experimentais;

Etapa 3: Avaliação da relação dos níveis de carotenoides sanguíneos com o uso de aditivos nutricionais e com os resultados de desempenho zootécnico utilizando-se uma abordagem de máquina. Os objetivos foram determinar se a metodologia para a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte com o uso de um equipamento portátil é um potencial biomarcador para avaliações experimentais de aditivos nutricionais.

Referências

Adams, C., H. A. Vahl, and A. Veldman. 1996. Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: diet compositions that improve fat digestion during *Eimeria acervulina* infection. *Br. J. Nutr.* 75:875–880.

Allen, P.C. & Fetterer, R. H. Interaction of Dietary Vitamin E with *Eimeria maxima* Infections in Chickens. 2002 *Poultry Science* 81:41–48.

Awad, W.A.; Hess, C.; Hess, M. Enteric Pathogens and Their Toxin-Induced Disruption of the Intestinal Barrier through Alteration of Tight Junctions in Chickens. *Toxins* 2017, 9, 60.

Baxter, M. F., Latorre, J. D., Dridi, S., Merino-Guzman, R., Hernandez-Velasco, X., Hargis, B. M., & Tellez-Isaias, G. (2019). Identification of serum biomarkers for intestinal integrity in a broiler chicken malabsorption model. *Frontiers in veterinary science*, 6, 144.

Beauclercq, S., Nadal-Desbarats, L., Germain, K., Praud, C., Emond, P., Le Bihan-Duval, E., & Mignon-Grasteau, S. (2019). Does lipidomic serum analysis support the assessment of digestive efficiency in chickens? *Poultry science*, 98(3), 1425-1431.

Castenmiller JJ and West C. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 18: 19-38. 1998.

Celi, P.; Cowieson, A.J.; Fru-Nji, F.; Steinert, R.E.; Klünter, A.M.; Verlhac, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology* 234 (2017) 88-100.

Cohn W. Bioavailability of vitamin E. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51: 580-585. 1997.

Conway, D. P., K. Sasai, S. M. Gaafar, and C. D. Smothers. 1993. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. *Avian Dis.* 37:118–123.

Ducatelle R.; E. Goossens; F. D. Meyer; V. Eeckhaut; G. Antonissen; F. Haesebrouck; F.V. Immerseel. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Veterinary Research* (2018) 49:43.

Farré, R., Fiorani, M., Abdu Rahiman, S., & Matteoli, G. (2020). Intestinal permeability, inflammation and the role of nutrients. *Nutrients*, 12(4), 1185.

Hamzic, E., Bed'Hom, B., Juin, H., Hawken, R., Abrahamsen, M. S., Elsen, J. M., ... & Demeure, O. (2015). Large-scale investigation of the parameters in response to *Eimeria maxima* challenge in broilers. *Journal of animal science*, 93(4), 1830-1840.

Hernandez-Velasco, X., H. D. Chapman, C. M. Owens, V. A. Kuttappan, B. Fuente-Martinez, A. Menconi, J. D. Latorre, G. Kallapura, L. R. Bielke, T. Rathinam, B. M. Hargis, and G. Tellez. 2014. Absorption and deposition of xanthophylls in broilers challenged with three dosages of *Eimeria acervulina* oocysts. *Br. Poult. Sci.* 55:167–173.

Holdsworth, P. A., D. P. Conway, M. E. McKenzie, A. D. Dayton, H. D. Chapman, G. F. Mathis, J. T. Skinner, H.-C. Mundt, and R. B. Williams. 2004. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet. Parasitol.* 121:189–212.

Hudon J. Biotechnological applications of research on animal pigmentation. *Biotechnology Advances*, 12: 49-69. 1994.

Hurwitz S, Bar A, Katz M, Sklan D and Budowski P. Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. *Journal of Nutrition*, 103: 543-547. 1973.

Lind, M. A., Sepp, T., Stseglova, K., & Hōrak, P. (2021). Antibiotic treatment increases yellowness of carotenoid feather coloration in greenfinches (*Chloris chloris*). *bioRxiv*.

López-Osorio, Sara, Jenny J. Chaparro-Gutiérrez, and Luis M. Gómez-Osorio. "Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host-parasite interactions." *Frontiers in Veterinary Science* 7 (2020): 384.

Mignon-Grasteau, S., Beauclercq, S., Urvoix, S., & Le Bihan-Duval, E. (2020). Interest in the serum color as an indirect criterion of selection of digestive efficiency in chickens. *Poultry science*, 99(2), 702-707.

Nabi, F., Arain, M. A., Rajput, N., Alagawany, M., Soomro, J., Umer, M., ... & Liu, J. (2020). Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 104(6), 1809-1818.

Nys Y. Dietary carotenoids and egg yolk coloration-a review. *Archive Geflugel*, 64: 45-54. 2000.

Ruff, M.D. Malabsorption from the intestine of birds with coccidiosis, in *Avian Coccidiosis*, Long, P.L., Boorman, K. N., and Freeman, B. M., Eds., Br. Poultry Sci., Edinburgh, 281, 1978.

Rochell, S.J.; Parsons, C. M. and Dilger, R. N. Effects of *Eimeria acervulina* infection severity on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and plasma concentrations of amino acids, carotenoids, and α 1-acid glycoprotein in broilers. *2016 Poultry Science* 0:1–9.

Rock CL. Carotenoids: Biology and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 75: 185-197. 1997.

Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability. *Cells*, 9(8), 1909.

Surai, P.F.; Speake, B.K. and Sparks, N.H.C. Carotenoids in Avian Nutrition and Embryonic Development. 1. Absorption, Availability and Levels in Plasma and Egg Yolk *Journal of Poultry Science*, 38: 1-27, 2001.

Zhu, J.J.; Lillehoj, H.S.; Allen, P.C.; Yun, C.-H.; Pollock, D.; Sadjadi, M.; Emara, M.G. Analysis of disease resistance-associated parameters in broiler chickens challenged with *Eimeria maxima*. *Poultry Science*, Volume 79, Issue 5, 1 May 2000, Pages 619-625.

2. ETAPA 1 - DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE FRANGOS DE CORTE EM UMA SÉRIE DE ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Resumo

A etapa 1 desta tese consistiu na determinação de carotenoides totais em amostras de sangue de frangos de corte em uma série de ensaios experimentais, cujo objetivo era verificar o comportamento deste biomarcador em frangos de corte recebendo diferentes aditivos melhoradores da saúde intestinal em ensaios experimentais, ou seja, em diferentes situações de manejo, instalações, dieta, linhagem, tratamentos (com ou sem aditivos nutricionais) e desafios. Nesta etapa foram considerados os dados provenientes de amostras coletadas de sete ensaios realizados em parceria com centros experimentais e universidades, ao longo dos anos de 2016 a 2018. As determinações sanguíneas de carotenoides total foram realizadas no mesmo dia da coleta, usando o equipamento iCheck™ CAROTENE, um fotômetro portátil da empresa BioAnalyt, que contém um kit de extração de carotenoides para cada amostra. Os dados, dentro de cada estudo, foram submetidos à análise de variância ANOVA, e teste de Dunnett, a 5% de probabilidade, como comparativo de médias de cada tratamento frente ao controle sem aditivos nutricionais. A determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte, com o uso do equipamento portátil, demonstrou ser um parâmetro de fácil mensuração, pouco invasivo e que responde aos tratamentos que foram aplicados. Desta forma, foi possível concluir que as aves que receberam algum aditivo nutricional, que promove influência na manutenção da funcionalidade intestinal, mostraram maior capacidade de absorção dos carotenoides. Portanto, este pode vir a ser um potencial biomarcador para determinação da funcionalidade intestinal desta categoria de produtos.

Palavras-chave: Biomarcadores, Sanguíneo, Funcionalidade intestinal, Invasividade

Abstract

Step 1 of this thesis consisted in the determination of total broilers blood carotenoids in a series of experimental trials, whose objective was to verify the behavior of this biomarker in broilers receiving different additives that improve intestinal health in experimental trials, that is, in different situations of management, facilities, diet, lineage, treatments (with or without nutritional additives) and challenges. At this stage, data samples collected from seven trials conducted in partnership with experimental centers and universities over the years 2016 to 2018. Blood determinations of total carotenoids were performed on the same day of collection, using the iCheck™ CAROTENE equipment, a portable photometer from the BioAnalyt company, which contains a carotenoid extraction kit for each sample. The data, within each study, were submitted to ANOVA analysis of variance and Dunnett's test, at 5% probability, as a comparison of means of each treatment against the control without nutritional additives. The determination of total broilers blood carotenoids, with a portable equipment, proved to be a parameter of easy measurement, little invasive and that responds to the treatments that were applied. Thus, it was concluded that the birds that received some nutritional additive, which promotes influence on the maintenance of intestinal functionality, showed greater capacity of carotenoid absorption. Therefore, this may turn out to be a potential biomarker for determining intestinal functionality of this category of products.

Keywords: Biomarkers, Blood, Intestinal functionality, Invasiveness

2.1. Introdução

A etapa 1 consistiu na determinação de carotenoides totais em amostras de sangue de frangos de corte em uma série de ensaios experimentais, cujo objetivo foi verificar o comportamento da determinação dos níveis sanguíneos de carotenoides totais de frangos de corte recebendo diferentes aditivos melhoradores da saúde intestinal em ensaios experimentais, ou seja, em diferentes situações de manejo, instalações, dieta, linhagem, tratamentos (com ou sem aditivos nutricionais) e desafios.

2.2. Material e Métodos

Nesta etapa foram analisados os resultados da determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte, provenientes de amostras coletadas de sete ensaios realizados em parceria com centros experimentais e universidades, ao longo dos anos de 2016 a 2018. Todos os ensaios foram conduzidos de acordo com as normativas brasileiras de uso ético de animais para experimentação e aprovados pelo comitê de ética das instituições onde foram realizados. Sumário dos experimentos encontra-se na Tabela 1. Constam da tabela a identificação do projeto e ano de execução, as idades de coletas de sangue, a aplicação ou não de desafio, o número total de amostras (independente de tratamento) e o local de condução dos ensaios.

Os experimentos selecionados possuem como objetivo comum avaliar o impacto de diferentes aditivos nutricionais no desempenho de frangos de corte criados em piso, realizados com distintas linhagens, instalações, tratamentos e dietas, com ou sem desafio nutricional e/ou microbiológico.

Tabela 1 - Descrição sumária dos ensaios que forneceram dados de nível sanguíneo de carotenoides na etapa 1 deste estudo.

No	Ano (ID* do Projeto)	Idade de Coleta	Desafio	N amostral	Local
1	2016 (BR 150406)	28d	Sim	96	ANC DSM ¹
2	2016 (BR 160108)	28d	Não	108	ESALQ-USP ²
3	2016 (BR 160812)	21d	Não	54	ANC DSM1
4	2017 (BR 150903)	14/21/28d	Sim	192	UFPR ³
5	2017 (BR 170221)	21/35/42d	Sim	288	Mercolab ⁴
6	2017 (BR 170330)	35d	Não	100	UFPR ³
7	2018 (BR 170222)	21/42d	Não	192	BITA ⁵

¹ANC DSM – Animal Nutrition Center, DSM Produtos Nutricionais, Mairinque - SP. ²ESALQ-USP – Piracicaba - SP. ³UFPR – Curitiba - PR; ⁴Mercolab – Cascavel – PR; ⁵BITA - Busca Inteligente em Tecnologia Animal, Guataporá – SP. *ID: identificação do projeto.



Figura 1 – Instalações experimentais.



Figura 2 – Instalação experimental.

Em todos os sete experimentos descritos na Tabela 1, como padronização, foram adicionados na ração 40 mg/kg de ração do produto comercial CAROPHYLL® yellow 10%, que proporciona na ração 4 ppm de Apo-éster, que é um tipo de carotenoide amarelo. O objetivo desta inclusão foi utilizar este carotenoide como um marcador na dieta, de modo a proporcionar uma redução do coeficiente de variação da determinação sanguínea.

As amostras de sangue foram coletadas entre os 14 e 42 dias de idade dos frangos, com uma amostragem média de 20 animais por tratamento. Para a determinação do nível de carotenoides totais no sangue, foi feita coleta da veia braquial em tubo com EDTA, em volume mínimo de 1 mL para boa homogeneização com o anticoagulante.

As determinações sanguíneas de carotenoides total foram realizadas no mesmo dia da coleta, usando o equipamento iCheck™ CAROTENE, um fotômetro portátil da empresa BioAnalyt, que contém um kit de extração de carotenoides para cada amostra (especificações técnicas na Tabela 2).

Foi feita a injeção de 0,4 mL de sangue na unidade de extração, tubos iEX™, seguida de forte agitação manual por 10 segundos até obter uma mistura homogênea, com as células sanguíneas completamente misturadas com o reagente. Após homogeneização, os tubos permaneceram em repouso por 5 minutos, para que ocorresse a extração dos carotenoides e separação do conteúdo do tubo em duas fases. Após separação, o iEx™ foi inserido no equipamento para leitura instantânea seguindo-se as recomendações do manual do equipamento (iCheck™ CAROTENE User Manual / Version 10).



Figura 3 – (1) Equipamento portátil iCheck Carotene; (2) Análise no equipamento; (3) Kit de extração dos carotenoides.

Tabela 2 - Especificações técnicas do equipamento iCheck™ CAROTENE e do kit para teste iEX™.

Equipamento	
Analito	Carotenoides total
Método de análise	Determinação fotométrica da concentração de carotenoides totais usando absorção a 450 e 525nm
Matrizes	Sangue, soro e plasma
Volume de amostra	400 µL (0.4 mL)
Faixa linear	>0,15 – 15 mg/L
Precisão em intervalo de confiança de 95% a 25 °C	± 5-20% (depende do tipo de amostra e concentração)
Método comparado	Validado com HPLC (High-performance liquid chromatography)
Uso	Portátil
Tempo de análise	< 10min
Kit para Teste	
Contém	Tubos com reagentes (unidades de extração iEX™), seringas e agulhas (1.6mm x 25mm)
Composição química	n-hexano e álcoois
Volume por tubo	2 mL
Validade	12 meses a 20-30 ° C, sem luz solar direta, vertical

A seguir é feita uma descrição dos sete experimentos utilizados na coleta de amostras para o presente estudo.

2.2.1. Ensaio experimental 1

O Experimento 1 foi realizado em 2016, no centro experimental da empresa DSM Produtos Nutricionais, Animal Nutrition Center – ANC, localizado em Mairinque, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 800 frangos de corte da linhagem Ross 308 distribuídos em 4 tratamentos com 8 repetições de 25 aves cada. Os animais foram criados em cama nova, em galpão climatizado, durante um período de 42 dias, com ração e água ad libitum. Neste estudo, foram avaliadas diferentes inclusões da enzima muramidase (0, 25.000 e 35.000 LSU/kg) e um tratamento controle positivo com inclusão de 10 ppm de Enramicina nas fases inicial e de crescimento e 5 ppm na fase final.

As dietas foram formuladas de acordo com os níveis da indústria, baseadas em milho, farelo de soja, farelo de arroz e farinha de carne e ossos (Tabela 3) e com inclusão de enzima fitase. O farelo de arroz e a farinha de carne e ossos foram incluídos nas dietas com o intuito de criar um desafio nutricional.

Adicionalmente ao desafio nutricional, foi feita a inoculação via oral, aos 2 dias de idade e em todas as aves, 15× a dose recomendada da vacina de coccidiose Bio-Coccivet R® (Laboratório Biovet, E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix, E. praecox, E. tenella e E. mitis, isolados de cepas de campo), com o objetivo de provocar um desafio à mucosa intestinal e simular situações de campo. As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 28 dias de idade, 24 aves por tratamento, tomadas de forma aleatória e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2.1.

2.2.2. Ensaio experimental 2

O Experimento 2 foi realizado em 2016, no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, localizado em Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 1440 frangos de corte da linhagem Cobb 500. Os tratamentos consistiram da utilização de milho de alta e baixa densidade, com e sem adição de enzimas (protease e amilase), sendo 4 tratamentos com 9 repetições de 40 aves cada. Os animais foram criados em cama nova, durante um período de 42 dias, com ração e água ad libitum. As dietas foram formuladas de acordo Rostagno et al. (2011), baseadas em milho e farelo de soja (Tabela 3).

Para esta avaliação foi adquirido um único híbrido de milho, este foi secado em uma temperatura média de 100 °C para posterior separação em mesa densimetria, onde foi classificado por peso específico e posteriormente calculou-se, com o auxílio do equipamento Dellamonte®, as densidades, sendo, grãos de alta e baixa densidade 780 e 740 g/L, respectivamente.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 28 dias de idade, 27 aves por tratamento, tomadas de forma aleatória e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2.1.

2.2.3. Ensaio experimental 3

O Experimento 3 foi realizado em 2016, no centro experimental da empresa DSM Produtos Nutricionais, Animal Nutrition Center – ANC, localizado em Mairinque, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 90 frangos de corte da linhagem Cobb 500, distribuídos em 2 tratamentos com 9 repetições de 5 aves cada. Os animais foram criados em gaiolas com piso de tela metálica durante um período de 21 dias, com ração e água ad libitum. As dietas foram formuladas de acordo com Rostagno et al. (2011), baseadas em milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos, com enzima fitase (Tabela 3). Neste estudo, foi avaliada a inclusão de um blend das enzimas xilanase e amilase, frente um tratamento controle sem enzimas.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 21 dias de idade, 27 aves por tratamento, tomadas de forma aleatória e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2.1.

2.2.4. Ensaio experimental 4

O Experimento 4 foi realizado em 2017, no CERIA, Centro de Estudos da Resposta Imunológica em Aves, localizado na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Foram utilizados 256 frangos de corte da linhagem Cobb 500, distribuídos em 4 tratamentos com 7 repetições de 8 aves cada, criados em gaiolas em salas isoladas com desafio microbiológico. Um tratamento adicional, com 4 gaiolas de 8 aves, constituiu o grupo controle sem desafio. O período de criação foi de 28 dias, com ração e água ad libitum. As dietas foram formuladas de acordo com Rostagno et al. (2011), baseadas em milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos, com enzima fitase (Tabela 3).

Neste estudo, foram avaliadas diferentes inclusões da enzima muramidase (0, 25.000 e 35.000 LSU/kg) e um tratamento controle positivo com inclusão de 10 ppm de enramicina.

No primeiro dia de idade, todas as aves dos grupos desafiados receberam, por via oral, 15× a dose recomendada da vacina de coccidiose Bio-Coccivet R® (Laboratório Biovet, E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix, E. praecox, E. tenella e E. mitis, isoladas de cepas de campo) e, nos dias 10, 11 e 12 de idade, foram inoculadas por gavagem com *Clostridium perfringens* (108 UFC/ave – isolado do campo) com o objetivo de promover um desafio à mucosa intestinal e simular situações de campo.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 14, 21 e 28 dias de idade, sendo 14 aves por tratamento e 8 aves do controle sem desafio, por idade, tomadas de forma aleatória e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2.1.

2.2.5. Ensaio experimental 5

O Experimento 5 foi realizado em 2017, no Centro Experimental do Laboratório Mercolab, localizado em Cascavel, Paraná, Brasil.

Foram utilizados 1680 frangos de corte da linhagem Cobb 500, distribuídos em 6 tratamentos com 8 repetições de 35 aves cada, criadas em piso com cama nova, durante o período de 42 dias de idade. As aves receberam ração e água ad libitum.

Neste estudo, foram avaliadas diferentes inclusões da enzima muramidase (0, 15.000, 25.000, 35.000 e 45.000 LSU/kg) e um tratamento controle positivo com inclusão de 10 ppm de enramicina na fase inicial e crescimento e 5 ppm na fase final.

As dietas foram formuladas de acordo com o praticado pela indústria, baseadas em milho e farelo de soja, com enzima fitase (Tabela 3). Aos 10, 11 e 12 de idade, todas as aves foram inoculadas por gavagem com *Clostridium perfringens* (0.5 ml de uma solução com 108 UFC/ave – isolado do campo), com o objetivo de promover um desafio à mucosa intestinal e simular situações de campo.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 21, 35 e 42 dias de idade, sendo 16 aves por tratamento, por idade, tomadas de forma aleatória e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2.1.

2.2.6. Ensaio experimental 6

O Experimento 6 foi realizado em 2017, na Universidade Federal do Paraná, localizado em Curitiba, Paraná, Brasil.

Foram utilizados 1250 frangos de corte da linhagem Cobb 500, distribuídos em 5 tratamentos com 10 repetições de 25 aves cada. Os animais foram criados em cama reutilizada, durante um período de 42 dias, com ração e água ad libitum.

Neste estudo, foram avaliados diferentes aditivos nutricionais: T1: tratamento controle negativo sem aditivo (CN); T2: controle positivo com enramicina; T3: CN + enzima muramidase, e T4: T3 + blend de óleos essenciais com ácido orgânico; T5: T3 + aditivo fitogênico. As dietas foram formuladas de acordo com os níveis da indústria, à base milho e farelo de soja (Tabela 3) e com inclusão das enzimas fitase e xilanase.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 35 dias de idade, sendo 20 aves por tratamento, tomadas de forma aleatória e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2.1.

2.2.7. Ensaio experimental 7

O Experimento 7 foi realizado em 2018, no centro experimental da empresa BITA – Busca Inteligente em Tecnologia Animal, localizado em Guatapar, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 1440 frangos de corte da linhagem Cobb Slow, distribuídos em 4 tratamentos com 12 repeties de 30 aves cada. Os animais foram criados em cama reutilizada, durante um período de 42 dias, com rao e água ad libitum.

Neste estudo, foram avaliados diferentes aditivos nutricionais: T1: tratamento controle negativo sem aditivo (CN); T2: CN + enzima muramidase; T3: CN + blend de óleos essenciais com ácido orgânico; T4: CN + muramidase + blend. As dietas foram formuladas de acordo com os níveis da indústria, baseadas em milho e farelo de soja (Tabela 3) e com inclusão das enzimas fitase e protease.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 21 e 42 dias de idade, sendo 24 aves por tratamento, tomadas de forma aleatória e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 2.1, exceto na coleta de 21 dias. Nessa ocasião não foi possível a realizao das determinaes sanguíneas no mesmo dia; foi separado o soro, seguido de congelamento. Posteriormente, a determinao de carotenoides foi realizada pelo mesmo procedimento, porém usando o soro e não sangue total.

2.2.8. Análise estatística

Para os experimentos 1, 3, 5, 6 e 7, a variável estudada foi submetida à análise de variância ANOVA, utilizando o modelo PROC GLM (General Linear Models) do SAS (Statistical Analysis System) e teste de Dunnett, a 5% de probabilidade, como comparativo de mdias de cada tratamento frente ao controle sem aditivos. No Experimento 2, o tratamento considerado como controle foi o que recebeu milho de baixa densidade sem enzima e no experimento 4, o grupo controle considerado foi o sem desafio.

Tabela 3 - Composição e níveis nutricionais das dietas utilizadas nos sete ensaios que forneceram dados de nível sanguíneo de carotenoides na etapa 1. Exemplo referente à fase de crescimento.

Ingredientes, g kg⁻¹ ração	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
Milho	557.06	630.6	581.6	606.5	571.0	606.9	601.8
Farelo de soja	292.3	321.3	321.0	323.0	342.0	336.0	335.0
Farelo de arroz	60.0	-	-	-	-	-	-
Óleo de soja	47.3	14.2	26.0	20.0	54.0	28.0	34.0
Farinha de carne e ossos	26.4	-	34.0	29.0	-	-	-
Fosfato bicálcico	-	12.4	3.2	-	6.9	6.8	7.5
Calcário	4.9	9.1	9.8	6.8	12.1	10.8	10.3
Sal	3.5	4.5	4.4	4.4	4.3	4.3	4.3
DL-Metionina	2.8	2.4	3.2	3.2	2.7	2.7	2.5
L-Lisina.HCl	2.1	1.7	2.7	2.7	1.9	0.59	0.61
L-Treonina	0.500	0.200	0.900	0.880	0.900	0.090	-
Premix Vitaminico*1	1.5	1.2	1.5	1.5	1.2	1.5	1.2
Premix Mineral*2	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Fitase*3	0.100	-	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Xilanase*6	-	-	-	-	-	0.050	-
Protease*7	-	-	-	-	-	-	0.200
Cloreto de Colina 60%	-	0.800	0.600	0.600	0.600	0.600	0.600
Anticoccidiano*5	-	0.550	-	-	0.550	-	0.550
Apo-éster*4	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040
Inerte	1.00	0.510	10.46	0.780	1.21	1.03	0.800
	1000						
Níveis nutricionais, g kg⁻¹ de ração							
EMAn, kcal/kg	3200	3000	3032	3052	3180	3100	3100
Proteína Bruta	200	198	210	212	200	200	200
Cálcio	7.7	7.3	8.4	8.5	8.5	8.0	8.0
Fósforo disponível	4.0	3.4	4.0	4.1	4.0	4.0	4.0
Lisina digestível	11.0	10.8	12.2	12.2	11.6	10.5	10.5
Metionina digestível	5.5	5.1	5.9	6.0	5.5	5.5	5.5
Treonina digestível	7.1	7.0	7.9	7.9	7.9	7.1	7.3
Triptofano digestível	2.1	-	2.2	2.2	2.3	2.3	2.2

*1Vitamin premix : Vit. A 9,000,000 UI/kg; Vit. D3 2,500,000 UI/kg; Vit. E 20,000 UI/kg; Vit. K3 2,500 mg/kg; Vit. B1 2,000 mg/kg; Vit. B2 6,000 mg/kg; Pantotenic acid 12 g/kg; Vit. B6 3,000 mg/kg; Vit. B12 15,000 mcg/kg; Nicotinic acid 35 g/kg; Folic acid 1,500 mg/kg; Biotin 100 mg/kg; Selenium 250 mg per kg of premix. *2Mineral premix: Iron 100 g/kg; Cooper 20 g/kg; Manganese 130 g/kg; Cobalt 2,000 mg/kg; Zinc 130 mg/kg; Iodine 2,000 mg per kg of premix. *3 RONOZYME® HiPhos GT; *4 CAROPHYLL® yellow 10%; *5 Salinomicina sódica 12% 66ppm; *6 RONOZYME® WX 2000.

2.3. Resultados e Discussão

Os resultados das determinações de carotenoides no sangue de frangos de corte nos sete experimentos da etapa 1 estão descritos na Tabela 4. Em adição, são apresentados valores médios em % da variação dos níveis sanguíneos de carotenoides dos grupos tratados com aditivos em cada experimento (Figura 4). De maneira geral, independente dos aditivos estudados, idade de coleta, dieta, linhagem e manejo, quando comparados ao grupo controle, sem aditivos, os frangos que receberam algum tratamento (aditivo nutricional com foco em funcionalidade intestinal) na dieta, apresentam aumento significativo na concentração de carotenoides no sangue, nas situações estudadas.

Com base nos resultados encontrados (n=1.030), a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte, com o do equipamento portátil iCheck™ CAROTENE, demonstrou ser um parâmetro de fácil mensuração, pouco invasivo e que responde aos tratamentos que foram aplicados.

Tabela 4 - Níveis sanguíneos de carotenoides totais de frangos de corte em diferentes experimentos, dietas e idades – Etapa 1.

Tratamentos	Carotenoides totais (mg/L)					Valor P	CV%
	14d	21d	28d	35d	42d		
Experimento 1							
Controle	-	-	3.57 b	-	-	0.0072	21.03
Muramidase 25.000	-	-	3.97 b	-	-		
Muramidase 35.000	-	-	4.38 a	-	-		
Enramicina	-	-	4.28 a	-	-		
Experimento 2						Valor P	CV%
Milho bx.dens.(controle)* ¹	-	-	3.73 b	-	-	0.0423	15.73
Milho alta densidade	-	-	3.95 b	-	-		
Milho baixa + enzimas	-	-	3.82 b	-	-		
Milho alta + enzimas	-	-	4.19 a	-	-		
Experimento 3						Valor P	CV%
Controle	-	4.00 b	-	-	-	0.0321	20.66
Xilanase + Amilase	-	4.54 a	-	-	-		
Experimento 4						Valor P	CV%
Controle sem desafio	2,99 a	3,56	3,16	-	-	(14d) <.0001	82.79
Desafiado (D) s/ aditivo	0,92 b	2,48	2,88	-	-	(21d) 0.0557	38.46
(D)+muramidase 25.000	1,27 b	2,37	3,14	-	-	(28d) 0.9340	30.34
(D)+muramidase 35.000	0,97 b	2,32	2,96	-	-		
(D)+enramicina	0,76 b	2,83	2,98	-	-		
Experimento 5						Valor P	CV%
Controle	-	2.92	-	4.04	4.46 b	(21d) 0.7971	34.82
Muramidase 15.000	-	2.95	-	4.03	4.48 b	(35d) 0.4641	21.52
Muramidase 25.000	-	3.07	-	4.27	4.61 b	(42d) <.0001	21.28
Muramidase 35.000	-	2.77	-	3.86	4.49 b		
Muramidase 45.000	-	3.05	-	4.33	5.56 a		
Enramicina	-	3.30	-	4.43	6.44 a		
Experimento 6						Valor P	CV%
Controle	-	-	-	3.31 b	-	0.0003	22.13
Enramicina	-	-	-	3.87 b	-		
Muramidase (M)	-	-	-	3.53 b	-		
(M)+(OE+AO)* ²	-	-	-	4.11 a	-		
(M)+Fitogênico	-	-	-	4.47 a	-		
Experimento 7		*³				Valor P	CV%
Controle	-	1,93 b	-	-	3,60	(21d) <.0001	36.38
Muramidase (M)	-	2,22 b	-	-	3,56	(42d) 0.8038	21.81
(OE+AO) * ²	-	1,96 b	-	-	3,51		
(M)+(OE+AO)* ²	-	3,01 a	-	-	3,72		

*¹ Milho alta e baixa densidade, 780 e 740 g/L, respectivamente; *²(OE+AO) = óleos essenciais e ácido orgânico; *³ amostras de soro. Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste Dunnett frente ao tratamento controle.

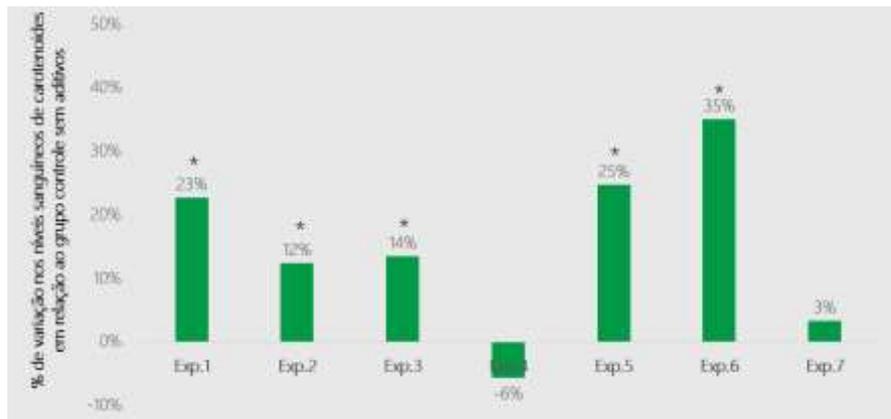


Figura 4. Porcentagem de variação nos níveis sanguíneos de carotenoides de frangos de corte dos grupos tratados com aditivos (valores médios) em relação ao grupo controle sem aditivos, nos experimentos (Exp.) 1 a 7 da etapa 1. O * indica significância ($P<0,05$) da diferença entre o grupo controle e o tratado dentro de cada experimento.

2.4. Conclusão

Com base na primeira etapa deste projeto foi possível concluir que as aves que receberam algum aditivo nutricional, que promove influência na manutenção da funcionalidade intestinal, mostraram maior capacidade de absorção dos carotenoides. Portanto, este pode vir a ser um potencial biomarcador para determinação da funcionalidade desta categoria de produtos.

Referências

Rostagno, H.S.; Aalbino, L.F.T.; Donzele J.L. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa: UFV, 2011. 252p.

3. ETAPA 2 - CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE CAROTENOIDES TOTAIS COM OUTRA METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE INTESTINAL

Resumo

A etapa 2 desta tese consistiu no estudo da correlação entre os níveis sanguíneos de carotenoides totais e a metodologia atualmente aceita e corrente na literatura para avaliação de integridade intestinal. O objetivo foi verificar se o método proposto neste estudo se comportava de forma similar à outra metodologia de avaliação da integridade intestinal, o método *Fluorescein Isothiocyanate Dextran* (FITC-d). Esperava-se uma correlação linear negativa, ou seja, a redução na passagem do marcador FITC-d em aves com epitélio intestinal íntegro implicaria em maior capacidade de absorção de nutrientes, refletindo em maiores níveis sanguíneos de carotenoides totais. Porém, os dados se comportaram de forma muito distinta entre as duas metodologias aplicadas, não sendo possível demonstrar uma relação direta entre os marcadores, pois são métodos que mensuraram saúde intestinal, porém com abordagens distintas. FITC-d avalia a permeabilidade das junções celulares da mucosa intestinal, enquanto os carotenoides alcançam um espectro mais amplo, indicando a funcionalidade intestinal das aves. O método de mensuração dos carotenoides totais no sangue de frangos de corte com o uso do equipamento portátil iCheck™ CAROTENE mostrou-se ser mais simples, rápido e de menor custo, além de apresentar menor coeficiente de variação, podendo desta forma ser aplicado em uma amostragem maior nos estudos, associando-se as duas metodologias em etapas estratégicas das avaliações experimentais.

Palavras-chave: Biomarcadores, Métodos, Funcionalidade intestinal, Invasividade

Abstract

Step 2 of this thesis consisted of the study of the correlation between the blood levels of total carotenoids and the currently literature accepted methodology for intestinal integrity. The objective was to verify whether the method proposed in this study behaved similarly to another methodology for assessing intestinal integrity, the Fluorescein Isothiocyanate Dextran method (FITC-d). A negative linear correlation was expected, that is, the reduction in the passage of the FITC-d marker in birds with intact intestinal epithelium would imply a greater capacity for nutrient absorption, reflecting in higher total carotenoids blood levels. However, the data behaved very differently between the two methodologies, and it was not possible to demonstrate a direct relationship between the markers, since they are methods that measured intestinal health, but with different approaches. FITC-d assesses the permeability of enterocytes tight junctions, while carotenoids reach a broader spectrum, indicating the intestinal functionality of birds. The method of measuring broilers total blood carotenoids using a portable device, iCheck™ CAROTENE, proved to be simpler, faster and of lower cost, besides presenting a lower coefficient of variation, thus being able to be applied in a larger sampling in experimental trials, associating the two methodologies in strategic stages of the experimental evaluations.

Keywords: Biomarkers, Methods, Intestinal functionality, Invasiveness

3.1. Introdução

Com base nos resultados da primeira etapa desta tese, que demonstram que os níveis sanguíneos de carotenoides respondem aos tratamentos que foram aplicados, seguimos para a segunda etapa. Na etapa 2 estudamos a correlação entre os níveis sanguíneos de carotenoides totais com outra metodologia de avaliação de integridade intestinal, cujo objetivo era verificar se o método proposto neste estudo, a mensuração dos níveis sanguíneos de carotenoides, se comportava de forma similar à outra metodologia de avaliação da integridade intestinal amplamente utilizado em ensaios experimentais publicados na literatura, o método *Fluorescein Isothiocyanate Dextran* (FITC-d). O estudo visou verificar se estes dois métodos poderiam ser utilizados de forma complementar e/ou em substituição, pois a determinação dos carotenoides é um método menos invasivo, mais rápido e prático, que pode ser mensurado no local da coleta, não sendo necessário o envio de material biológico ao laboratório.

3.1.1. Permeabilidade de mucosa intestinal – Método FITC-d

O ensaio de permeabilidade de mucosa intestinal, também conhecido como método FITC-d, avalia a permeabilidade das junções celulares da mucosa intestinal (*tight junction*) através da passagem do marcador, fluoresceína isothiocyanate dextran – FITC-d, conforme descrito por Vicuña et al. (2015).

O marcador fluorescente Dextran-FITC 3-5 kD (Sigma) é uma macromolécula que em situações em que a mucosa intestinal está íntegra, não consegue ultrapassar a barreira e ser absorvida. Desta forma, ao ser administrado de forma oral às aves e mensurada no soro, significa que existe um rompimento da integridade de mucosa e, portanto, aumento da permeabilidade, permitindo uma maior passagem do marcador para a circulação.

De acordo com os resultados apresentados por Vicuña e colaboradores, 2015, este método pode ser indicado para avaliações de lesões epiteliais, principalmente relacionadas à resposta inflamatória local, sendo uma excelente ferramenta para estudos de aditivos nutricionais alternativos aos antibióticos promotores de crescimento, por exemplo.

Por ser um método pouco invasivo, vem ganhando espaço nos estudos científicos em frangos de corte. Diversos outros estudos demonstram a eficácia do método em medir os efeitos do estresse térmico, desafios nutricionais, restrição alimentar, dentre outros, na funcionalidade intestinal através desta metodologia (Baxter et al., 2017).

De acordo com a metodologia descrita, espera-se que os níveis sanguíneos do marcador FITC-d tenham uma correlação negativa em relação aos níveis sanguíneos de carotenoides.



Figura 1 – Imagem da esquerda ilustra a gavagem via oral do marcador FITC-d e da direita a coleta de sangue após 2h da gavagem.

3.2. Material e Métodos

Foram realizados ensaios, com diferentes tratamentos experimentais, em que se aplicaram as duas metodologias (carotenoides sanguíneos e FITC-d) às mesmas aves para permitir a comparação.

Da mesma forma como na etapa 1 deste projeto, as amostras foram tomadas de ensaios experimentais selecionados, cujo objetivo comum foi o de avaliar o impacto de diferentes aditivos nutricionais no desempenho de frangos de corte criados em piso. Os estudos selecionados para esta etapa foram conduzidos na mesma instalação e linhagem, porém foram aplicados distintos tratamentos e dietas, com ou sem desafio nutricional e/ou microbiológico.

Os dados são provenientes de amostras coletadas de três ensaios realizados no ANC DSM – *Animal Nutrition Center*, DSM Produtos Nutricionais, Mairinque – SP, nos anos de 2019 e 2021, e em acordo com as normativas brasileiras de uso ético de animais para experimentação e aprovado pelo comitê de ética desta instituição privada. O sumário dos experimentos encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição sumária dos ensaios que forneceram dados de nível sanguíneo de carotenoides na etapa 2 deste estudo.

N	Ano (ID* do Projeto)	Idade de Coleta	Desafio	N amostral*	Local
1	2019 (BR 190224)	28d	Não	192	ANC DSM ¹
2	2021 (BR 200317)	28d	Não	198	ANC DSM ¹
3	2021 (BR 210627)	28d	Sim	85	ANC DSM ¹

¹ANC DSM – Animal Nutrition Center, DSM Produtos Nutricionais, Mairinque - SP.

*ID: identificação do projeto

Diferente da primeira etapa, nos três experimentos selecionados para a segunda etapa, não foi adicionado na ração o Apo-éster (produto comercial CAROPHYLL® yellow 10%). Foi considerado apenas o carotenoide proveniente das dietas base milho e farelo de soja.

Esta modificação no método foi realizada com base em observações práticas de campo. Após as primeiras avaliações experimentais da etapa 1, foram realizadas avaliações em condições comerciais de campo para validações de novos produtos, em que a suplementação de Apo-éster não era viável. Verificou-se que mesmo sem a suplementação foi possível quantificar as diferenças de níveis de carotenoides sanguíneos entre os grupos controle e tratados. Com base no aprendizado prático, optamos em realizar as avaliações experimentais o mais próximo da aplicação das condições comerciais, em testes de validação de produtos, para tornar esta ferramenta aplicável no futuro.

Na etapa 2, padronizamos as coletas aos 28 dias de idade dos frangos de corte, período de uma semana após troca de dieta inicial para crescimento, com uma amostragem média de 20 animais por tratamento. Para a determinação do nível de carotenoides totais no sangue, foi feita coleta da veia braquial em tubo com EDTA, em volume mínimo de 1 mL para boa homogeneização com o anticoagulante. Nas mesmas aves foi aplicado a método FITC-d. Como não conhecíamos a influência do marcador FITC-d na mensuração dos carotenoides, tomamos o cuidado de coletar o sangue para análise de carotenoides antes da gavagem para administração do marcador FITC-d via oral.

As determinações sanguíneas de carotenoides total foram realizadas no mesmo dia da coleta, usando o equipamento iCheck™ CAROTENE, um fotômetro portátil da empresa BioAnalyt, que contém um kit de extração de carotenoides para cada amostra (especificações técnicas no Quadro 1 - etapa 1 desta tese). Foi feita a injeção de

0,4 mL de sangue na unidade de extração, tubos iEX™, seguida de forte agitação manual por 10 segundos até obter uma mistura homogênea, com as células sanguíneas completamente misturadas com o reagente. Após homogeneização, os tubos permaneceram em repouso por 5 minutos, para que ocorresse a extração dos carotenoides e separação da solução em duas fases. Após separação, o iEx™ foi inserido no equipamento para leitura instantânea seguindo-se as recomendações do manual do equipamento (iCheck™ CAROTENE User Manual / Version 10).

A avaliação da permeabilidade de mucosa intestinal foi realizada nas mesmas aves selecionadas para as avaliações de carotenoides. A metodologia consistiu na administração oral de Dextran-FITC 3-5 kD (Sigma), 1,1 mg/ave por via oral e individual, por gavagem. Após 2,5 h, realizou-se a coleta de sangue das aves na veia braquial em tubo sem anticoagulante, em volume mínimo de 2 mL para posterior separação do soro para mensuração da intensidade de fluorescência. A intensidade de fluorescência foi analisada em fluorímetro de placa (JenaScientific) e o valor de Dextran na amostra foi obtido em comparação com uma curva padrão de diluição do reagente. Esta metodologia foi aplicada aos ensaios experimentais em parceria com o Laboratório Imunova, Curitiba – PR.

A seguir é feita uma descrição dos três experimentos utilizados na coleta de amostras para o presente estudo, etapa 2.

Tabela 2 - Composição e níveis nutricionais das dietas utilizadas na fase de crescimento nos três ensaios selecionados para a Etapa 2.

Ingredientes, g kg⁻¹ ração	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Milho	640.6	651.2	637.8
Farelo de soja	279.0	268.0	305.0
Farinha de Carne e Ossos	28.0	35.0	-
Óleo de soja	32.0	29.0	26.0
Fosfato bicálcico	-	-	7.7
Calcário	6.60	2.40	7.4
Sal	4.00	3.90	4.4
DL-Metionina	2.90	2.80	2.95
L-Lisina.HCl	2.55	2.55	2.50
L-Treonina	1.00	1.00	1.10
Premix Vitaminico* ¹	1.00	1.00	1.00
Premix Mineral* ²	0.50	0.50	0.50
Fitase* ³	0.05	0.05	0.05
Cloreto de Colina 60%	0.50	0.50	0.60
Anticoccidiano* ⁴	0.50	0.50	0.50
Inerte	1.00	1.60	2.50
	1000	1000	1000
Níveis nutricionais, g kg⁻¹ de ração			
EMAn, kcal/kg	3160	3150	3150
Proteína Bruta	203	200	190
Cálcio	8.2	8.6	8.0
Fósforo disponível	4.1	4.3	4.0
Lisina digestível	10.9	10.8	10.8
Metionina digestível	5.8	5.5	5.6
Treonina digestível	7.1	7.1	7.1
Triptofano digestível	1.9	1.9	1.9

*1Vitamin premix: Vit. A 9,000,000 UI/kg; Vit. D3 2,500,000 UI/kg; Vit. E 20,000 UI/kg; Vit. K3 2,500 mg/kg; Vit. B1 2,000 mg/kg; Vit. B2 6,000 mg/kg; Pantotenic acid 12 g/kg; Vit. B6 3,000 mg/kg; Vit. B12 15,000 mcg/kg; Nicotinic acid 35 g/kg; Folic acid 1,500 mg/kg; Biotin 100 mg/kg; Selenium 250 mg per kg of premix. *2Mineral premix: Iron 100 g/kg; Cooper 20 g/kg; Manganese 130 g/kg; Cobalt 2,000 mg/kg; Zinc 130 mg/kg; Iodine 2,000 mg per kg of premix. *3 RONOZYME® HiPhos GT 20000; *4 Salinomycin 12%, 66 ppm.

3.2.1. Ensaio experimental 1- etapa 2

O Experimento 1 foi realizado em 2019, no centro experimental da empresa DSM Produtos Nutricionais, *Animal Nutrition Center* – ANC, localizado em Mairinque, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 2400 frangos de corte da linhagem Cobb 500 distribuídos em 8 tratamentos com 12 repetições de 25 aves cada. Os animais foram criados em cama nova, em galpão climatizado, durante um período de 42 dias, com ração e água *ad libitum*. Neste estudo, foram avaliados diferentes aditivos nutricionais: T1: Blend de óleos essenciais e ácido orgânico; T2: T1 + muramidase; T3: T1 + protease; T4: T2 + protease; T5: Enramicina; T6: T5 + muramidase; T7: T5 + protease, e T8: T6 + protease. As dietas foram formuladas de acordo com os níveis da indústria, à base milho e farelo de soja (Tabela 2) e com inclusão da enzima fitase.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 28 dias de idade, 24 aves por tratamento, tomadas de forma aleatória, dentro de cada repetição, e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 3.2.

3.2.2. Ensaio experimental 2- etapa 2

O Experimento 2 foi realizado em 2021, no centro experimental da empresa DSM Produtos Nutricionais, *Animal Nutrition Center* – ANC, localizado em Mairinque, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 2475 frangos de corte da linhagem Cobb 500 distribuídos em 9 tratamentos com 11 repetições de 25 aves cada. Os animais foram criados em galpão climatizado, cama reutilizada, 3º lote, durante um período de 42 dias, com ração e água *ad libitum*. Neste estudo, foram avaliados diferentes aditivos nutricionais: T1: tratamento controle negativo sem aditivo (CN); T2: CN + muramidase; T3: CN + blend de óleos essenciais; T4: T3 + enzima muramidase; T5: blend de óleos essenciais e ácido orgânico; T6: CN + ácido orgânico; T7: CN + fitogênico; T8: CN + blend de ácidos orgânicos; T9: CN + prebiótico. As dietas foram formuladas de acordo com os níveis da indústria, à base milho e farelo de soja (Tabela 2) e com inclusão da enzima fitase.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 28 dias de idade, 22 aves por tratamento, tomadas de forma aleatória, dentro de cada repetição, e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 3.2.

3.2.3. Ensaio experimental 3- etapa 2

O Experimento 3 foi realizado em 2021, no centro experimental da empresa DSM Produtos Nutricionais, *Animal Nutrition Center* – ANC, localizado em Mairinque, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 2200 frangos de corte da linhagem Cobb 500 distribuídos em 8 tratamentos com 11 repetições de 25 aves cada. Os animais foram criados em galpão climatizado, com cama reutilizada, 5º lote, durante um período de 42 dias, com ração e água *ad libitum*. Neste estudo, foi avaliado o desafio microbiológico como um fator adicional. Aos 10, 11 e 12 dias de idade, as aves foram inoculadas por via oral com *Clostridium perfringens* (10^8 UFC/ave – isolado do campo) com o objetivo de promover um desafio à mucosa intestinal e simular situações de campo.

Desta forma, os tratamentos foram: T1: tratamento sem desafio e sem aditivo; T2: tratamento com desafio e sem aditivo; T3: T2 + enramicina; T4: T2 + blend 1 de óleos essenciais e ácido orgânico; T5: T2 + blend 2 de óleos essenciais e ácido orgânico; T6: T2 + prebiótico; T7: T2 + muramidase; T8: T6 + muramidase. As dietas foram formuladas de acordo com os níveis da indústria, à base milho e farelo de soja (Tabela 2) e com inclusão da enzima fitase.

As amostras de sangue foram coletadas dos frangos aos 28 dias de idade, 11 aves por tratamento, e 8 aves do grupo controle, tomadas de forma aleatória, dentro de cada repetição, e sem jejum prévio. As coletas e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 3.2.

3.2.4. Análise estatística

O teste **t pareado** foi usado para verificar se há diferença entre os dois métodos avaliados. Posteriormente, os dados foram padronizados em **escala Z** com o objetivo de padronização dos dados em uma mesma escala. Por fim, o **coeficiente de correlação intraclassa (ICC)** foi utilizado como medida de confiabilidade para avaliar a correlação entre as duas metodologias. Foi utilizada a seguinte classificação dos valores de ICC como referência, segundo Weir (2005): valores de 1,00 a 0,81 (excelente reprodutibilidade); 0,80 a 0,61 (muito bom); 0,60 a 0,41 (bom); 0,40 a 0,21 (razoável); e 0,20 a 0,00 (ruim).

3.3. Resultados e Discussão

O teste de T realizado apontou que existem diferenças entre as duas metodologias ($P < 0,001$). Em adição, o coeficiente intraclassa revelou que a reprodutibilidade entre elas é pobre (ICC 0,04), ou seja, um marcador não é capaz de prever o outro, demonstrando que não existe correlação entre as duas metodologias (Figura 2).

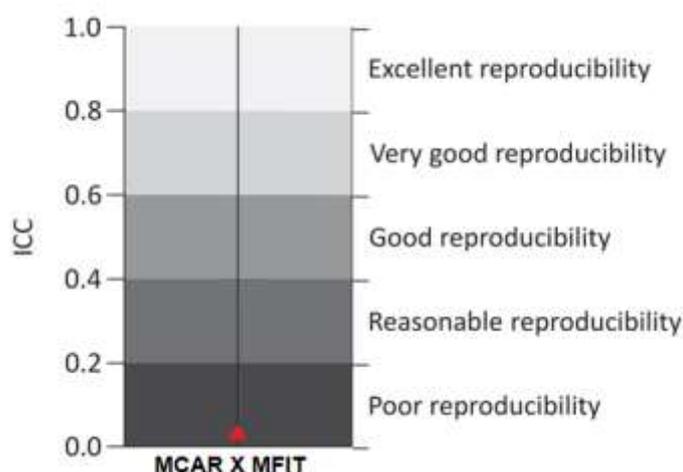


Figura 2. Neste gráfico o marcador em vermelho triangular ilustra a pobre reprodutibilidade (*poor reproducibility*) pelo coeficiente de correlação intraclassa (ICC) entre as metodologias Carotenoides (MCAR) e FITC-d (MFIT).

De acordo com a descrição dos métodos e objetivos de cada um, esperava-se uma correlação linear negativa, ou seja, a redução na passagem do marcador FITC-d em aves com epitélio intestinal íntegro implicaria em maior capacidade de absorção de nutrientes, refletindo em maiores níveis sanguíneos de carotenoides totais. Porém, os dados se comportaram de forma muito distinta entre as duas metodologias aplicadas, não sendo possível demonstrar uma relação direta entre ambas com os dados obtidos neste projeto. Não houve interação entre eles como se esperava na hipótese inicial desta tese. Desta forma, podemos inferir que são biomarcadores para mensurar saúde intestinal, porém com focos distintos.

O método FITC-d indica, através da passagem via paracelular desta macromolécula, a ruptura das junções entre as células epiteliais (*tight junctions*), portanto, necessariamente precisa haver o dano entre as células para que este seja mensurado no sangue. A ausência do marcador indica que a barreira intestinal, ou seja, a junção entre os enterócitos está íntegra. Porém, se o animal apresenta outros fatores que impactam a homeostase intestinal comprometendo o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, este método não é capaz de identificar.

Por outro lado, a absorção dos carotenoides totais no sangue dos frangos, ocorre pela via transcelular, intimamente relacionado ao metabolismo lipídico. As distintas vias de passagem destas moléculas para a circulação sanguínea das aves pode explicar o distinto comportamento encontrado entre as duas metodologias.

Os carotenoides estão de forma mais ampla relacionados com a funcionalidade intestinal das aves e não apenas integridade do epitélio intestinal, podendo ser um potencial biomarcador para sutis alterações de homeostase que comprometam a funcionalidade intestinal. O aumento na absorção, quando do uso de algum aditivo na dieta que proporciona uma melhor saúde intestinal, independente do modo de ação, indica que a ave teve uma maior capacidade de aproveitar os nutrientes da dieta e consequentemente melhorar a eficiência alimentar o que se reflete em melhor desempenho zootécnico.

Melhorias em funcionalidade gastrointestinal estão relacionadas principalmente com o melhor aproveitamento da dieta, através da manutenção da integridade e função da mucosa intestinal, modulação da microbiota gastrointestinal, melhor capacidade de digestão e absorção dos nutrientes e modulação do sistema imunológico dos animais (Celi et al., 2017). O equilíbrio da função de barreira intestinal, da inflamação e homeostase da microbiota são essenciais para a melhor eficiência alimentar e desempenho zootécnico (Baxter et al., 2019).

De acordo com as referências de literatura, algumas hipóteses foram levantadas para correlacionar a absorção dos carotenoides com funcionalidade intestinal: lesões nos enterócitos estão associadas à redução da capacidade celular em absorver os nutrientes (Awad et al., 2017); inflamação intestinal local aumenta o estresse oxidativo consumindo para a função antioxidante dos carotenoides (Allen & Fetterer, 2002); e estudo realizado por Beauclercq et al. (2019) demonstrou haver relação entre eficiência digestiva e coloração na porção lipofílica do soro no espectros entre 430 e 516 nm, o que corresponde à zona de absorção dos carotenoides luteína e zeaxantina; os autores observaram que aves com baixa capacidade digestiva apresentaram coloração sérica 31% menor comparado às aves de alta capacidade digestiva, indicando desta forma que a abordagem colorimétrica pode ser uma possibilidade rápida e fácil de determinação da eficiência digestiva.

Conseguir identificar problemas entéricos em aves mesmo antes de apresentarem os sinais clínicos é uma vantagem, pois sinaliza de forma preventiva e possibilita intervenções para recuperação antes que aumentem os efeitos negativos na redução do consumo de ração, impactos no crescimento, desequilíbrio do sistema imunológico e outros parâmetros de saúde.

O comprometimento da integridade da mucosa intestinal está relacionado com o aumento da inflamação local e má absorção. Como consequência, ocorre o comprometimento do crescimento das aves por interferir na

síntese e degradação de proteínas, prejudicar a atividade de transportadores de nutrientes, aumentar o uso de nutrientes por microrganismos patogênicos no lúmen intestinal, aumentar as necessidades para manutenção do sistema imune e reduzir a capacidade digestiva (menor síntese e atividade enzimática) (Awad et al., 2017).

De acordo com os autores Ducatelle et al. (2018) e Schoultz e Keita (2020), é necessária uma combinação de múltiplos biomarcadores para se chegar a um diagnóstico mais completo e assertivo, ou seja, um método não invalida o outro, pelo contrário, devem ser utilizados de forma complementar.

Avaliamos a variabilidade dos dados em relação à média de cada parâmetro dos dados dos três estudos selecionados na etapa 2, como outra forma de comparar as duas metodologias (Tabela 3). Como observado na tabela, o método de avaliação dos níveis sanguíneos de carotenoides possui menor variabilidade, CV=25.17% em relação do FITC-d, 59.88%, na base de dados avaliada.

Tabela 3 - Coeficiente de variação (CV), comparativo entre as metodologias em avaliação.

Parâmetro sanguíneo	Carotenoides Totais (mg/L)	FITC-Dextran (mg/ml)
N amostral	111	103
Média	4,31	0,1533
CV, %	25,17	59,88

Em relação à variabilidade dos dados, uma das hipóteses que poderia explicar a menor variabilidade dos dados entre as aves avaliadas poderia ser a complexidade da metodologia. A metodologia de avaliação de carotenoides é muito mais simples, comparada ao FITC-d. Coleta-se o sangue e *in loco*, faz-se a mensuração em equipamento portátil na granja, não sendo necessário separar o soro, congelar e enviar para laboratório externo. Outra vantagem seria a não necessidade da administração de marcadores previamente à mensuração sanguínea.

Medir a concentração sérica de FITC-d é um método eficaz para avaliar a permeabilidade intestinal em frango de corte, porém necessita diversos cuidados que podem comprometer os resultados das análises, dentre eles: (a) pesagem e preparo do marcador previamente à administração. Este marcador consiste em um produto na forma de pó e deve ser diluído no momento da administração. Como é sensível à luz, o frasco com produto diluído deve ficar protegido da luz durante todo o momento da aplicação na granja. (b) outros pontos de variação do método estão na dose a ser aplicada, período de jejum, tempo entre inoculação e a coleta de sangue, manipulação das amostras e a análise laboratorial. Em revisão publicada recentemente, Liu, et al. (2021), alertam sobre as variações do método, os cuidados e padronizações a serem considerados e recomendam a realização de ensaios menores preliminares para otimizar o protocolo que será aplicado.

Outra hipótese que explicaria a variabilidade do método FITC-d nos ensaios experimentais avaliados, se refere aos diferentes modelos de desafio utilizados, microbiológico, nutricional e sem desafio, desenhados para serem brandos, cujo objetivo era causar situações similares ao campo, e não lesões severas. A inflamação causada por estes desafios aplicados causa a ruptura das junções celulares, porém a variabilidade da severidade intestinal, para o marcador FITC-d, parece ser um fator determinante para a variabilidade da metodologia. Nos casos em que a lesão causada é mais severa, o marcador passa em maior quantidade para a circulação, o que reduz a variabilidade. Por outro lado, Cowieson et al. (2020) relatam que a concentração plasmática de carotenoides pode ser um potencial biomarcador tanto para infecções coccidianas leves como em casos mais agressivos de desafio. Estas hipóteses vêm de acordo ao trabalho de Liu et al. (2021), que descreve que os resultados da concentração sérica de FITC-d variam consideravelmente em diferentes estudos, e no mesmo estudo comparado ao grupo controle sem desafio. Além do delineamento experimental, tipo de dieta, saúde das aves, modelo de desafio e idade de coleta, os autores citam também variação entre linhagem, idade e gênero das aves.

Comparado ao método FITC-d, a avaliação do biomarcador carotenoides totais é mais simples e mais rápida, menos invasiva, necessária apenas um momento de contenção da ave para a coleta de sangue, e de menor custo (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparativos entre os métodos iCheck CAROTENE e FITC-d.

Etapas/custos	iCheck Carotene	FITC-d
Contenção das aves	1x: apenas na coleta de sangue	2x: inoculação oral do marcador e coleta de sangue após 2h da inoculação oral
Atividades na granja	Coleta de sangue, extração do carotenoide e leitura da concentração sanguínea em equipamento portátil	Diluição do marcador, administração oral, coleta de sangue
Atividades em laboratório	Não se aplica	Pesagem do marcador em pó em balança analítica (preparo prévio); centrifugação do sangue para separar o soro em microtubos para congelar e análise do marcador no soro (quando a análise é realizada em laboratório externo, considerar o envio de material biológico refrigerado)
Custos por amostra Ano base, 2023	Kit de extração iEx € 5,5 / R\$ 30,25 por amostra (tx de conversão considerada R\$ 5.5)	R\$ 105,00 por amostra
Tempo de análise/por amostra	5 min	Variado. Se considerarmos todas as etapas, incluindo o envio e dinâmica do laboratório. Mínimo 1 semana para retorno dos resultados

3.4. Conclusões

Diante dos dados avaliados nesta etapa, concluímos que o método de mensuração dos níveis sanguíneos de carotenoides totais no sangue de frangos de corte com o uso do equipamento portátil iCheck Carotene é mais simples, rápido e de menor custo, além de apresentar menor variabilidade em comparação ao método FITC-d, podendo ser utilizado em uma escala maior, associando-se as duas metodologias quando necessário, em algumas etapas das avaliações experimentais.

Referências

- Allen, P.C. & Fetterer, R. H. Interaction of Dietary Vitamin E with *Eimeria maxima* Infections in Chickens. 2002 Poultry Science 81:41–48.
- Awad, W.A.; Hess, C.; Hess, M. Enteric Pathogens and Their Toxin-Induced Disruption of the Intestinal Barrier through Alteration of Tight Junctions in Chickens. Toxins 2017, 9, 60.

- Baxter, M.F.A., Merino-Guzman, R., Latorre, J.D., Mahaffey, B.D., Yang, Y., Teague, K.D., Graham, L.E., (...), Tellez, G. Optimizing fluorescein isothiocyanate dextran measurement as a biomarker in a 24-h feed restriction model to induce gut permeability in broiler chickens. (2017) *Frontiers in Veterinary Science*, 4 (APR), art. no.56. doi:10.3389/fvets.2017.00056.
- Baxter, M. F., Latorre, J. D., Dridi, S., Merino-Guzman, R., Hernandez-Velasco, X., Hargis, B. M., & Tellez-Isaias, G. (2019). Identification of serum biomarkers for intestinal integrity in a broiler chicken malabsorption model. *Frontiers in veterinary science*, 6, 144.
- Beaulercq, S., Nadal-Desbarats, L., Germain, K., Praud, C., Emond, P., Le Bihan-Duval, E., & Mignon-Grasteau, S. (2019). Does lipidomic serum analysis support the assessment of digestive efficiency in chickens? *Poultry science*, 98(3), 1425-1431.
- Celi, P; Cowieson, A.J.; Fru-Nji, F; Steinert, R.E.; Klunter, A.M.; Verlhac, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology* 234 (2017) 88-100.
- Cowieson, A. J., et al. "Effect of coccidial challenge and vaccination on the performance, veterinary postmortem scores, and blood biochemistry of broiler chickens." *Poultry science* 99.8 (2020): 3831-3840.
- Ducatelle R.; E. Goossens; F. D. Meyer; V. Eeckhaut; G. Antonissen; F. Haesebrouck; F.V. Immerseel. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Veterinary Research* (2018) 49:43.
- Liu, J., Teng, P. Y., Kim, W. K., & Applegate, T. J. (2021). Assay considerations for fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-d): an indicator of intestinal permeability in broiler chickens. *Poultry Science*, 100(7), 101202.
- Schultz, I., & Keita, A. V. (2020). The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability. *Cells*, 9(8), 1909.
- Vicuña E, Kuttappan V, Tellez G, Hernandez-Velasco X, Seeber-Galarza R, Latorre J, Hargis BM, Bielke LR. Dose titration of FITC-d for optimal measurement of enteric inflammation in broiler chicks. *Poult Sci*. 2015;94(6):1353–9. doi:10.3382/ps/pev111.
- Weir, J.P., 2005. Quantifying test-retest reliability using the intraclass correlation coefficient and the SEM. *J. Strength Cond. Res. Natl. Strength Cond. Assoc.* 19, 231–240. <https://doi.org/10.1519/15184.1>.

4. ETAPA 3 – RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE CAROTENOIDES COM O USO DE ADITIVOS NUTRICIONAIS E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO - UMA ABORDAGEM DE APRENDIZADO DE MÁQUINA

Resumo

A etapa 3 desta tese consistiu na avaliação da relação entre os níveis de carotenoides sanguíneos de frangos recebendo ou não aditivos nutricionais na dieta e o desempenho zootécnico utilizando-se uma abordagem de máquina com base em dados selecionados nas etapas 1 e 2 apresentados anteriormente. Os objetivos foram determinar se a metodologia para a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte com o uso de um equipamento portátil consiste em um potencial biomarcador para avaliações experimentais de aditivos nutricionais e se existe correlação entre o biomarcador em estudo com os dados de desempenho das aves. Foi possível observar que a inclusão de aditivo nutricional na dieta de frangos de corte submetidos ou não a desafio sanitário aumenta significativamente a concentração sanguínea de carotenoides totais no sangue das aves, independente do desenho experimental ou tratamento nutricional aplicado. A análise dos dados também mostrou a existência de correlação positiva significativa entre o marcador carotenoide com o ganho de peso e negativa com conversão alimentar nos períodos de 0 a 35 e 0 a 42 dias de idade. Diante dos resultados, foi possível concluir que a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte com o uso de um equipamento portátil é um potencial biomarcador para avaliações experimentais de aditivos nutricionais, pois indica que houve melhoria na funcionalidade intestinal, que está diretamente relacionada com a melhora em desempenho zootécnico.

Palavras-chave: Biomarcadores, Aditivos, Funcionalidade intestinal, Desempenho

Abstract

Step 3 of this thesis consisted of to evaluate the relationship between blood carotenoids levels of broilers receiving or not nutritional additives in the diet and the zootechnical performance using a machine learning analysis based on data selected in steps 1 and 2. The objectives were to determine whether the methodology for measure total broilers blood carotenoids using a portable device consists of a potential biomarker for nutritional additives experimental trial and whether there is a correlation between the biomarker and the performance broiler data. It was observed that the inclusion of nutritional additive in the diet broilers submitted or not to sanitary challenge significantly increases the blood carotenoids concentration, regardless of the experimental design or nutritional treatment applied. Data analysis also showed a significant positive correlation between the carotenoid marker with body weight gain and negative correlation with feed conversion ratio in the periods from 0 to 35 and 0 to 42 days of age. According to results, it was concluded that the determination of total broiler blood carotenoids using a portable device is a potential biomarker for nutritional additives experimental trial, as it indicates that there was an improvement in intestinal functionality, which is directly related to the improvement in performance.

Keywords: Biomarkers, Additives, Intestinal functionality, Performance

4.1. Introdução

Com base nos resultados da primeira e segunda etapas desta tese, que demonstram que os níveis sanguíneos de carotenoides respondem aos tratamentos dietéticos que foram aplicados, e que o método de mensuração com o uso do equipamento portátil iCheck™ CAROTENE é menos invasivo, mais rápido, de menor custo e com menor variabilidade em relação ao método ao qual foi comparado, seguimos para a terceira e última etapa do trabalho. Esta etapa consistiu do estudo conjunto dos resultados experimentais de desempenho das aves e daqueles referentes ao biomarcador e se a metodologia proposta nesta tese é uma potencial ferramenta para avaliações experimentais de aditivos nutricionais em frangos de corte.

O objetivo da análise conjunta dos dados foi verificar se a metodologia para a determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte com o uso de um equipamento portátil consiste de uma ferramenta potencial para ser um biomarcador para avaliações experimentais de aditivos nutricionais. A hipótese do trabalho é que, independentemente do desenho experimental ou tratamento nutricional aplicado, as aves que recebem algum aditivo melhorador de desempenho na dieta, em especial aqueles com função de melhoria na funcionalidade intestinal, apresentem respostas no desempenho associadas a maiores níveis de carotenoides no sangue.

Como todo o estudo de aditivo nutricional busca melhorar a eficiência alimentar dos frangos de corte, correlacionar o biomarcador em estudo com os dados de desempenho zootécnico foi o objetivo adicional incluído na etapa 3 deste projeto. Os biomarcadores são mensurados para indicar melhoras de funcionalidade intestinal e consequente melhora de eficiência alimentar ou de ganho de peso.

4.2. Material e Métodos

Foram selecionados para esta etapa do projeto cinco ensaios experimentais, já descritos nas etapas 1 e 2 desta tese e sumarizados na Tabela 1. Com o objetivo adicional de entender o biomarcador em resposta ao desempenho zootécnico, foram selecionados os dados dos grupos de animais com base nos resultados de desempenho com diferenças estatísticas entre os tratamentos, tendo sempre o comparativo entre um grupo tratado e outro controle. Foram selecionados apenas os estudos que analisaram os carotenoides a partir do sangue total, sendo retirados os que utilizaram plasma ou soro. Os tratamentos aplicados (aditivos nutricionais) às dietas dos frangos de corte estão descritos nas etapas 1 e 2 do projeto tese.

Tabela 1 - Descrição sumária dos ensaios que forneceram dados de nível sanguíneo de carotenoides na etapa 3 deste estudo.

No	Ano (ID* do Projeto)	Idade de Coleta	Desafio	N amostral	Local
1	2016 (BR 150406)	28d	Sim	64	ANC DSM ¹
2	2019 (BR 190224)	28d	Não	96	ANC DSM ¹
3	2021 (BR 200317)	28d	Não	66	ANC DSM ¹
4	2021 (BR 210627)	28d	Sim	60	ANC DSM ¹
5	2017 (BR 170330)	35d	Não	80	UFPR ²

¹ANC DSM – *Animal Nutrition Center*, DSM Produtos Nutricionais, Mairinque - SP. ²UFPR – Curitiba – PR.

*ID: identificação do projeto.

4.2.1. Análise estatística

Para avaliar a influência do uso de aditivos nutricionais na absorção de carotenoides os resultados de 5 experimentos foram submetidos à **análise conjunta de dados**, realizada no procedimento SAS PROC MIXED a 5% de probabilidade, considerando-se o efeito de experimento como aleatório.

Análise de componentes principais foi realizada para verificar a relação das variáveis em estudo. Inicialmente consideraram-se os cinco experimentos, porém como observado na Figura 1A, houve diferença entre experimentos, sendo excluídos os dados do experimento 5. Após esse procedimento, verificou-se novamente o efeito dos experimentos como é demonstrado na Figura 1B. Consideraram-se os dois primeiros componentes principais, pois eles explicaram mais de 70% da variação dos dados. Estes foram plotados em um gráfico bidimensional para verificar a relação das variáveis em estudo.

Posteriormente, realizou-se **análise discriminante canônica (CDA)** para discriminar as principais variáveis que diferenciam o uso de aditivos na alimentação de frangos de corte. O modelo geral do CDA é descrito na Eq (1).

$$Z_n = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n \quad [1]$$

Onde: Z_n é a variável dependente (com e sem uso de aditivos), α é o intercepto, X_n são as variáveis explicativas e β_n são os coeficientes discriminantes para cada variável explicativa. O procedimento *stepwise* foi utilizado para selecionar variáveis independentes com maior poder discriminatório sobre as variáveis dependentes. Este procedimento é uma ferramenta de mineração de dados que utiliza significância estatística para selecionar as variáveis independentes utilizadas em um determinado modelo matemático (Smith, 2018). O processo de seleção para adição ou remoção de variáveis foi realizado com base no teste estatístico Lambda de Wilks (p-valor < 0,05).

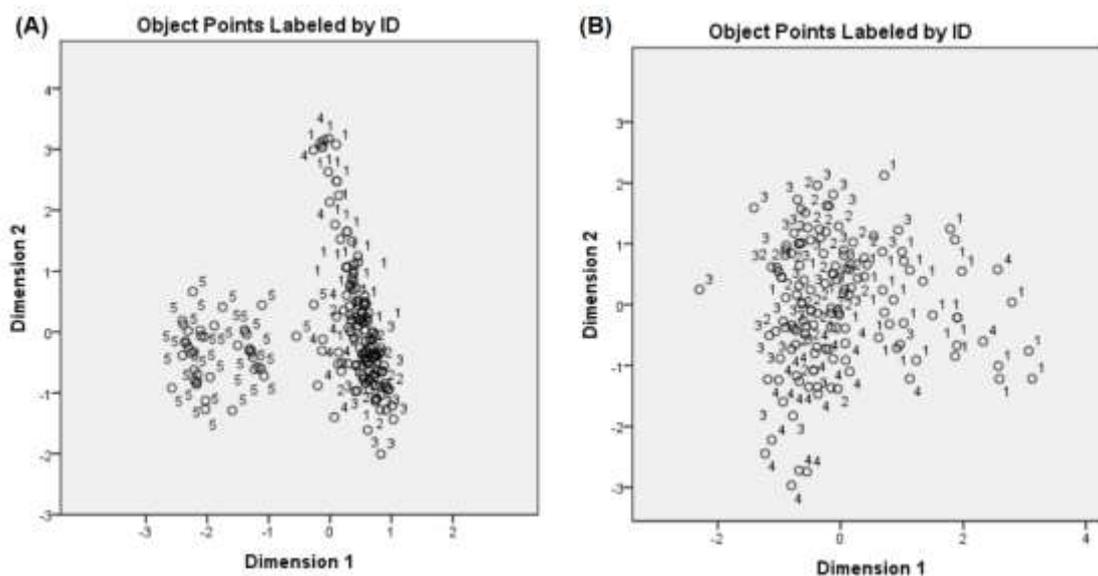


Figura 1. Análise de componentes principais da relação de variáveis de desempenho aos 35 e 42 dias com o carotenoide aos 28 dias de idade, considerando os 5 experimentos (A) e os 4 experimentos (B).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Influência dos aditivos nutricionais na absorção dos carotenoides

Na Tabela 2 estão apresentados os dados dos níveis sanguíneos de carotenoides totais (mg/L) em frango de corte aos 28 e 35 dias de idade, alimentados com ou sem a adição de aditivo nutricional na dieta. Com base nos resultados obtidos a partir da análise conjunta dos dados, podemos observar que a inclusão de aditivo nutricional na dieta de frango de corte submetidos ou não a desafio sanitário aumenta significativamente a absorção de carotenoides, mensurado através de níveis sanguíneos, indicando uma melhor integridade intestinal das aves. Na base de dados avaliada o aumento encontrado foi de 14%.

Tabela 2 - Níveis sanguíneos de carotenoides totais em frangos de corte aos 28 ou 35 dias de idade com ou sem a adição de aditivo nutricional na dieta.

Aditivo nutricional	Níveis sanguíneos de carotenoides totais (mg/L)
Com	4,28
Sem	3,74
CV, %	23,25
Valor P	0,0013

A qualidade dos ingredientes e a composição dos nutrientes da dieta desempenham um papel significativo no desenvolvimento e funcionalidade do trato gastrointestinal, bem como o uso de aditivos que podem influenciar no desenvolvimento e na função do sistema digestório, incluindo o sistema imunológico e a microbiota (Celi et al., 2017). Neste estudo, independente do aditivo nutricional utilizado nos experimentos, o aumento de carotenoides no sangue dos frangos de corte refletiu a contribuição na melhoria da funcionalidade gastrointestinal dos frangos de corte.

4.3.2. Relação da absorção dos carotenoides com desempenho zootécnico

A relação do desempenho aos 35 e 42 dias com o carotenoide é apresentado na Figura 2. Observou-se que os dois **componentes principais** explicam 72,81% dos dados, em que o primeiro componente é representado pela conversão alimentar (ca) e consumo de ração médio (crm) nos períodos de 0-35 e 0-42 dias, enquanto o segundo é representado pelo ganho de peso médio (gpm) nos períodos de 0-35 e 0-42 dias com os níveis sanguíneos de carotenoide aos 28 dias de idade (MCARO28). Observou-se ainda uma relação moderada positiva entre o ganho de peso aos 35 e 42 dias com os níveis de carotenoide totais no sangue dos frangos de corte aos 28 dias, bem como moderada negativa em relação à conversão alimentar, também nos dois períodos, 35 e 42 dias.

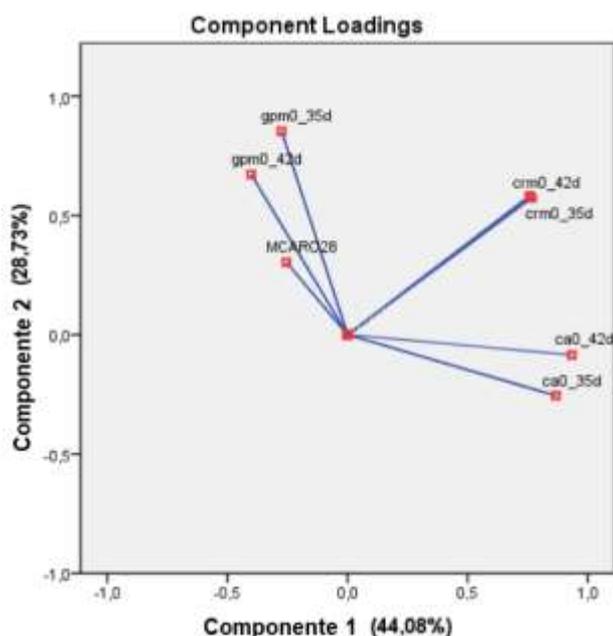


Figura 2. Relação do desempenho nos períodos de 0-35 dias e 0-42 dias de idade com os níveis sanguíneos de carotenoide em frangos de corte aos 28 dias de idade.

A mesma avaliação da relação do desempenho aos 35 e 42 dias foi realizada acrescentando-se a variável FITC-d, a qual não apresentou relação significativa com nenhuma das demais variáveis em estudo. O resultado desta análise está representado na Figura 3, com o vetor do FITC-d próximo ao ponto 0,0 no biplot.

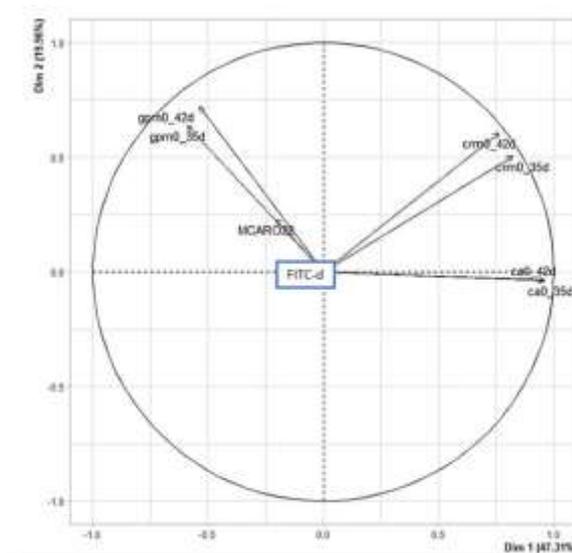


Figura 3. Relação do desempenho nos períodos de 0-35 dias e 0-42 dias de idade com os níveis sanguíneos de carotenoide e FITC-d em frangos de corte aos 28 dias de idade.

A Tabela 3 apresenta o sumário da **análise discriminante canônica**. Observou-se que o método *stepwise* selecionou três variáveis, em ordem de importância, que melhor diferenciam o uso ou não de aditivos: consumo de ração no período de 0 a 42 dias (CR_0_42d ($P < 0,001$)), consumo de ração no período de 0 a 35 dias (CR_0_35d ($P < 0,001$)) e níveis sanguíneos de carotenoides aos 28 dias de idade (CARO ($P < 0,001$)). Somente uma função discriminante canônica foi gerada, porém essa explicou 100% da variação dos dados. 76,4% das aves foram classificadas corretamente no seu grupo de origem, com destaque para as aves que receberam aditivos, apresentando uma classificação de 91,18%. Uma hipótese levantada para explicar a função discriminante canônica que foi gerada classificar melhor as aves que receberam aditivo, foi o fato destas aves estarem com a funcionalidade intestinal mais equilibrada e desta forma o consumo de ração impacta de forma diretamente proporcional na concentração de carotenoides no sangue. No caso das aves controle, ou seja, sem uso de aditivos na dieta, podem estar com disfunções na funcionalidade intestinal, ou por lesões nos enterócitos que prejudicam a capacidade de absorção dos nutrientes da dieta e reduz a eficiência digestiva, ou por reações inflamatórias intestinais locais que provocam o aumento no estresse oxidativo consumindo os carotenoides para a função antioxidante (Allen & Fetterer, 2002; Beauclercq et al. 2019) e a intensidade do desequilíbrio da homeostase intestinal está relacionada com a intensidade dos desafios aplicados aos modelos experimentais que podem aumentar ainda mais esta variação entre os grupos.

Tabela 3. Sumário da análise discriminante canônica para desempenho de frangos aos 35 e 42 dias e o marcador carotenóide.

Variáveis na Análise				
<i>Step</i>		<i>Tolerance</i>	<i>F to Remove</i>	<i>Wilks' Lambda</i>
1	CR_0_42d	1,00	11,93	
2	CR_0_42d	0,20	22,03	0,98
	CR_0_35d	0,20	11,68	0,92
3	CR_0_42d	0,20	21,40	0,94
	CR_0_35d	0,20	11,57	0,89
	CARO	1,00	5,33	0,85
<i>Exact F</i>				
<i>Step</i>	<i>Statistic</i>	<i>df1</i>	<i>df2</i>	<i>P – valor</i>
1	11,93	1,00	138,00	0,00
2	12,27	2,00	137,00	0,00
3	10,21	3,00	136,00	0,00
Eigenvalues				
<i>Função</i>	<i>Eigenvalue</i>	<i>% of Variance</i>	<i>Cumulative %</i>	<i>Canonical Correlation</i>
1	0,225	100,00	100,00	0,43
Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients				
<i>Variáveis</i>	<i>Função 1</i>			
CARO	-0,45			
CR_0_35d	-1,45			
CR_0_42d	1,91			
Classificação dos Resultados				
		<i>Predicted Group Membership</i>		
		<i>Sim</i>	<i>Não</i>	
<i>Aditivos</i>	<i>Sim</i>	93,00 (91.18%)	9,00 (8,82%)	
	<i>Não</i>	24,00 (63.16%)	14,00 (36,84%)	

4.4. Conclusões

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a determinação de carotenóides totais no sangue de frangos de corte com o uso de um equipamento portátil é um potencial biomarcador para avaliações experimentais de aditivos nutricionais, ou seja, independente do desenho experimental ou tratamento nutricional aplicado, as aves que recebem algum aditivo na dieta, com função de melhoria na funcionalidade intestinal, apresentaram maiores níveis de carotenóides no sangue. Adicionalmente, foi possível comprovar correlação significativa entre as mensurações de carotenóides com dados de desempenho zootécnico, o que está diretamente relacionado com a melhora em funcionalidade intestinal e uso mais eficiente dos nutrientes.

Referências

Allen, P.C. & Fetterer, R. H. Interaction of Dietary Vitamin E with *Eimeria maxima* Infections in Chickens. 2002 Poultry Science 81:41–48.

Beaulercq, S., Nadal-Desbarats, L., Germain, K., Praud, C., Emond, P., Le Bihan-Duval, E., & Mignon-Grasteau, S. (2019). Does lipidomic serum analysis support the assessment of digestive efficiency in chickens?. Poultry science, 98(3), 1425-1431.

Celi, P; Cowieson, A.J.; Fru-Nji, F; Steinert, R.E.; Klünter, A.M.; Verlhac, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. Animal Feed Science and Technology 234 (2017) 88-100.

Smith, G. Step away from stepwise. Journal of Big Data, 5: 2-12, 2018.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação de carotenoides totais no sangue de frangos de corte é um potencial biomarcador para avaliações experimentais de aditivos nutricionais, ou seja, independente do desenho experimental ou tratamento nutricional aplicado, as aves que recebem algum aditivo na dieta, com função de melhoria na funcionalidade intestinal, apresentaram maiores níveis de carotenoides no sangue, comparado a um grupo controle. Adicionalmente, foi possível comprovar correlação significativa entre as mensurações de carotenoides com dados de desempenho zootécnico, o que está diretamente relacionado com a melhora em funcionalidade intestinal e uso mais eficiente dos nutrientes.

O método de mensuração com o uso do equipamento portátil iCheck™ CAROTENE é mais simples, rápido e de menor custo, além de apresentar menor variabilidade em comparação ao método FITC-d, independente da severidade do desafio aplicado nos estudos. Desta forma, pode ser utilizado em uma escala maior, associando-se as duas metodologias quando necessário.

Como continuidade, recomenda-se aprofundar os estudos sobre como os frangos absorvem os carotenoides para entender melhor os fatores que afetam esse processo, com experimentos controlados e com foco nas particularidades das dietas e fatores genéticos. Também é crucial realizar avaliações de campo, aumentando e diversificando o número amostral para verificar se a medição dos níveis de carotenoides no sangue reflete de forma consistente no desempenho zootécnico. Além disso, explorar outros biomarcadores e indicadores produtivos que se correlacionam com funcionalidade gastrointestinal para uma compreensão mais completa. Por fim, verificar se a mensuração dos níveis de carotenoides no sangue é prática e financeiramente viável para a produção de frangos de corte, levando em consideração o custo, a facilidade de medição e se pode ser amplamente adotada pela indústria.