



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



LEANDRO DE CARVALHO MAQUINÉ

DESENVOLVIMENTO DE UM ADITIVO PROBIÓTICO UTILIZANDO BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONES DO TRATO GASTROINTESTINAL DE PATOS
CRIOULO (*Cairina moschata domesticus* L., 1758)

MANAUS-AMAZONAS

2024

LEANDRO DE CARVALHO MAQUINÉ

DESENVOLVIMENTO DE UM ADITIVO PROBIÓTICO UTILIZANDO BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONES DO TRATO GASTROINTESTINAL DE PATOS
CRIOULO (*Cairina moschata domesticus* L., 1758)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia. Área de
concentração: Biotecnologias para Área
Agroflorestal.

Orientador: Dr. José Odair Pereira

Coorientador: Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

MANAUS-AMAZONAS

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M297d Maquiné, Leandro de Carvalho
Desenvolvimento de um aditivo probiótico utilizando bactérias
ácido lácticas autóctones do trato gastrointestinal de patos crioulos
(*Cairina moschata domesticus* L., 1758) / Leandro de Carvalho
Maquiné . 2024
90 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Odair Pereira
Coorientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. *Enterococcus lactis*. 2. *Enterococcus ratti*. 3. *Enterococcus*
faecium. 4. Eficiência alimentar. I. Pereira, José Odair. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Consagro essa Tese a Deus por ter me permitido passar pelos piores momentos de turbulência da minha vida, com a perda de pessoas muito importantes, acometidas pelo covid-19 e me permitir seguir em frente.

Às pessoas mais próximas, que se tornaram família, que sempre acreditaram em mim e nunca me deixaram desistir. Professor Dr. Tetsuo Yamane (*in memoriam*-2022), que no mês de sua partida eterna, me pediu para não desistir do Doutorado. Ao Professor e grande Amigo, Dr. Antonio José Lapa, que acreditou no meu potencial e me deu muitos conselhos da vida acadêmica que foram fundamentais para meu amadurecimento. À Dra. Mirtes Tanae, que sempre esteve do meu lado, dando forças e conselhos acadêmicos.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Odair Pereira, que me repassou sua tranquilidade e muitos ensinamentos, além de me deixar confiante nos momentos de tensão dos quais foram necessários enfrentar e, pela paciência que dispôs a mim, durante esse longo processo de formação.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, por sua amizade de mais de 18 anos de UFAM. Agradeço por me acolher e me incentivar a seguir adiante nas dificuldades, principalmente nos momentos de maiores turbulências. Não foi fácil não heim, segurar as “broncas” do Doc. “PQ” como te chamo, muito obrigado, por tudo!!!!

Aos Professores e TAE's do Setor de Avicultura da UFAM, que não mediram esforços para que o experimento fosse realizado. Professor Dr. Joel Lima, Professor Dr. Marco Antônio e Professor Dr. João Rufino, além do TAE Francisco Chaves, que foram fundamentais nessa etapa de minha jornada. E a toda equipe do Setor de Avicultura. Muito obrigado!

À minha esposa Clarissa Seixas, por ser meu esteio há 20 anos, desde a minha graduação em Zootecnia, nunca largou minha mão e sempre acompanhou de perto minha vida acadêmica, em todos os seus degraus e ainda, me concedeu dois lindos filhos Leandro Seixas e Heitor Seixas, que são a razão de minha incessável busca por dias melhores.

À minha família, que sempre torceu de longe por mim e emanando forças e pensamentos positivos, para que eu alcançasse meu objetivo. Agradeço a vocês, Pai, mãe e irmãos e minha Vó Iracema e em especial ao meu filho mais velho, Andrei. Vovô Alcindo Maquiné, Vovó Auta

e Vovô Careca (sei que estão orgulhosos dae de cima!!). Me tornei o Primeiro Doutor da Família.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM (Resolução nº 006/2020 - POSGRAD UFAM - Edição 2020) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Processo nº 88882.461676/2019-01 - Universidade Federal do Amazonas) pelas bolsas concedidas.

Ao Núcleo de Estudos de Invertebrados e Vertebrados da Amazônia, sob a coordenação do Professor Dr. Adriano Teixeira, que enviou sua equipe para o suporte nas análises sanguíneas. Agradeço imensamente a todos do grupo.

Aos colegas do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana, Luana Casas, Aryana, Kelven e Ingrid e do Laboratório de Alimentos, Talita e Felipe, que tanto me ajudaram por horas a fio, para que os experimentos pudessem ser realizados nas bancadas. Muito obrigado, pessoal!!!. Fica aqui, minha gratidão.

MAQUINÉ, Leandro de Carvalho. **Desenvolvimento de um aditivo probiótico utilizando bactérias ácido lácticas autóctones do trato gastrointestinal de patos crioulo** (*Cairina moschata domesticus* L., 1758) – Universidade Federal do Amazonas, 2024.

RESUMO

Patos domésticos são aves que se adaptam às diferentes condições climáticas no Brasil e, sua criação está em expansão, principalmente pela facilidade de manejo. No Amazonas, é criado principalmente no sistema semi-extensivo ou livres a pasto, do qual os animais são cerrados em galpões fechados durante a noite para proteção contra predações. Alcançam a idade de abate aos 90 dias, portanto, são aves de crescimento lento. Na avicultura é evidente a necessidade de produtos alternativos, que possam ser utilizados como promotores do desempenho produtivo de aves, melhorando a conversão alimentar, o rendimento de carcaça e a saúde animal, dentre estes, destaca-se o uso de microrganismos com potencial probiótico. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de diferentes bactérias lácticas autóctones como aditivos probióticos para patos crioulos em alojamento sobre o desempenho, características de carcaça e parâmetros bioquímicos séricos. Patos domésticos (n = 96) da linhagem crioula foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram constituídos por um controle (sem uso de probiótico) e três cepas de bactérias lácticas autóctones como probiótico administradas às aves (*Enterococcus lactis*, *E. ratti* e *E. faecium*), com três repetições de oito aves cada. Os dados coletados foram submetidos ao teste de Tukey a 0,05. Durante a fase inicial não foi observado impacto significativo ($p > 0,05$) no consumo de ração e no ganho de peso, porém a eficiência alimentar foi afetada significativamente ($p < 0,05$), onde o grupo controle apresentou melhores resultados. Da mesma forma, durante as fases de crescimento e terminação, foram obtidos resultados variados em relação ao consumo de ração, ganho de peso e eficiência alimentar, sugerindo que a eficácia dos probióticos pode ser influenciada pela cepa específica e pelas condições ambientais, mas apresentando resultados inferiores ($p < 0,05$) do que aqueles obtidos no grupo controle. Notavelmente, certas cepas probióticas, como *E. lactis*, mostraram-se promissoras no aumento ($p < 0,05$) da eficiência alimentar e das características da carcaça ($p < 0,05$), enquanto outras, como *E. faecium*, exibiram efeitos significativos ($p < 0,05$) em todos os parâmetros bioquímicos séricos. Concluiu-se que, a inoculação de bactérias lácticas autóctones em patos crioulos mostrou efeitos variados na eficiência alimentar ao longo das fases de crescimento influenciados pela estirpe. Cepas específicas melhoraram as características da alimentação e da carcaça, enfatizando a importância na continuidade desses estudos.

Palavras-chave: *Enterococcus lactis*. *Enterococcus ratti*. *Enterococcus faecium*. Eficiência alimentar.

MAQUINÉ, Leandro de Carvalho. **Development of a probiotic additive using indigenous lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of landrace ducks (*Cairina moschata domestica* L. 1758)** – Federal University of Amazonas, 2024.

ABSTRACT

Domestic ducks are birds that adapt to the different climatic conditions in Brazil and their breeding is expanding, mainly due to their ease of management. In Amazonas, it is raised mainly in the semi-extensive or free-pasture system, in which the animals are enclosed in closed sheds at night to protect against predation. They reach slaughter age at 90 days, therefore, they are slow-growing birds. In poultry farming, the need for alternative products is evident, which can be used to promote the productive performance of birds, improving feed conversion, carcass yield and animal health, among which the use of microorganisms with probiotic potential stands out. The aim of the present study was to investigate the effects of different autochthonous lactic acid bacteria as probiotic additives for housed landrace ducks on performance, carcass characteristics and serum biochemical parameters. Domestic ducks (n = 96) of the Creole lineage were arranged in a completely randomized design, where the treatments consisted of a control (without the use of probiotic) and three strains of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic administered to the birds (*Enterococcus lactis*, *E. ratti* and *E. faecium*), with three replications of eight birds each. The collected data were subjected to the Tukey test at 0.05. During the initial phase, no significant impact ($p > 0.05$) on feed consumption and weight gain was observed, however feed efficiency was significantly affected ($p < 0.05$), where the control group showed better results. Likewise, during the growing and finishing phases, varied results were obtained in relation to feed consumption, weight gain and feed efficiency, suggesting that the effectiveness of probiotics may be influenced by the specific strain and environmental conditions, but presenting results lower ($p < 0.05$) than those obtained in the control group. Notably, certain probiotic strains, such as *E. lactis*, showed promise in increasing ($p < 0.05$) feed efficiency and carcass characteristics ($p < 0.05$), while others, such as *E. faecium*, exhibited effects significant ($p < 0.05$) in all serum biochemical parameters. In conclusion, the inoculations of indigenous lactic acid bacteria in creole ducks showed varying effects on feed efficiency throughout the growth phases, influenced by strain. Specific strains improved feeding and carcass characteristics, emphasizing the importance of their selections.

Keywords: *Enterococcus lactis*. *Enterococcus ratti*. *Enterococcus faecium*. Food efficiency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de fêmea de pato.....	15
Figura 2- Criação de patos em sistema caipira em consórcio com galinhas, em pequena propriedade da região metropolitana de Manaus.....	16
Figura 3 - Pato do mato, <i>Cairina moschata moschata</i>	17
Figura 4 - Patos crioulo machos e fêmeas	18
Figura 5 - Exemplar de pato crioulo macho adulto	20
Figura 6 - Ninhos para fêmeas de patos crioulo	41
Figura 7 - Etapas da incubação de ovos de fêmea de pato crioulo	42
Figura 8 - Probióticos preparados e armazenados	43
Figura 9 - Patinhos com um dia de vida	44
Figura 10 - Patinhos alojados em boxe experimental.....	45
Figura 11 - Patinho sendo gavado com cepa probiótica	46
Figura 12 - Testes das cepas frente a diferentes antibióticos.....	54
Figura 13 - Teste <i>cross streak</i> , compatibilidade entre as bactérias ácido lácticas de intestino de patos domésticos.....	57
Figura 144 - Resultado da PCR realizada para amplificação da região 16S rDNA	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das rações experimentais para patos.....	46
Tabela 2 - Taxa de sobrevivência (%) de bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos, desafiadas a diferentes pH ácido	50
Tabela 3 - Taxa de sobrevivência (%) de bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos, desafiadas a diferentes concentrações de sais biliares	51
Tabela 4 - Avaliação do efeito do NaCl à sobrevivência das bactérias ácido lácticas isoladas de intestino de patos domésticos	52
Tabela 5 - Taxa de sobrevivência (%) de bactérias ácido lácticas isoladas de intestino de patos domésticos, desafiadas a diferentes temperaturas de incubação	53
Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade de bactérias isoladas de patos domésticos à diferentes antibióticos.....	54
Tabela 7 - Zonas (mm) de inibição (média $\pm$ desvio padrão) de crescimento bacteriano frente as bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos	56
Tabela 8 - Índice de seleção de distância ao ideótipo pela escala de Mahalanobis, das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato gastrointestinal de patos domésticos.....	57
Tabela 9 - Identificação genética utilizando o gene 16S rDNA das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos. Dados GenBank	58
Tabela 10 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas fase inicial (1 a 35 dias)	60
Tabela 11 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas fase crescimento (36 a 70 dias).....	61
Tabela 12 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas fase terminação (71 a 90 dias).....	62
Tabela 13 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas durante todo o experimento (1 a 90 dias).....	63
Tabela 14 - Rendimento de carcaça de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas durante todo o período experimental.....	64
Tabela 15 - Rendimentos de cortes comerciais de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas durante todo o período experimental.....	67
Tabela 16 - Parâmetros bioquímicos séricos de patos crioulo em confinamento inoculados com cepas de bactérias ácido lácticas autóctones como aditivos probióticos	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 O pato doméstico	15
2.2 Características do pato doméstico.....	17
2.3 Principais linhagens de patos no Brasil	19
2.4 O pato crioulo	19
2.5 Aspectos importantes da fisiologia das aves.....	20
2.6 Microbiota intestinal de aves de produção.....	21
2.7 Relação dos probióticos com o hospedeiro	22
2.8 Mecanismos de ação dos probióticos	24
2.9 Seleção de microrganismos probióticos ideais	26
2.10 Respostas do uso de probióticos sobre o desempenho produtivo e rendimento de carcaça de aves de produção.....	27
2.11 Integridade intestinal e parâmetros sanguíneos em aves de produção	31
2.12 Efeitos benéficos dos probióticos em aves aquáticas.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Avaliação do potencial probiótico <i>in vitro</i>	35
4.1.1 Obtenção das amostras, isolamento e preservação.....	35
4.1.2 Caracterização morfofisiológica	35
4.1.3 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl.....	36
4.1.4 Tolerância a condições de pH ácido.....	36
4.1.5 Teste de tolerância a sais biliares	37
4.1.6 Atividade inibitória contra diferentes patógenos	37

4.1.7	Avaliação de segurança dos probióticos. Detecção de resistência antimicrobiana	38
4.1.8	Crescimento bacteriano em diferentes temperaturas.....	39
4.1.9	Extração do DNA genômico	39
4.1.10	Amplificação do gene 16S rDNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .	39
4.1.11	Sequenciamento do gene 16S rDNA pelo método de Sanger e classificação taxonômica.....	40
4.1.12	Teste de compatibilidade entre as cepas isoladas.....	40
4.1.13	Determinação do ideótipo	40
4.1.14	Análise estatística dos testes <i>in vitro</i>	41
4.2	Avaliação do potencial probiótico <i>in vivo</i>	41
4.2.1	Obtenção dos patinhos	41
4.2.2	Preparação das cepas probióticas para inoculação nas aves experimentais	42
4.2.3	Avaliação <i>in vivo</i> das cepas com potencial probiótico.....	43
4.2.4	Avaliação do desempenho zootécnico das aves e rendimento de carcaça	47
4.2.5	Avaliação dos parâmetros sanguíneos.....	47
4.2.6	Análise estatística dos testes <i>in vivo</i>	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	Avaliação <i>in vitro</i>	49
5.1.1	Isolamento	49
5.1.2	Tolerância ao pH ácido	49
5.1.3	Teste de tolerância a sais biliares	50
5.1.4	Teste de tolerância ao NaCl	51
5.1.5	Teste de crescimento em diferentes temperaturas.....	52
5.1.6	Teste de susceptibilidade a antibióticos	53
5.1.7	Atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas de aves	55
5.1.8	Compatibilidade das cepas bacterianas e índice de seleção de distância ao ideótipo	56
5.1.9	Extração e amplificação do DNA genômico das cepas endógenas.....	57

5.2	Avaliação <i>in vivo</i>	59
5.2.1	Desempenho zootécnico.....	59
5.2.2	Rendimento de carcaça e parâmetros sanguíneos	64
6.	CONCLUSÃO.....	69
7.	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE	90

1. INTRODUÇÃO

Produção de patos é um segmento da avicultura que fornece diversos produtos, tais como: carne, ovos, penas, fígados gordurosos dentre outros (Islam *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020; Arias-Sosa; Rojas, 2021). Esses produtos atendem a uma série de mercados consumidores, principalmente localizados na Europa e Ásia, mas ainda pouco explorado na América Latina (Rufino *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2020; Arias-Sosa; Rojas, 2021; Jalaludeen; Churchil *et al.*, 2022).

Para produzir animais de qualidade a avicultura busca constantemente maneiras eficientes, por meio de adequados ajustes nutricionais, a exploração do potencial genético das aves através da correta formulação de dietas e a utilização de aditivos, que geralmente, buscam o custo mínimo, de modo que os animais expressem seus potenciais sem comprometer o bem-estar (Bryden *et al.*, 2021; Chowdhury *et al.*, 2023).

Neste cenário, os antibióticos costumavam ser utilizados como promotores de crescimento e como estratégia para reduzir a carga de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (TGI) de aves de produção, porém, esses mesmos aditivos, matavam as bactérias benéficas, causando prejuízos à indústria avícola, além disso, o uso indiscriminado aumentou a resistência aos antibióticos em bactérias enteropatogênicas (Yaqoob *et al.*, 2022).

O uso de antibióticos nas rações de aves aumentou as preocupações de segurança relacionadas à resistência desses produtos e com o resíduo final, levando à proibição global do uso desse aditivo na produção animal (Sharma *et al.*, 2022). Com essa pressão mundial para retirar a prática do uso desses promotores de crescimento na ração de animais e, devido a fatores relacionados como as medidas legislativas, exigência de consumidores e questões éticas (Celi *et al.*, 2017), abriu-se caminho para a utilização de novos aditivos na dieta dos animais.

Houve então, a necessidade de estudos com outros aditivos naturais que favoreçam a saúde intestinal das aves, dentre eles os probióticos (Jeni *et al.*, 2021; Chowdhury *et al.*, 2023). Existe, portanto, interesse científico e comercial para o desenvolvimento de soluções alternativas que levem ao benefício da saúde animal e a promoção da segurança alimentar nos diversos sistemas avícolas (Dowarah *et al.*, 2017; Jeni *et al.*, 2021; Yaqoob *et al.*, 2022; Chowdhury *et al.*, 2023). Os probióticos tem sido estudado para aumentar a eficiência alimentar, melhorar a taxa de crescimento e inibir o desenvolvimento de microrganismos enteropatogênicos (Jeni *et al.*, 2021).

Existem várias estirpes de microrganismos que podem ser utilizadas como probióticos

devido seu alto potencial e características desejáveis, contudo, os tipos mais comuns são as bactérias ácido lácticas (BAL) e as bifidobactérias (Didari *et al.*, 2014). Na nutrição animal as cepas de uso mais comum são as do gênero *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus subtilis* e *Sacharomyces* spp. (Alagawany *et al.*, 2018; Jeni *et al.*, 2021).

As BAL ganharam atenção significativa como probióticos na indústria avícola por serem estirpes que prosperam nas adversidades gastrointestinais, conferindo os efeitos benéficos como melhoradores de desempenho e o antagonismo contra patógenos entéricos (El-Sawah *et al.*, 2020). Porém, apesar de todas as vantagens, ainda são necessários estudos mais aprofundados e conclusivos sobre os benefícios desses probióticos nos animais (Krysiak *et al.*, 2021).

A maioria dos estudos de avaliação da microbiota intestinal de aves, foram executados com frangos de corte e galinhas poedeiras e, pouco explorados com aves aquáticas, tornando-se necessários. Sabe-se que a fisiologia das aves diverge entre espécies, assim como o metabolismo de nutrientes, demanda energética e longevidade (Khan *et al.*, 2020).

Diante do exposto, objetivou-se no presente estudo, isolar e identificar cepas autóctones de BAL do TGI de patos crioulo (*Cairina moschata dosmesticus* L., 1758) e realizar testes de potencial para serem utilizadas como probióticos *in vivo* para a própria espécie, que possui valor agregado e elevado poder mercadológico. Soma-se a isso, o fato de desenvolver pesquisas com patos, que servirão de apoio a estudos relacionados a esta espécie de ave de produção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O pato doméstico

Os patos domésticos (*C. moschata*) são pertencentes a família Anatidae, que dentre os anseriformes, é composta por 69 espécies e 16 gêneros (Matthews, Gill, 2016). A figura 1 abaixo, representa o esquema de classificação taxonômica da ordem Anseriforme:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Classe: Aves

Ordem: Anseriformes

Família: Anatidae

Gênero: *Cairina*

Espécie: *C. moschata* (Linnaeus, 1758)

Subespécie: *C. moschata domesticus* (Donkin, 1989)

Figura 1 - Exemplar de fêmea de pato



Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

Biologicamente, os patos são aves de grande rusticidade, boa produtividade e características únicas (Ruiz; Labatut, 2006; Scanes; Christensen, 2020; Arias-Sosa; Rojas, 2021). São aves aquáticas que possuem dedos das patas interligados por membranas e plumagem espessa e impermeável. Apresentam ainda saliências carnudas e avermelhadas na face conhecidas como carúnculas (Scanes; Christensen, 2020; Arias-Sosa; Rojas, 2021).

Os patos domésticos são aves bem adaptadas às condições brasileiras e sua criação está em expansão. Isso ocorre em função da facilidade de manejo (Figura 2) e por seu comportamento rústico, sendo praticada a criação, principalmente em pequenas propriedades ou quintais (Júnior *et al.*, 2008).

A carne do pato possui boa qualidade e baixos teores de gordura favorecendo a apreciação pelo mercado consumidor (Yakubu, 2013). Entretanto, no Brasil o consumo de carne de patos por habitante é de 20 g/ano, enquanto na China alcança 1,5 kg/ano e na França 1,0 kg/ano (Avicultura Industrial, 2016).

Apesar de suas grandes potencialidades de mercado, a produção de patos ainda é pequena quando comparada com outros segmentos da avicultura (Rufino *et al.*, 2017; Islam *et*

al., 2020; Arias-Sosa; Rojas, 2021), apresentando pequena participação dentro da cadeia produtiva da avicultura brasileira (Rufino *et al.*, 2017). Mesmo assim, a produção de patos destaca-se como um dos segmentos que mais têm crescido na avicultura brasileira, criando demanda também crescente de informações técnicas relacionadas ao manejo (Pingel, 2011; Zeng *et al.*, 2015; Rufino *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2020).

Figura 2- Criação de patos em sistema caipira em consórcio com galinhas, em pequena propriedade da região metropolitana de Manaus



Fonte: Maquiné, L.C. (2022)

A criação de patos tem cunho de subsistência na maioria das propriedades do Brasil. Consiste basicamente em criações extensivas de baixo investimento. Em 2017 o país produziu 5,51 milhões de cabeças em aproximadamente 250 mil criatórios registrados (IBGE, 2018), com média de 15 aves por propriedade. O estado do Pará é o que possui potencial para criação em maior escala dessas aves por fazer parte da culinária local e ter forte apelo cultural e tradicional (Fernandes, 2017) e aparece na segunda colocação em quantidade de produção dessas aves, com cerca de 341,6 mil cabeças em 25,7 mil propriedades. Apesar do consumo de carne de patos por brasileiros ser baixo, o país vem aumentando seu plantel e tornando-se grande exportador da carne desses anseriformes.

No Amazonas, em censo agropecuário realizado pelo Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas - IDAM (2019) foram coletados dados de 5.918 criadores, com a produção de aproximadamente 61.207 aves produzidas e, aproximadamente, 1,45 toneladas de carnes comercializadas. O grande atrativo da produção de

patos está no fato dessas aves possuírem rendimento de carcaça aproximado de 74% (Wawro *et al.*, 2004).

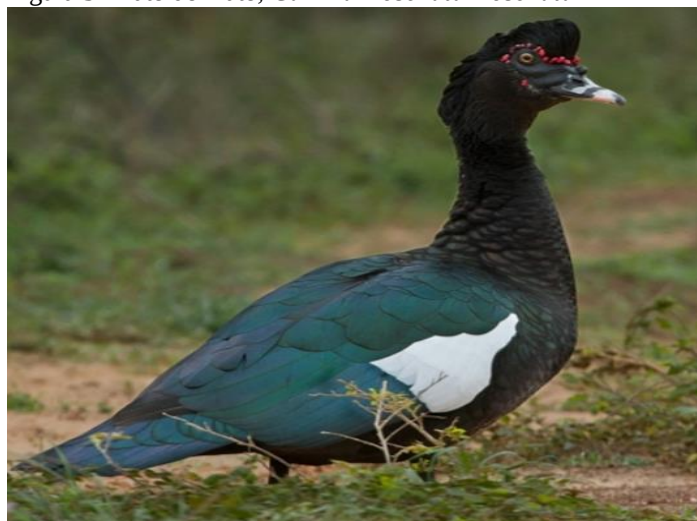
Considerada ave resistente e de fácil manejo, surge nas propriedades como alternativa de produção de carnes e ovos, penas e outros derivados (Avicultura Industrial, 2016). Quando comparados a frangos, os patos têm o crescimento mais lento, porém são efetivamente mais resistentes a doenças e condições climáticas, o que favorece sua criação nos mais diversos biomas (Rufino *et al.*, 2015).

O tempo médio necessário para atingir a idade de abate é de 90 dias. A partir desta idade o ganho de peso das aves reduz (Almeida, 2016), portanto, a permanência de patos após 90 dias nos diferentes sistemas de criação deixa de ser viável.

2.2 Características do pato doméstico

Os patos são divididos em duas subespécies (Raud; Faure, 1994): o *C. moschata moschata* é considerada a espécie selvagem (Figura 3), sendo originário de regiões neotropicais e é comum em grande parte do território brasileiro. Tem porte maior que o pato doméstico e apresenta a coloração preta com uma faixa branca na parte de cima das asas, bem visível, quando as aves estão em voo (Clements *et al.*, 2016).

Figura 3 - Pato do mato, *Cairina moschata moschata*



Fonte: birdier.com/specie/cairina-moschata (2022)

Apresenta o hábito alimentar de forrageamento, consumindo raízes, sementes, folhas e capturando pequenos invertebrados por um processo de filtragem dos seus bicos. No geral,

apresentam língua carnosa, olhos com coloração marrom a amarelado (Kear, 2005), os machos possuem o bico alargado com saliências carnudas e avermelhadas (Ruiz; Labatut, 2006). São amplamente caçados na natureza, sendo vítimas do desmatamento (Vieira, 2012).

O *C. moschata domesticus*, também denominado de “muscovy duck” é considerado a espécie doméstica, sendo originários de regiões do México, da América Central e da América do Sul. É da ordem Anseriformes e família Anatidae, onde estão também incluídos (cisnes, gansos e marrecos). São do gênero *Cairina* e da espécie *moschata* (Ruiz; Labatut, 2006).

Sendo aves aquáticas, possuem dedos dos pés interligados por membranas de forma a funcionarem como um par de remos. A plumagem é espessa e impermeável, onde as penas protegem as aves do frio e evitam que se encharquem graças à abundante secreção de substância gordurosa produzida pela glândula uropigiana que é cuidadosamente espalhada nas penas com o bico, o que também facilita a flutuação (Quinalha *et al.*, 2011).

O corpo dos patos é comprido, possuindo peito e dorso largos, com pescoço curvo e asas grandes. Também é uma característica física típica, possuírem pernas fortes, e os dedos com unhas afiadas. Para a reprodução, a cópula deve ser realizada dentro da água e as fêmeas tendem a desovar de 17 a 20 ovos, podendo chegar a 120 ovos/ano, dos quais, a própria fêmea realiza a incubação natural (Eiras, 2023).

O dimorfismo sexual é acentuado nessa espécie (Figura 4), com peso médio de 3,8 kg para machos e 2,2 kg para fêmeas (Yakubu *et al.*, 2010; Almeida, 2016). Porém, as fêmeas dessas aves apresentam maior precocidade de crescimento, atingindo peso adulto e deposição ideal de gordura na carcaça mais rápido (Drumond *et al.*, 2013; Almeida, 2016).

Figura 4 - Patos crioulo machos e fêmeas



Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

2.3 Principais linhagens de patos no Brasil

O pato sempre esteve presente como recurso genético de pequenas propriedades locais. Essa premissa se deve por ser ave resistente, menos exigente nutricionalmente e apresentando maior potencial de produção e elevado peso vivo (Yakubo, 2010).

A *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), em 2010, relatou que as raças de patos domésticos representam 11% das raças de patos registradas em todo o mundo. No Brasil, há quatro linhagens principais que compõem os plantéis, formadas a partir de processos de melhoramento genético e seleção fenotípica, que são: paysandu, gigante alemão, muscovy e crioulo (Rufino *et al.*, 2017).

Essas aves representam os exemplares que foram melhorados geneticamente em diversas propriedades e institutos de pesquisas brasileiros, principalmente na região Norte do país (Gois *et al.*, 2012).

2.4 O pato crioulo

A coloração dessa linhagem (Figura 5) varia desde totalmente branca com manchas preta na cabeça até tons de cinza, desenvolvimento médio de carúnculas vermelhas, mais proeminentes nos machos, conformação média de carcaça e acentuado dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, variando de 30 a 40% a mais nos machos em comparação ao peso final das fêmeas, ambos com abate aos 90 dias (Rufino *et al.*, 2017).

O pato crioulo é uma ave que teve melhoramento genético em várias propriedades e centros de pesquisa do Brasil. Dentre as principais características estão: produção de ovos, variando entre 75 e 120 ovos por ano; o peso adulto pode chegar a 4 kg em machos e 3 kg em fêmeas; seu corpo é longo, largo e profundo; a cauda é longa e portada horizontalmente; as asas são grandes, longas e fortes e são conhecidas quatro variedades em relação a cor (Bonilla; Díaz, 1988).

Os patos domésticos e os marrecos, geralmente, são confundidos (Costa, 2018). A principal distinção é a presença de carúnculas em torno do bico dos patos. Os marrecos são muito menores do que os patos e não têm carúnculas (Cunha; Junior, 2009).

Figura 5 - Exemplar de pato crioulo macho adulto



Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

O pato crioulo tem potencial mercadológico e deve ser explorado. Podendo ser criado para produção de carne, ovos, penas e ornamentação (Santos *et al.*, 2011). O conhecimento técnico sobre manejo e nutrição dessas aves se restringe aos centros de pesquisa de animais de produção, com isso, poucos são os produtores em sistema intensivo. Essa falta de conhecimento fragiliza a cadeia produtiva e diminui a oferta do produto no mercado, fazendo com que o pato, se torne ave com preço elevado de comercialização (Fernandes, 2017).

2.5 Aspectos importantes da fisiologia das aves

É notório que a nutrição das aves é elemento importante e que deve ser levado em consideração e prioridade, quando se busca a homeostase dos animais. A deficiência de micronutrientes é capaz de afetar os animais negativamente, produzindo danos e desordens clínica e subclínica, ou apenas problemas fracionais mais leves, porém, que podem prejudicar a saúde e sobrevida da espécie (Bhaskaram, 2001).

A concentração de elementos sanguíneos são as variáveis capazes de mostrar a capacidade do organismo animal de manter o equilíbrio dos processos metabólicos, parâmetros hematológicos e bioquímicos, que se tornam indicadores do estado de saúde das aves (Campbell, 2015).

O plasma sanguíneo corresponde a 55% do volume total do sangue, sendo composto de 91,5% de água e desempenha funções essenciais ao organismo (McDougal, 2015). As proteínas plasmáticas, sais e outros componentes, compreendem os 8,5% restante. Os leucócitos são

células suspensas no plasma, em menor quantidade, quando comparadas aos eritrócitos. Nas aves, as principais células sanguíneas são os eritrócitos, trombócitos e leucócitos (Capitelli; Crosta, 2013).

A análise da bioquímica plasmática das aves tem sido ferramenta importante para a avaliação da saúde animal e a garantia do bem-estar. Para a interpretação dos resultados dessas análises, é necessário conhecer e compreender as alterações fisiológicas nos níveis de substâncias químicas do sangue, permitindo à pesquisa, uma precisa acurácia nos dados do estado fisiológico das aves (Král; Suchý, 2000).

Da ingestão do alimento pelas aves, até a excreção, a modulação dos processos bioquímicos tende a ser organizada metabolicamente nos três principais componentes dos alimentos: carboidratos, proteínas e lipídeos (Kaneko *et al.*, 2008). Portanto, o perfil metabólico dos indivíduos pode ser determinado através da medição dos produtos obtidos por meios desses processos (Sarup *et al.*, 2012), e, para a precisão dos dados, são necessários valores de referência adequados a cada espécie avaliada (González; Scheffer, 2003).

Em relação a microbiota intestinal, a maioria dos estudos foram executados com frangos de corte e galinhas poedeiras e, pouco explorados com aves aquáticas, tornando-se necessários. Sabe-se que a fisiologia das aves diverge entre espécies, assim como o metabolismo de nutrientes, demanda energética e longevidade (Khan *et al.*, 2020).

2.6 Microbiota intestinal de aves de produção

Apesar dos estudos avançados, ainda não há mapeamento completo da microbiota das aves, levando em consideração frangos de corte e galinhas poedeiras. Entretanto o microbioma central – filo Firmicutes e Proteobacteria – em ambas as linhagens são presença comuns, variando a população devido a particularidade de cada ave (Ocejo *et al.*, 2019).

O TGI das aves é composto por bico, ingluvio, proventrículo, ventrículo/moela, intestino delgado e intestino grosso (Yadav; Jha, 2019). As populações microbianas presentes em cada região são distintas, devido às diferentes funcionalidades, morfologia e interações metabólicas (Macari *et al.*, 2014).

O inglúvio apresenta pH 4,8 com presença de BAL sem muita eficiência nesse segmento (Macari *et al.*, 2014). No proventrículo o pH fica entre 2,8 e 4,0 e nesse segmento ocorre secreções enzimáticas e ácidos presentes, tornando-o local ideal para o início da atividade microbiana (Alexandrino *et al.*, 2020). O duodeno fica na porção inicial do intestino delgado (Fraga, 2013) com grande variação do pH de 6,0 a 6,5 devido a presença de enzimas gástricas

e do quimo, além de excreção de enzimas pancreáticas e dos sais biliares, tendo baixa diversidade microbiana, mas com predominância de *Lactobacillus* (Khan *et al.*, 2020).

O jejuno é o fim do intestino delgado e possui pH mais neutro, entre 6,3 a 7,2 e abundância de células caliciformes com renovação constante da camada de muco, esse é o segmento mais propício ao desenvolvimento de microrganismos, ainda assim a predominância é de *Lactobacillus* e enterobactérias (Christofoli *et al.*, 2020). As aves possuem dois cecos que funcionam como câmara de fermentação de carboidratos estruturais e, por ser anaeróbio, é local propício ao desenvolvimento de microrganismos produtores de metabólitos essenciais (Christofoli *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020). Nos cecos o pH é em torno de 6,3 e é onde se encontra a maior diversidade microbiana do TGI, sendo o segmento alvo da maioria dos estudos de enterobactérias (Feitosa *et al.*, 2020).

2.7 Relação dos probióticos com o hospedeiro

Probióticos são conceituados como microrganismos vivos que induzem efeitos benéficos em seu hospedeiro quando estes são alimentados com a quantidade adequada (Jha *et al.*, 2020). São considerados uma das melhores alternativas devido a sua grande utilidade, melhorando a digestão e absorção de nutrientes, consequentemente, aumentando os ganhos no desempenho das espécies alvo (Coman *et al.*, 2020). Há evidências reais sobre os efeitos benéficos dos probióticos no desempenho, crescimento, qualidade da carne, na saúde óssea e na qualidade da casca de ovos, tornando produto eficaz no setor avícola (Yaqoob *et al.*, 2018).

Apresentam-se como culturas de cepas únicas ou mistas de microrganismos vivos, sendo produtores de efeitos benéficos em seu hospedeiro (Arora; Baldi, 2015). Algumas características para que um microrganismo seja bom probiótico são: não possuir patogenicidade nem toxicidade, influenciar positivamente o animal hospedeiro, sobreviver no ambiente do TGI e deve ser viável e assim permanecer, sob condições de armazenamento (Angelakis, 2017).

Os microrganismos estabelecem uma relação de simbiose com a mucosa intestinal de seus hospedeiros e, juntos, coexistem no TGI (Okumura; Takeda, 2018). A constituição e proporção desta comunidade microbiana variam de acordo com as particularidades fisiológicas das diversas regiões do TGI e podem ser influenciadas por diversos fatores externos e internos (McFarland, 2021; Popov *et al.*, 2021). Assim, os microrganismos desempenham papéis fundamentais na quebra e absorção de substâncias nutritivas, na manutenção da estabilidade celular como uma defesa protetora, com efeitos antioxidantes, antimicrobianos e imunológicos. Além disso, produzem enzimas, vitaminas e outros nutrientes que frequentemente são limitados

nas dietas (Jha *et al.*, 2020; Skonieczna-Żydecka *et al.*, 2020).

A competição por nutrientes representa outra forma de interação conhecida como antagonismo ou alimentação cruzada, promovendo a estabilidade da microbiota devido à diversidade de microrganismos (Sanders *et al.*, 2019; McFarland, 2021). Contudo, essa competição por nutrientes se dá entre as próprias bactérias intestinais por nutrientes específicos e não entre o hospedeiro e a bactéria (Skonieczna-Żydecka *et al.*, 2020). Em situações de ausência de nutrientes no lúmen intestinal, as bactérias indesejáveis podem ser suprimidas, favorecendo a nutrição das bactérias probióticas intestinais em detrimento das enteropatogênicas (Dowarah *et al.*, 2017; Sanders *et al.*, 2019; Krysiak *et al.*, 2021).

Estudos recomendam o isolamento e identificação de cepas autóctones como candidatas a probióticos, uma vez que já fazem parte da microbiota nativa, o que pode potencializar sua eficácia (Jha *et al.*, 2020; Popov *et al.*, 2021; Yaqoob *et al.*, 2022; Chowdhury *et al.*, 2023). Além disso, é indicado o uso de consórcios de cepas, manipulações genéticas e a garantia de que estas proporcionem exclusão competitiva no TGI e interações benéficas com os microrganismos residentes, com essas ações fundamentando a escolha da cepa ideal (Gámez; Argoti, 2017; Skonieczna-Żydecka *et al.*, 2020).

Neste contexto, há o apontamento que para o sucesso de uma cepa microbiana como probiótico, é essencial realizar testes *in vitro* (Sosa-Cossio *et al.*, 2020) e subsequentemente *in vivo* (Bernardeau *et al.*, 2017), utilizando animais saudáveis e desafiados em diferentes condições de estresse. Isso permite avaliar se os microrganismos benéficos conseguem colonizar o TGI e influenciar nos indicadores zootécnicos. Diante de resultados confiáveis, torna-se possível compreender a eficácia e o papel desses produtos naturais (Giang *et al.*, 2012; Dowarah *et al.*, 2017).

Os probióticos têm a capacidade de aumentar a altura das vilosidades e a profundidade das criptas, contribuindo positivamente para a melhoria da eficiência produtiva e a capacidade de absorção de nutrientes, o que reduz as necessidades metabólicas (Rodjan *et al.*, 2018). Aves em manejo intensivo geralmente não possuem o TGI completamente colonizado (Kogut, 2019), ao contrário das aves de criação alternativa, especialmente as aves no sistema caipira, cuja colonização ocorre através do oviduto das mães e poros das cascas dos ovos (Roto *et al.*, 2016) e em contato com o meio ambiente (Kers *et al.*, 2018). Os microrganismos presentes no TGI das aves são predominantemente bactérias Gram-positivas, majoritariamente anaeróbios facultativos (Yadav; Jha, 2019), e estão presentes em quantidades que variam de 10^7 a 10^{11} bactérias por grama de conteúdo intestinal (Apajalahti *et al.*, 2004).

Existem vários métodos de administração de probiótico no setor avícola, o mais comum é adicioná-lo na ração, porém há outras metodologias como: gavagem, *sprays*, grânulos, comprimidos, cápsulas ou em pó (Jiang *et al.*, 2017; Billy *et al.*, 2018). Também podem ser fornecidos na água das aves e ou administrados ao embrião em desenvolvimento, usando a tecnologia de alimentação *in ovo* (Pender *et al.*, 2017; Jha *et al.*, 2020).

Dentre os principais benefícios da utilização de probióticos com cepas de BAL nas dietas dos animais, estão a redução do pH intestinal com a ocorrência de maior absorção de ácidos graxos de cadeia curta, promovendo a digestão de algumas fibras em aves e atuando como enzimas. Alguns *Lactobacillus* também são capazes de secretar essas enzimas (amilase, protease e lipase), neutralizando as enterotoxinas e evitando que os microrganismos patogênicos se liguem à superfície da mucosa intestinal (Freitas Neto *et al.*, 2010).

2.8 Mecanismos de ação dos probióticos

Os benefícios do uso de probióticos se manifestam por meio de suas ações no organismo do animal hospedeiro e variam de acordo com a cepa utilizada. Os avanços nos estudos moleculares e genéticos têm contribuído para a compreensão desses efeitos ao elucidar os mecanismos de ação. Dada a complexidade da microbiota das aves, é plausível que os probióticos atuem por meio de múltiplos mecanismos, em vez de apenas um (Yaqoob *et al.*, 2022). Quando incorporados à dieta das aves, esses probióticos integram a microbiota intestinal, promovendo o aumento da deposição de gordura intramuscular, potencializando a capacidade oxidante do organismo e modulando hormônios endócrinos (Shehata *et al.*, 2022).

A relação entre os microrganismos intestinais probióticos e a imunomodulação ainda não está completamente esclarecida (Hemarajata; Versalovic, 2013). Os probióticos têm a capacidade de ativar os macrófagos, aumentando os níveis de anticorpos no TGI e induzindo a regulação do interferon e das células naturais *killers* (Dowarah *et al.*, 2017). A saúde e o desempenho dos animais estão intrinsecamente ligados ao intestino e à sua microbiota. Quando saudáveis, atuam na defesa contra microrganismos patogênicos e são mais eficientes na absorção de nutrientes (Yaqoob *et al.*, 2022). Os probióticos são frequentemente utilizados para regular a microbiota intestinal (Khaliq *et al.*, 2020).

O mecanismo de exclusão competitiva é a ocupação física dos sítios de adesão no epitélio intestinal, evitando assim a formação de colônias de bactérias patogênicas (Didari *et al.*, 2014; Skonieczna-Żydecka *et al.*, 2020; Krysiak *et al.*, 2021; Popov *et al.*, 2021). Este processo ocorre especificamente nas vilosidades intestinais e nas criptas, e consequentemente,

promove a síntese e excreção de mucinas pelas células caliciformes, inibindo a aderência de enterobactérias patogênicas (Chichlowski *et al.*, 2007; Jeni *et al.*, 2021; Chowdhury *et al.*, 2023). A competição por nutrientes ocorre devido a presença das bactérias probióticas no intestino, que utilizam os nutrientes dietéticos presentes no lúmen, principalmente aqueles degradados por enzimas digestivas normais dos animais ou adicionados à ração (Sakomura; Rostagno, 2016). Isso reduz a disponibilidade desses nutrientes para as bactérias patogênicas (Bajaj *et al.*, 2015).

Parâmetros histomorfológicos são positivamente influenciados pela ação dos probióticos, mas sua eficácia pode variar de acordo com a cepa ingerida. O comprimento das vilosidades e a profundidade das criptas, com maiores alturas das vilosidades, estão diretamente relacionados a maior capacidade de absorção de nutrientes (Didari *et al.*, 2014; Arora; Baldi, 2015; Dowarah *et al.*, 2017). Além disso, a concentração de células caliciformes nas vilosidades reduz significativamente as chances de aderência de bactérias patogênicas (Shroyer; Kocoshis, 2011; Skonieczna-Żydecka *et al.*, 2020). Em geral, os probióticos apresentam quatro mecanismos básicos de ação: interação direta com o microbioma intestinal, fortalecimento da barreira do epitélio intestinal, modulação do sistema imunológico e produção de neurotransmissores (Sanders *et al.*, 2019; Jha *et al.*, 2020; Jeni *et al.*, 2021).

Os probióticos possuem mecanismos de ação distintos, que conferem variável eficácia protetora. Nesse contexto, a maioria dos produtos comerciais utilizam mix de cepas probióticas para que possam alcançar diferentes lugares e agir de diferentes modos, criando efeito sinérgico benéfico ao animal (Ribeiro *et al.*, 2021).

A inibição de patógenos pela produção de substâncias antibacterianas, a inibição competitiva pelo bloqueio de adesão de bactérias patogênicas aos locais de adesão, a modulação das respostas imune do hospedeiro e a regeneração da mucosa intestinal estão entre os principais mecanismos de ação dos probióticos (Alagawany *et al.*, 2018).

Atuam também estimulando a produção de anticorpos, aumentando a atividade dos macrófagos e células de *killer*, estimulando a função da barreira e produção de muco, motilidade intestinal, bem como baixar o pH para facilitar a absorção de proteínas e minerais (Raghuwanshi *et al.*, 2015).

Quando os probióticos são fornecidos às aves rotineiramente, eles podem proporcionar uma correlação positiva com relação a eficiência dos alimentos, proporcionando melhorias nos índices econômicos de produção, aproveitamento de nutrientes e redução da colonização intestinal por microrganismos indesejáveis (Aguihe *et al.*, 2017).

Já se sabe que os probióticos promovem ação antibacteriana no TGI das aves. As bacteriocinas são responsáveis por tal fato, favorecendo o processo de exclusão competitiva e os ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio apresentam capacidade de alterar o pH do meio, não permitindo o estabelecimento de cepas nocivas no intestino (Choudhari *et al.*, 2009).

Dessa forma as cepas probióticas modulam as respostas imune sistêmicas, aumentando a quantidade de células fagocíticas no hospedeiro, com isso o TGI consegue fazer a captação de antígenos que estimulam as células B (precursoras de IgA) e as células T (colaboradoras das placas de Peyer), melhorando a imunidade geral e específica das aves (Eckert *et al.*, 2010).

2.9 Seleção de microrganismos probióticos ideais

Os microrganismos ácido lácticos, que incluem variedades dos tipos *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Weissella*, são frequentemente utilizados como bactérias probióticas na criação de aves (Hernandez-Patlan *et al.*, 2020). A escolha dos probióticos é um processo complexo e deve sempre levar em consideração cepas provenientes da mesma espécie hospedeira, visto que estas possuem maior capacidade de sobrevivência e colonização no sistema gastrointestinal, resultando em benefícios significativos para o hospedeiro.

A identificação e seleção de microrganismos com potencial probiótico é realizada em estudos *in vitro*. As bactérias podem ser coletadas da traqueia, das porções do intestino, cólon, cecos da espécie hospedeira, geralmente o ambiente intestinal natural é a fonte mais adequada, para que se promova um sistema saudável ao desenvolvimento dessas cepas e que estas tenham a maior chance de sobrevivência e reprodução (Nguyen *et al.*, 2015).

As bactérias devem ser adaptáveis ao seu ambiente, seja rico ou pobre em nutrientes e o pH irá afetar o desenvolvimento destas e deve ser um fator que terá grande importância na triagem das cepas nas análises *in vitro* (Fontana *et al.*, 2013). Durante os testes as bactérias devem ser incubadas em meios com pH variando de 2,0 a 4,0 para determinação de sua susceptibilidade à bile, com incubação de até três horas, o mesmo procedimento deve ser aplicado para testes de tolerância a pH baixo 1,0 a 3,0. Os sais biliares auxiliam na digestão e tem efeito no equilíbrio da microbiota intestinal (Tolouei *et al.*, 2017).

Além de resistir aos aspectos acima, as cepas devem desencadear o deslocamento de patógenos, através da exclusão competitiva (Jha *et al.*, 2020), inibir o crescimento de cepas patogênicas produzindo substâncias antimicrobianas e modular o sistema imunológico (Harimurti; Hadisaputro, 2015).

Para aumentar a colonização é sugerido fornecer quantidade apropriada de probióticos assegurando concentração celular mínima viável de 1×10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de suplemento (Ramlucken *et al.*, 2021). Para obter maior eficácia e maior presença de bactérias benéficas, os níveis de suplementação podem ser elevados para uma faixa de 1×10^8 a 1×10^9 UFC/g (Patterson; Burkholder, 2003). Diversos estudos apontam que a administração de probióticos pela água potável é mais eficiente do que adicioná-los na alimentação (Eckert *et al.*, 2010; Blajman *et al.*, 2014). Essa eficácia pode ser atribuída à passagem acelerada de probióticos pelo trato digestivo superior quando administrados pela água, reduzindo a exposição a níveis de pH ácido e sais biliares (Karimi Torshizi *et al.*, 2010).

2.10 Respostas do uso de probióticos sobre o desempenho produtivo e rendimento de carcaça de aves de produção

Com o intuito de potencializar o consumo de ração das aves e a retenção de nutrientes das dietas, são fornecidos os probióticos como aditivos (Ghareeb *et al.*, 2012), dos quais boa parcela já provou ser benéfica, promovendo impactos positivos na morfologia do TGI das aves, nas populações de microrganismos, na absorção de nutrientes a nível luminal, na função de barreira e nas respostas imunológicas desses animais de produção (He *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). O principal objetivo do fornecimento de probióticos para aves é melhorar o desempenho produtivo, principalmente em índices como consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar, produção de ovos, massa de ovo, além do estado de saúde geral das aves, preservando seu bem-estar, o que reduz as taxas de mortalidade e o estresse dietético em situações de mudanças de dieta (Yazhini *et al.*, 2018; Vase-Khavari *et al.*, 2019).

Há dados consolidados sobre o uso de probióticos em aves de corte e postura, afetando positivamente principalmente os seguintes parâmetros: bioquímica plasmática do sangue, composição hematológica, estimulação de órgãos hematopoiéticos, dinâmica do peso vivo, composição quantitativa e qualitativa da microbiota, nível de estresse oxidativo, qualidade do esperma e funções de barreira intestinal (Jha *et al.*, 2020; Jeni *et al.*, 2021; Popov *et al.*, 2021; Yaqoob; Wang; Wang, 2022). Ampla gama de estudos já foi realizada com probióticos na dieta de aves de produção para avaliar os impactos desses aditivos sobre o crescimento e a saúde desses animais, especialmente em condições de estresse (Bahule; Silva, 2021; Jeni *et al.*, 2021; Krysiak *et al.*, 2021; Popov *et al.*, 2021; Yaqoob *et al.*, 2022; Chowdhury *et al.*, 2023).

Atualmente, não existe padrão estabelecido para ensaios com probióticos em aves, especialmente em relação à definição dos parâmetros de desempenho zootécnico. A maioria

dos experimentos *in vivo* ocorre em randomização às cegas e controle, e os dados são analisados com testes estatísticos apropriados para cada estudo (Popov, 2021; Yaqoob *et al.*, 2022). Existem diferentes formas de aplicação de probióticos em aves, e essas vias podem influenciar na eficácia desses aditivos, dependendo se serão utilizadas uma ou várias cepas em consórcio (Jeni *et al.*, 2021; Krysiak *et al.*, 2021; Yaqoob *et al.*, 2022; Chowdhury *et al.*, 2023).

Cada microrganismo oferece vantagens metabólicas distintas, razão pela qual muitos produtos utilizam múltiplas cepas em suas formulações, compostas por mais de uma cepa bacteriana com diferentes modos de ação, promovendo sinergia e proporcionando ampla cobertura (Jha *et al.*, 2020). No entanto, a escolha da cepa adequada pode resultar no impacto mais significativo, e não apenas no número de cepas específicas utilizadas em cada ensaio (McFarland, 2021). A suplementação de frangos de corte com probióticos, especificamente BAL, contribui significativamente para a redução dos níveis de colesterol na carne das aves, conforme demonstrado por Majeed *et al.* (2019) em pesquisas que testaram a eficácia de *B. coagulans*, obtendo resultados positivos para a redução do colesterol e do malondialdeído na carne das aves alvo.

O uso de probióticos na avicultura tem se mostrado como a metodologia mais eficaz de controle microbiano e com baixos prejuízos ao meio ambiente (Hejdysz *et al.*, 2012). O prospecto na produção avícola é positivo tendo muitas vantagens e poucas desvantagens.

Os probióticos podem realmente influenciar na melhoria da carne e de ovos das aves, o que é benéfico, levando em consideração que a demanda de carne e ovos continua em crescimento. Os consumidores esperam que a avicultura ofereça produtos com segurança, sendo esses aditivos excelentes alternativas para aumentar a qualidade dos produtos e melhorar a produtividade dos animais (Hussein *et al.*, 2020).

É muito importante na avaliação da eficácia de um probiótico, analisar o intestino das aves. Estudos demonstram que os probióticos melhoram a qualidade do intestino, aumentando as criptas, o comprimento, densidade das vilosidades intestinais. Estes são efeitos desejáveis, pois favorecem a absorção de nutrientes permitindo a colonização adequada por bactérias, além de aumento da massa dos cecos (Cean *et al.*, 2015).

Probióticos também afetam positivamente a carcaça de frangos de corte, aumentando o peso geral com redução da gordura abdominal e esse fator foi observado em ambos os sexos, isso representa aspecto econômico importante. A presença do probiótico como aditivo no alimento ou água das aves resultaram não só em maior absorção de nutrientes, como aminoácidos necessários para a formação dos tecidos melhorando também o conteúdo de proteína da carne da coxa e do peito (Hidayat *et al.*, 2016).

Pode existir correlação direta com o uso de probióticos *in vitro* e *in vivo*. Em estudos realizados por Popova (2017) os aditivos probióticos foram testados em modelos *in vitro* mostrando redução do número de patógenos, os mesmos aditivos foram testados *in vivo* e os resultados também foram satisfatórios. Os probióticos reduzem a quantidade de nitrogênio e fósforo excretada pelos animais favorecem a melhora da absorção de nutrientes, além disso esses microrganismos também são responsáveis pela indução da degradação de proteínas em nitrogênio, diminuindo a quantidade nas fezes, atuando como minimizador de danos ao meio ambiente (Xiang *et al.*, 2019).

Os galináceos, assim como outras aves, possuem comunidade diversificada de microrganismos em seu TGI. Os modos de ação dessa comunidade, que juntos formam a microbiota intestinal, são complexos e ainda não completamente compreendidos (He *et al.*, 2019; Akinyemi *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2024). Este complexo de microrganismos entéricos é composto por agentes que desempenham função crucial na manutenção da saúde intestinal das aves através de mecanismos de modulação e funções fisiológicas que promovem a homeostase no TGI (Hemarajata; Versalovic, 2013; Carrasco *et al.*, 2019; Jeni *et al.*, 2021; Mcfarland, 2021).

Os probióticos podem ser fornecidos às aves de várias formas, seja por meio da ração ou da água, utilizando técnicas de inoculação que promovem positivamente a saúde do hospedeiro ao melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal natural (Chichlowski *et al.*, 2007; Didari *et al.*, 2014; Krysiak *et al.*, 2021). Naturalmente, o desenvolvimento da microbiota intestinal em pintos começa no incubatório, antes mesmo da ingestão de qualquer tipo de alimento (Abdel-Moneim *et al.*, 2020). Aves alimentadas com probióticos apresentam melhoria na qualidade de sua carne ou de seus ovos, pois ao incorporarem esses microrganismos, conseguem inibir patógenos e proporcionar benefícios à saúde do consumidor final (Jeni *et al.*, 2021; Krysiak *et al.*, 2021; Yaqoob *et al.*, 2022; Chowdhury *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2024).

Desta forma, é reconhecido que a principal finalidade da inclusão de probióticos nas rações dos galináceos é otimizar e potencializar seu desempenho, enquanto simultaneamente reduzem o risco de contaminação e infecção por patógenos (Du *et al.*, 2019). Vários pesquisadores indicam que o uso dessas cepas como aditivos dietéticos possui grande potencial para aprimorar a qualidade das aves (Jeni *et al.*, 2021; Popov *et al.*, 2021; Biswas *et al.*, 2023; Chowdhury *et al.*, 2023).

Estudo conduzido com duas espécies de *Bifidobacterium* inoculadas *in ovo* por El-Monein *et al.* (2020), diretamente no saco vitelínico no 17º dia de incubação, demonstraram que as aves nascidas apresentavam peso superior em comparação com ovos não inoculados,

com os autores relatando melhoria no ganho de peso corporal, na taxa de conversão alimentar, nos parâmetros hematológicos e na altura das vilosidades das aves em desempenho posterior dos frangos.

Já em estudo conduzido por Rigobelo, Maluta e Ávila (2011) avaliando o uso de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum* como probióticos em estratégia para substituir promotores de crescimento em dietas de frangos de corte, verificaram que o grupo que recebeu os probióticos apresentou menor consumo de ração e melhor conversão alimentar, concluindo que os probióticos utilizados na pesquisa podem ser opção estratégica para substituir os promotores de crescimento em aves de corte.

Yu *et al.* (2019) relataram também que as *Enterococcus faecium*, que são BAL Gram-positivas, podem ser utilizadas como probióticos para melhorar o desempenho produtivo de frangos, afirmando que essas bactérias são responsáveis pela secreção de ácidos orgânicos e outros metabólitos no TGI.

Os efeitos benéficos da presença de *E. faecium* no organismo das aves podem estar relacionados à sua ação sobre a integridade e o sistema imunológico intestinal, especificamente a imunidade humoral, com esta bactéria tendo potencial de melhorar o desempenho produtivo, e potencializando a sua resposta imune das aves imune e formando barreira contra microrganismos patogênicos (Jahromi *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018). Outros estudos indicaram ainda que aves suplementadas com *E. faecium* apresentaram melhoria na qualidade da carne do músculo das coxas, aumento do teor de lisina monofosfato nos músculos do peito e coxa, e aumento da capacidade oxidante no músculo de frangos de corte (Yu *et al.*, 2019; Jeni *et al.*, 2021; Krysiak *et al.*, 2021; Yaqoob *et al.*, 2022; Chowdhury *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2024).

O uso de *B. subtilis* na dieta de frangos de corte afetou positivamente o ganho de peso das aves aos 21 dias de vida e a composição da microbiota intestinal apresentou redução de bactérias indesejáveis nos seus TGI (Hernandez-Patlan *et al.*, 2019). Observou-se ainda que três doses do probiótico Floramax - à base de *Lactobacillus* frente ao desafio de *Escherichia Coli* Patogênica Aviária (APEC) em frangos de corte, evitou perdas produtivas induzidas por APEC, além do probiótico testado proporcionar melhores resultados no desempenho produtivo dos frangos de corte (Matté *et al.*, 2023).

2.11 Integridade intestinal e parâmetros sanguíneos em aves de produção

Para haver bom desempenho produtivo é necessária boa saúde intestinal de modo, que sejam fornecidas dietas de boa qualidade e ambiente adequado à criação (Oliveira *et al.*, 2017). Nos últimos anos, inúmeros estudos foram realizados visando a identificação e composição da microbiota intestinal de aves de produção e as alterações causadas pelas práticas de manejo em que as aves são criadas (Lunedo; Pedroso, 2017).

A maior parte dos microrganismos das aves residem no intestino com densidades aproximadas de 10^{11} a 10^{12} células/g sendo considerada a mais alta concentração registrada para qualquer habitat microbiano (Shang *et al.*, 2018), sendo mais abundantes e evidentes nos cecos (Yeoman *et al.*, 2012).

Aves com microbiota não estabelecida apresentam menor comprimento de vilos e profundidade de criptas intestinais o que pode estar diretamente relacionado com a absorção e aproveitamento de nutrientes e na atividade da saúde da mucosa intestinal (Yu, 2013). Dessa forma, a colonização inicial do intestino das aves por bactérias que promovam o equilíbrio da microbiota aumenta as chances de proteção quando estas ficam expostas a situações de desafio (Silva, 2016).

Considerando que os parâmetros bioquímicos são importantes indicadores da saúde animal e do estado fisiológico em que as aves se encontram, quanto ao funcionamento dos órgãos, adaptação do animal diante de desafios e patologias (Faria *et al.*, 2021); a constituição do sangue tem relação direta com a nutrição das aves e influenciam na composição do plasma, tendo correlação no desempenho zootécnico das aves (Junior *et al.*, 2010). Os parâmetros sanguíneos refletem a situação metabólica da ave, adaptação do animal a novos ambientes, desequilíbrio metabólico ou de origem nutricional, entretanto, são necessários valores de referência para cada espécie (González; Scheffer, 2003), sendo imprescindível o estabelecimento desses parâmetros e valores de referências para patos crioulo.

Resultados de pesquisas com frango de corte realizados por Aguihe *et al.* (2017) mostraram efeito positivo com o uso de *Lactobacillus* e de *Saccharomyces* sobre a concentração de hemoglobina corpuscular média e volume corpuscular médio. Assim, o uso de probióticos é indicado para melhorar a imunidade das aves, aumentando a produção de anticorpos e estimulando a imunidade inata (Ohimain; Ofongo, 2012).

As proteínas são responsáveis por manter o volume sanguíneo por meio da osmose coloidal, tem participação na manutenção do pH do sangue, transporte de substâncias como

lipídeos e hormônios, catalisação de reações químicas e produção de anticorpos para defesa do organismo (Melillo, 2013).

2.12 Efeitos benéficos dos probióticos em aves aquáticas

Os sistemas de criação de aves, de corte principalmente, evoluíram para maior produção de carne por área e em menor tempo (Névoa *et al.*, 2012). Aves aquáticas, como os patos, são comercializadas em todo o mundo. A produção global dessas aves está em constante crescimento, aumentando de 2,9 milhões de toneladas em 2000 para cerca de 4,4 milhões de toneladas em 2013, crescimento de 3,2% ao ano (Evans, 2015). No Brasil a produção foi de 4.725 toneladas em 2023, sendo Santa Catarina o maior produtor e exportador com 99,60% do total produzido no país (ABPA, 2024).

Para produzir animais de qualidade a avicultura busca constantemente maneiras eficientes, por meio de adequados ajustes nutricionais, a exploração do potencial genético das aves através da correta formulação de dietas e a utilização de aditivos (Bryden *et al.*, 2021; Chowdhury *et al.*, 2023). Os estudos acerca dos impactos potenciais dos probióticos sobre o desempenho produtivo de aves aquáticas ainda são escassos na literatura, apresentando poucas informações frente à riqueza encontrada para outros gêneros de aves domésticas, especialmente os galináceos. Porém, os resultados já encontrados até aqui representam importante avanço para esse segmento da avicultura.

Uma dieta com 14% de Proteína Bruta (PB) com adição de probiótico foi aplicada em marrecos de pequim e melhorou o desempenho dessas aves, influenciando positivamente a contagem de células calciformes e profundidade de cripta, com aumento do percentual de rendimento de carcaça (Ahmed, 2021). A substituição do antibiótico amoxilina por probióticos à base de *Lactobacillus* sp. e *Saccharomyces* sp., possibilitou que a produção de ovos em marrecos de pequim melhorasse no grupo que recebeu probióticos, além de outros efeitos benéficos sobre o desempenho produtivo, desse modo, os probióticos podem substituir os antibióticos em rações para marrecos (Suswoyo *et al.*, 2021).

A avaliação do efeito dos probióticos à base de *B. subtilis* e *B. licheniformis* $6,0 \times 10^8$ UFC/g na composição da microbiota intestinal e no metaboloma de marrecos Shaoxing, com dieta basal de 0,15% de probióticos nas rações durante 85 dias demonstrou que a suplementação com probióticos melhorou a saúde cecal das aves através de alterações na microbiota e no metaboloma (Sun *et al.*, 2021).

A investigação do efeito da alimentação com uma preparação probiótica comercial (Proact) constituída de *B. subtilis* $1,75 \times 10^{12}$ UFC/g e *B. licheniformis* $1,75 \times 10^{12}$ UFC/g como suplemento sobre o desempenho produtivo, rendimentos de carcaça, parâmetros sanguíneos e morfologia intestinal de patos, com os tratamentos consistindo de sete níveis (0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50 e 1,75 g/kg de dieta) de suplementação de probióticos na ração das aves por um período de 70 dias de criação, resultou que a suplementação com 0,75 g/kg de dieta aumentou significativamente a glicose sérica e as enzimas hepáticas e diminuiu a creatina, o colesterol e os triglicerídeos sanguíneos dos patos. Além disso, a suplementação com esse nível de probiótico teve influência sobre as vilosidades, largura das vilosidades e a relação altura das vilosidades, além de melhorar o desempenho produtivo e os rendimentos de carcaça (Abou-Elnaga *et al.*, 2018).

O potencial probiótico de *L. casei*, *L. lactis* e *Bifidobacterium* spp., associados a extrato de *Moringa oleifera* na dieta de patos indonésios, obtiveram resultados positivos sobre o ganho de peso na concentração de $1,2 \times 10^9$ de probióticos (Lokapirnasari *et al.*, 2022). Além disso, um consórcio de BAL compostas por *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *S. thermophilus*, *E. faecium*, *Aspergillus oryzae* e *Candida pintolopesii* (Pourakbari *et al.*, 2016) e Yosi *et al.* (2020) também obtiveram maior peso vivo de marrecos Pegagan, afetados positivamente pelos tratamentos que receberam BAL como probióticos, de acordo com o nível de concentração, ocorrendo efeito notável quando estas aves receberam 10^7 UFC/mL.

Tratando de diferentes formas de fornecer esses probióticos para as aves aquáticas, Ardiansah *et al.* (2020) realizando pesquisa com marrecos para avaliar o efeito da suplementação dietética de probiótico *L. fermentum*, *L. acidophilus* e *Bacillus* spp. em pó ou encapsulado sobre a carcaça relativa, o peso das vísceras e a morfometria intestinal dessas aves, relataram melhor desempenho produtivo nas aves que receberam o probiótico encapsulado em relação àquelas tratadas com o probiótico em pó. Além disso, os mesmos autores evidenciaram resultados semelhantes para carcaça relativa, peso das vísceras e morfometria intestinal usando níveis de 0,2 e 0,4% de probiótico encapsulado.

Xie *et al.* (2015) estudando o mapeamento de estirpes bacterianas intestinais dos próprios patos que pudessem apresentar potenciais probióticos sobre a alteração da expressão gênica do fator de adesão, descreveram que a microbiota intestinal natural dessas aves é uma excelente fonte de bactérias que podem ser selecionadas como cepas probióticas a serem utilizadas tanto na produção de aves aquáticas como também para outras espécies de aves domésticas).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar e identificar bactérias ácido lácticas autóctones do trato gastrointestinal de patos crioulo e avaliar o potencial probiótico *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

Realizar a identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas do trato gastrointestinal de patos crioulo;

Avaliar o potencial probiótico, a partir da realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos, teste de tolerância a sais biliares e determinação da capacidade antagonista contra *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*;

Avaliar o desempenho zootécnico e os parâmetros sanguíneos de patos crioulo inoculados via gavagem com bactérias ácido lácticas isoladas e identificadas, do trato gastrointestinal da espécie alvo;

Avaliar o rendimento de carcaça de patos crioulo inoculados via gavagem com bactérias ácido lácticas isoladas e identificadas, do trato gastrointestinal da espécie alvo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação do potencial probiótico *in vitro*

4.1.1 Obtenção das amostras, isolamento e preservação

A avaliação do potencial *in vitro* foi realizada no Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAM (Certificado nº 003/2021 e atualizado pela mesma Comissão em 02/10/2023).

As amostras foram coletadas do TGI (duodeno, jejuno, íleo e cecos) de 12 patos domésticos adultos saudáveis, provenientes de criadores locais da cidade de Manaus - AM. As aves foram abatidas por técnicas apropriadas para a espécie (BRASIL/MCTI, 2013), em conformidade com a Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os segmentos, identificados e coletados, abertos com bisturi esterilizado, procedendo-se as coletas de ± 1 g do conteúdo com o auxílio de espátula esterilizada acessando o epitélio dos segmentos, e adicionados em tampão salina fosfato (PBS, pH 7,2) e diluições seriadas até 10^{-5} . Das diluições 10^{-4} e 10^{-5} foram retirados 100 μ L e realizados plaqueamentos em placas de Petri com ágar MRS (Man-Rogosa-Sharpe) (Merck, Alemanha) incubadas a 37 °C por 24 h até o surgimento das unidades formadoras de colônias - UFC (Karimi Torshizi *et al.*, 2008).

Um total de 300 isolados individuais foram selecionados e repicados para placas de Petri com ágar MRS, incubados a 37 °C por 24 h. Apenas as bactérias Gram-positivas e catalase negativas, foram subcultivadas para obtenção de isolados puros. As bactérias isoladas foram inoculadas em tubos plásticos esterilizados contendo 5 mL de caldo MRS, mantidos em incubadora de agitação orbital a 150 rpm (Garcia *et al.*, 2015) por 24 h a 37 °C, em seguida criopreservadas em duplicata, em glicerol 20% a -20 °C.

4.1.2 Caracterização morfofisiológica

A coloração de Gram e o teste de catalase, foram utilizados como triagem inicial para BAL (Hwanhlem *et al.*, 2014), tais como os testes citados, outros critérios foram realizados para a determinação de propriedades probióticas das cepas isoladas, como a resistência a baixo pH, tolerância a diferentes concentrações de sais biliares, diferentes concentrações de NaCl e atividade antimicrobiana, além de análise de otimização da temperatura de incubação das cepas,

para testar a capacidade dos isolados de crescer em temperaturas de até 45 °C (Bokhari *et al.*, 2017).

Após a técnica utilizada para coloração de Gram (Tortora *et al.*, 2012), procedeu-se o teste de catalase (Otero; Ocaña; Nader-Macías, 2004), das quais as consideradas positivas foram descartadas e as negativas seguiram no estudo com os testes propostos (Quinn *et al.*, 2005).

4.1.3 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl

O efeito do NaCl na pressão osmótica foi avaliado de acordo com Kobierecka *et al.* (2017). Os isolados foram cultivados em caldo MRS a 37 °C durante a noite e após completarem 24 h de incubação, foram subcultivados (1% v/v) em tubos de ensaio com 2 mL de caldo MRS fresco, ajustado nas diferentes concentrações de NaCl (2, 4 e 6,5%) e, inoculados com 1% (v/v) das cepas para observação após 24 h de incubação a 37 °C, por inspeção visual da turbidez, sendo o resultado: crescimento (+) ou nenhum crescimento (-) em relação ao controle (sem NaCl).

4.1.4 Tolerância a condições de pH ácido

A capacidade das BAL de sobreviver em pH baixo variando de 1 a 3 por até três horas, é um pré-requisito crucial para sua atividade como probiótico (Shokryazdan *et al.*, 2014). A metodologia proposta por Yu *et al.* (2013) e Bokhari *et al.* (2017) foram utilizadas, com ajustes. Os isolados foram reativados em caldo MRS a 37 °C (Garcia *et al.*, 2015) e permaneceram em incubadora orbital *shacker* durante a noite a 150 rpm, posteriormente foram subcultivados (1% v/v) em caldo MRS fresco ajustados com HCl (3,0 M) para pH 2,0, 3,0 e 6,5 (controle) e incubados por três horas a 37 °C em triplicata, em estufa bacteriológica. Amostras de 200 µL de cada cultura, foram analisadas antes e depois da incubação em leitor de microplacas (CHAMALEON PLATE) à densidade óptica (OD) definida na absorbância de $\lambda = 595$ nm (Vieira *et al.*, 2013). A taxa de sobrevivência (%) e tolerância de cada cepa bacteriana aos diferentes pHs foi determinada com a redução do percentual de absorbância em relação ao meio de cultivo com pH 6,5 e o aumento da biomassa calculado como: $[(OD \text{ final} - \text{inicial OD}) / OD \text{ inicial}] \times 100\%$.

4.1.5 Teste de tolerância a sais biliares

Para a realização do teste de tolerância aos sais biliares foi seguida a metodologia descrita por Bokhari *et al.* (2017) e Todorov *et al.* (2012), modificada por Rajoka *et al.* (2018) e realizada com base na concentração intestinal de bile de 0,3% no trato intestinal de aves de produção (Bokhari *et al.*, 2017) e pelo tempo de permanência do alimento no intestino delgado de aves de produção, que é de três horas, sendo esse o principal critério de seleção de cepas. Ao passo em que ocorreu o isolamento, a bile também foi coletada dos patos com o auxílio de seringa esterilizada (variando de 0,3 a 0,5 mL de cada ave) da vesícula biliar e acondicionada em placa de Petri para secagem em estufa e armazenagem em tubos plásticos de 50 mL esterilizados e protegidos da luz para, posterior uso.

Após a reativação das cepas, foram inoculados (1% v/v) em tubos de ensaio contendo caldo MRS isentos de bile, como teste controle e, em concentrações de 0,3; 0,5 e 1% (1% v/v) e incubados durante três horas a 37 °C (Garcia *et al.*, 2015) em triplicata. Da mesma forma que foi calculado para pH, procedeu-se os testes com bile, onde 200 µL foram analisados antes e depois da incubação em leitor de microplacas (CHAMALEON PLATE) à densidade óptica (OD) definida na absorbância de $\lambda = 595$ nm (Vieira *et al.*, 2013). A taxa de sobrevivência (%) e tolerância de cada cepa bacteriana as diferentes concentrações de bile, foi determinada pela fórmula $[(OD \text{ final} - \text{inicial OD}) / OD \text{ inicial}] \times 100\%$, como redução percentual da absorbância em relação ao meio de crescimento sem adição de bile. Foram consideradas resistentes as cepas que apresentaram taxa de sobrevivência de $\geq 50\%$, na concentração de 1%, portanto são bactérias ácido lácticas com alto potencial probiótico (Tuyarum *et al.*, 2021).

4.1.6 Atividade inibitória contra diferentes patógenos

As BAL foram testadas contra *Salmonella Typhimurium* e *E. coli* ATCC 25922 proveniente da coleção do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana, FCA/UFAM, Manaus-AM, pelo teste de dupla camada (*Spot on the Lawn Test*), de acordo com a metodologia proposta por Okamoto *et al.* (2018), com adaptações.

As cepas probióticas previamente cultivadas em caldo MRS a 37 °C foram inoculadas por meio da inoculação pontual (5 µL) em placa de Petri com ágar Müeller-Hinton e incubadas por 24 h a 37 °C em estufa bacteriológica. O inóculo das bactérias indicadoras, previamente cultivadas em caldo BHI a 37 °C por 24 h, foi ajustado em espectrofotômetro para $1,5 \times 10^8$ com solução de NaCl 0,85% e alíquotas de 300 µL foram transferidas para tubos de ensaio

contendo 30 mL de ágar BHI semisólido (0,75%), homogeneizados e vertidos separadamente sobre as placas contendo as cepas probióticas, onde após a solidificação, as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 h. A formação de zonas translúcidas ao redor das cepas probióticas foi o indicativo de antibiose, sendo então mensurados os halos com auxílio de paquímetro digital. Zonas de inibição ≥ 6 mm foram consideradas resultado positivo (Xie *et al.*, 2015).

4.1.7 Avaliação de segurança dos probióticos. Detecção de resistência antimicrobiana

Os isolados de BAL foram testados quanto à resistência a antibióticos pelo método de difusão em disco com adaptações, de acordo com Domingos-Lopes *et al.* (2017). Inicialmente, as cepas foram reativadas em caldo MRS e, incubadas por 24 h a 37 °C em estufa com agitação orbital a 150 rpm.

Em placas de Petri, com dimensões de 120 mm, contendo ágar Müeller-Hinton, as cepas reativadas, foram semeadas por estriamento em três planos, com o auxílio de *swabe* estéril, que foi imerso nos tubos de suspensão bacteriana e teve o excesso do inóculo eliminado, por compressão do suabe na parede do tubo. Esse processo foi possível quando a turvação do inóculo bacteriano ficou equivalente a 0,5 na escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL) com solução de NaCl 0,85%, tendo sido realizado o espalhamento em toda superfície do ágar de para obtenção de crescimento uniforme. O tempo de aguardo para absorção do inóculo no ágar foi de 5 min, quando se procedeu a aplicação dos discos de antimicrobianos, com auxílio de pinça esterilizada e leve pressão para fixação dos discos.

Discos de antibióticos CECON® foram usados para testar a resistência dos isolados, sendo eles: ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). Após a incubação de 24 h das cepas, procedeu-se a mensuração do diâmetro das zonas ao redor dos discos, com a utilização de paquímetro digital. Cada isolado foi classificado como sensível, resistente e intermediário de acordo com as tabelas do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2020) e as análises foram realizadas em triplicata. Os diâmetros da zona de inibição foram interpretados de acordo com Charteris *et al.*, 1998).

4.1.8 Crescimento bacteriano em diferentes temperaturas

Os testes da capacidade dos isolados em crescer em diferentes temperaturas, seguiram o proposto por Risna *et al.* (2020). As temperaturas de 15, 37 e 45 °C foram as utilizadas, do qual 1 mL da cultura pura dos isolados selecionados foram inoculadas em 9 mL de caldo MRS e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, foram inoculados (1% v/v) em tubos de ensaio contendo caldo MRS e incubados com as temperaturas citadas para os testes durante três horas (Garcia *et al.*, 2015). Seguindo a metodologia utilizada nas análises de pH, procedeu-se os testes, onde 200 µL de cada cepa e diferentes temperaturas foram analisadas antes e depois da incubação em leitor de microplacas (CHAMALEON PLATE) à densidade óptica (OD) definida na absorbância de $\lambda = 595$ nm (Vieira *et al.*, 2013). A taxa de sobrevivência (%) foi determinada como redução percentual da absorbância em relação à temperatura de 37 °C. O aumento da biomassa foi apresentado em porcentagem (%) e calculado conforme a seguir: $[(OD \text{ final} - OD \text{ inicial}) / OD \text{ inicial}] \times 100\%$.

4.1.9 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico bacteriano foi realizada com *kit* de extração *PureLink Genomic DNA da Invitrogen*, de acordo com as instruções do fabricante, onde as etapas incluem: lise, neutralização, lavagem e diluição das amostras. A concentração de DNA foi determinada a partir de fluorímetro QUBIT e a análise eletroforética em gel de agarose (0,8%) para a análise qualitativa do DNA, que se apresentou íntegro. Essa análise foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM.

4.1.10 Amplificação do gene 16S rDNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do gene 16S rDNA, Tampão 1X para Taq DNA polimerase, 2,5 mM de $MgCl_2$, dNTPs 2,5 mM, 0,2 pMol de cada iniciador que flanqueiam as regiões V3-V4 do gene 16S rDNA (16S400F 5' – ACT CCT ACG GRA GGC AGC AG – 3'; 16S400R 5' – GGG ACT ACC AGG GTA TCT AAT – 3'), 0,06 U/µL da enzima Taq DNA Polimerase para volume final de 25 µL. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C; 1 min a 59 °C; 40 seg a 72 °C, e uma extensão final de 5 min a 72 °C.

4.1.11 Sequenciamento do gene 16S rDNA pelo método de Sanger e classificação taxonômica

O sequenciamento do gene 16S rDNA foi realizado utilizando-se a metodologia de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). As sequências genéticas obtidas foram submetidas ao *software* Phred e as sequências contínuas montadas a partir de fragmentos (*Contig*) foram analisadas via BLAST (*Basic Local Alignment Search*) para encontrar regiões similares, de acordo com maior percentual de identidade (Altschul *et al.*, 1990). Em seguida, foram comparadas ao banco de dados genômicos RDP release para determinar quais microrganismos apresentam sequências de DNA similares às amostras analisadas. Os microrganismos foram classificados com critérios de índices de similaridade de 97%, valor normalmente usados para espécies, de 95% como uma aproximação para gênero.

4.1.12 Teste de compatibilidade entre as cepas isoladas

A compatibilidade entre as cepas de interesse foi realizada usando o método *cross streak* (Al-Hussini *et al.*, 2019), com ligeiras adaptações. Resumidamente, três cepas foram semeadas em linhas paralelas em ágar MRS em placas de Petri de 120 mm e as outras seis cepas perpendiculares às três primeiras. Essa metodologia, propõe que através da interseção das estrias bacterianas, seja observada após a incubação por 24 h a 37 °C, a fusão das colônias bacterianas, sendo então, consideradas compatíveis.

4.1.13 Determinação do ideótipo

O ideótipo, foi desenvolvido utilizando as maiores médias das cepas, para diferentes concentrações de sais biliares e para atividade antimicrobiana com maior halo de inibição contra bactérias patogênicas de maior importância para aves, analisadas nos ensaios *in vitro*. As distâncias de Mahalanobis (D2) foram calculadas a partir dos dados padronizados entre todas as cepas avaliadas e o ideótipo, utilizando o *software* Genes (Cruz, 2008). As cepas então, foram classificadas de acordo com o índice de seleção de distância de cada cepa ao ideótipo, sendo as melhores as que tinham a distância mais curta.

4.1.14 Análise estatística dos testes *in vitro*

Todas as análises foram conduzidas em triplicata. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram separadas por comparação múltipla de Tukey. A diferença foi considerada significativa ao nível de 0,05 de significância, utilizando o teste de Kruskal Wallis. O procedimento GLM do programa computacional *Sistatistical Analysis System* – SAS (2008) foi utilizado.

4.2 Avaliação do potencial probiótico *in vivo*

4.2.1 Obtenção dos patinhos

A obtenção dos patinhos foi por meio de incubação natural. Em uma propriedade local, selecionou-se oito fêmeas matrizes de patos crioulo em fase de postura, identificou-se no bico, com pincel permanente atóxico, com numeração de um a oito e foi realizado o acompanhamento da postura dos ovos de cada ave por cerca de duas semanas. As matrizes foram condicionadas a permanecer em seu próprio ninho de postura (Figura 6), até a incubação e eclosão dos patinhos. Cada fêmea incubou 15 ovos.

Figura 6 - Ninhos para fêmeas de patos crioulo



Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

O acompanhamento das aves foi diário certificando-se que cada fêmea retornaria ao seu exato ninho, após a alimentação. O período de incubação até o início da eclosão foi de 33 a 34 dias (Figura 7). A partir do início das eclosões, a porta dos ninhos foi mantida fechada por 24 h, período ao qual, as fêmeas não foram manejadas e permaneceram no ninho para o completo

processo de eclosão natural dos patinhos. Após 24 h dos primeiros nascimentos, os patinhos que já se encontravam secos e ativos, foram realocados com uma fêmea de boa habilidade materna para cuidados parentais e posterior transporte apropriado ao Setor de Avicultura da UFAM.

Figura 7 - Etapas da incubação de ovos de fêmea de pato crioulo



Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

4.2.2 Preparação das cepas probióticas para inoculação nas aves experimentais

Utilizou-se as três cepas com menor distância (D2) de Mahalanobis, BPCD109, BPCJ114 e BPCI174 para utilização nos testes *in vivo*. Estas foram reativadas em tubos contendo caldo MRS por 48 h a 37 °C, em agitação a 150 rpm. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm a 4 °C e as células (biomassa) foram lavadas três vezes com tampão salino fosfato (PBS pH 7,2) e ajustadas a densidade óptica (OD 595 nm). O *pellet* composto apenas das células, foi ressuscitado em PBS (Arreguin-Nava *et al.*, 2020), com adaptações. Cada cepa foi diluída em solução PBS conforme os tratamentos propostos $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 MacFarland) e permaneceram estocadas (Figura 8), a 8 °C até a aplicação nas aves, por meio da técnica de gavagem, com auxílio de pipetador automático de 1000 µL.

O uso da gavagem como metodologia de inoculação nas concentrações determinadas levou em consideração o efeito sistêmico das cepas com administração enteral por permitir a administração exata das concentrações (Pauloni; Antiorio, 2020). Além desse fator, os processos de dessecação de probióticos podem afetar a viabilidade e funcionalidade onde perceberam correlação entre as respostas probióticas e a dessecação-reumedecimento e o processo usado para secar as bactérias (Laconelli *et al.*, 2015).

Figura 8 - Probióticos preparados e armazenados



Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

4.2.3 Avaliação *in vivo* das cepas com potencial probiótico

Para a realização dos testes *in vivo* o experimento foi conduzido nas instalações do Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, tendo coordenadas geográficas de latitude 3° 06' 14'' S, longitude 59° 58' 46'' W e altitude de 260 m. De acordo com a classificação proposta por Koeppen e Geiger, o clima em Manaus-AM é classificado como tropical quente e úmido, com precipitação média anual de 3001 mm, umidade relativa do ar de 73% e temperatura média de 26,4 °C (Climate-data.org, 2022), com duração de 90 dias.

Utilizou-se 96 patos crioulo com um dia de vida (Figura 9), provenientes de um criatório local. Os patinhos foram imunizados contra as doenças de Marek e Gumboro e, transportados via terrestre para o Setor de Avicultura, sob todos os cuidados necessários para a preservação do bem-estar das aves.

Durante a primeira semana de vida, as aves receberam aquecimento (campânula) por intermédio de lâmpadas incandescentes de 60 Watts por box (unidade experimental). A primeira semana de vida exige mais cuidados para com os patinhos, pois ainda não possuem sistema termorregulador desenvolvido e carecem de fonte de calor (Abreu, 2004). Esse manejo objetivou manter a temperatura e evitar correntes de ar no interior do galpão, além de afugentar roedores silvestres, que são predadores de aves pequenas.

Figura 9 - Patinhos com um dia de vida



Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

São escassos na literatura parâmetros estabelecidos para patinhos de um dia, porém para aves de corte em geral, recomenda-se 30 °C para os primeiros dias, com progressiva diminuição de temperatura, até os 25 °C. Já na fase de crescimento recomenda-se de 18 a 22 °C (Grimaud Freres, 2016). Dados de temperatura e umidade relativa do ar, foram coletados diariamente às 09h00 e 15h00, utilizando termohigrômetro e tabulados em *software* apropriado.

O estresse por calor é um problema global e é causado por temperaturas elevadas no ambiente em que os animais são criados, tendo causas diversas como falta de ventilação, construção de galpões inapropriados e taxa de lotação excessiva. Aves em confinamento estressadas por calor, podem sofrer distúrbios intestinais e hipersensibilidade a corticosterona, podendo atrasar a proliferação de células intestinais, levando a diminuição da altura das vilosidades e diminuição da profundidade das criptas. Podendo diminuir a produção animal e perturbação da homeostase (Quinteiro-Filho *et al.*, 2010).

Os boxes experimentais (Figura 10) estavam providos de cama (maravalha) com espessura de aproximadamente 8 cm com adição de 300 g/m² de cal virgem (Daipra *et al.*, 2009) que contribuiu para o controle de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), que é vetor de vários patógenos às aves e de microrganismos, principalmente *Salmonella* spp., e *Clostridium* spp. O programa de luz utilizado foi o de luz natural para o período amazônico em que o experimento foi realizado.

Figura 10 - Patinhos alojados em boxe experimental



Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos de três repetições com oito aves cada, totalizando 24 aves por tratamento e 96 aves experimentais. Os tratamentos foram: T1 = Controle – sem gavagem; T2 = Gavagem de 1 mL/ave de solução contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de probiótico BPCD109; T3 = Gavagem de 1 mL/ave de solução contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de probiótico BPCJ114; T4 = Gavagem de 1 mL/ave de solução contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de probiótico BPCI174.

Os probióticos foram compostos por três cepas selecionadas após testes específicos para probióticos nas concentrações $1,5 \times 10^8$ UFC/mL equivalente a 0,5 na escala de McFarland diluídos em solução PBS.

A gavagem nas aves (Figura 11) foi realizada diariamente de 1 a 15 dias, posteriormente uma vez por semana, até que as mesmas atingissem a idade de 70 dias conforme proposto por Aguihe *et al.* (2017).

O programa de alimentação das aves foi dividido em três fases (Tabela 1): inicial, crescimento e terminação. As dietas experimentais foram formuladas para atender às exigências nutricionais das aves, durante todo o experimento, com granulometria do milho de textura média (6 mm) na composição conforme recomendado por Maquiné *et al.* (2023) e foram formuladas de acordo com os valores de referência fornecidos por Rostagno *et al.* (2017), exceto energia e proteína (Rufino *et al.*, 2015), cálcio (Feijó *et al.*, 2016) e fósforo (Costa, 2018) que utilizaram requisitos adequados para patos por meio do programa para cálculo de rações em mínimo custo SUPERCAC (v. 6.2).

Figura 11 - Patinho sendo gavado com cepa probiótica



Fonte: Rufino, J.P. (2023)

Tabela 1- Composição das rações experimentais para patos

Ingredientes	Inicial	Crescimento	Terminação
Milho 7,88%	57,768	66,406	69,865
Farelo de soja 46%	36,280	28,066	24,149
Calcário calcítico	1,067	1,111	1,153
Fosfato bicálcico	2,624	2,423	2,188
Sal	0,834	0,708	0,582
DL-metionina 99%	0,071	0,128	0,126
Suplemento vit/min	0,500 ¹	0,500 ²	0,500 ³
Óleo de soja	0,852	0,655	1,434
Total	100,00	100,00	100,00
Níveis nutricionais ⁴			
Energia metabolizável, Kcal kg	2.900,00	3.000,00	3.100,00
Proteína bruta %	21,000	18,000	16,500
Cálcio%	1,15	1,10	1,05
Fósforo disponível %	0,600	0,550	0,500
Metionina + cistina %	0,725	0,705	0,665
Metionina total %	0,498	0,402	0,382
Sódio%	0,350	0,300	0,250

¹ **Suplemento (sup.) vitamínico/mineral** – inicial – conteúdo em 1 kg = ácido (ác.) fólico 800 mg, ác. pantotênico 12.500 mg, antioxidante 0,5 g, biotina 40 mg, niacina 33.600 mg, selênio 300 mg, vit. A 6.700.000 UI, vit. B1 1.750 mg, vit. B12 9.600 mcg, vit. B2 4.800 mg, vit. B6 2.500 mg, vit. D3 1.600.000 UI, vit. E 14.000 mg, vit. K3 1.440 mg. Sup. mineral – conteúdo em 0,5 kg = manganês 150.000 mg, zinco 100.000 mg, ferro 100.000 mg, cobre 16.000 mg, iodo 1.500 mg. ² **Sup. vit./mineral** – crescimento – conteúdo em 1 kg = ác. fólico 650 mg, ác. pantotênico 10.400 mg, antioxidante 0,5 g, niacina 28.000 mg, selênio 300 mg, vit. A 5.600.000 UI, vit. B1 0,550 mg, vit. B12 8.000 mcg, vit. B2 4.000 mg; vit. B6 2.080 mg, vit. D3 1.200.000 UI, vit. E 10.000 mg, vit. K3 1.200 mg. Sup. mineral – conteúdo em 0,5 kg = manganês 150.000 mg, zinco 100.000 mg, ferro 100.000 mg, cobre 16.000 mg, iodo 1.500 mg. ³ **Sup. vit./mineral** – terminação – conteúdo em 1 kg = ác. pantotênico 7.070 mg, antioxidante 0,5 g, niacina 20.400 mg, selênio 200 mg, vit. A 1.960.000 UI, vit. B12 4.700 mcg, vit. B2 2.400 mg, vit. D3 550.000 UI, vit. E 5.500 mg, vit. K3 550 mg. Sup. mineral – conteúdo em 0,5 kg = manganês 150.000 mg, zinco 100.000 mg, ferro 100.000 mg, cobre 16.000 mg, iodo 1.500 mg. ⁴ Níveis estimados na matéria seca

Fonte: Rufino, J.P. (2024)

4.2.4 Avaliação do desempenho zootécnico das aves e rendimento de carcaça

As variáveis de desempenho analisadas foram o consumo de ração (kg/ave) quantificada pela pesagem da ração fornecida no início das fases de criação e as sobras, no final de cada semana e, a diferença será calculada para o consumo de ração para cada unidade experimental, ganho de peso médio (g/ave) e a conversão alimentar (kg/kg), calculada dividindo-se o consumo de ração pelo ganho de peso de cada unidade experimental.

Para as variáveis de rendimento de carcaça aos 90 dias de idade, após o jejum alimentar de 12 h, duas aves foram selecionadas ao acaso de cada parcela experimental, identificadas e pesadas. As aves foram eutanasiadas conforme preconiza o CONCEA, passando por deslocamento cervical seguido de sangria, escalda (água a 60 °C por três min), depena e evisceração. O rendimento de carcaça foi calculado em relação ao peso vivo antes do abate [% RC = (peso carcaça*100/peso vivo)].

As carcaças limpas, sem pescoço, pés e vísceras foram pesadas para determinação do rendimento em relação ao peso vivo, que está expresso em percentagem. Foram realizados cortes para retirada do peito, dorso, pescoço, asas, patas, coxa e sobrecoxa (Gomide *et al.*, 2012), para o cálculo do rendimento em relação ao peso da carcaça quente. O rendimento das partes da carcaça e peito em função da carcaça foi calculado de acordo com a fórmula [% RP = (peso da parte*100/peso da carcaça)].

4.2.5 Avaliação dos parâmetros sanguíneos

Após jejum sólido prévio de 12 h, foram selecionadas duas aves por parcela (n = 24 aves), e colhidas amostras sanguíneas no período da manhã sendo coletados 1 mL de sangue das aves diretamente da veia ulnar, mediada por seringas descartáveis contendo anticoagulante heparina (5000 UI). Essas amostras foram identificadas e preservadas a -4 °C durante todo processo de colheita e enviadas ao laboratório para análises dos parâmetros hematológicos (eritrograma, leucograma, trombograma) e bioquímica sérica.

Para contagem dos leucócitos totais, leucócitos diferenciados e trombócitos, foram confeccionadas três lâminas com extensões sanguíneas para cada animal, obtendo 72 lâminas por tratamento (n = 72), as lâminas foram coradas pelo método de coloração rápida *May Grünwald-Giemsa Wright* (MGGW) (Tavares-Dias; Moraes, 2004) e visualizados em microscópio (Leica, DM3000) na objetiva de 40x.

O sangue coletado foi utilizado para a contagem de eritrócitos circulantes (RBC), utilizando câmara de Neubauer após diluição em formol-citrato e azul de toluidina, e visualizados em microscópio (Leica, DM3000) na objetiva de 40x. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método de cianometahemoglobina e o hematócrito pelo método de microhematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971), com centrifugação de tubos micro capilares heparinizados (12.000 rpm/5 min) (Aride *et al.*, 2018).

Para as análises bioquímicas, foi utilizado o plasma do material remanescente da colheita após centrifugação a (7.000 rpm) durante o tempo de 10 min. As variáveis bioquímicas analisadas foram a quantificação dos níveis colesterol, glicose, proteínas totais, triglicerídeos, cloreto, fósforo, cálcio e magnésio. Utilizou-se *kits* comerciais de ensaio enzimático-colorimétrico de acordo com as recomendações específicas do fabricante e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (*Thermo Fisher Scientific Multiskan™ GO*) em comprimento de onda específico para cada ensaio. As análises foram realizadas no Núcleo de Estudos de Invertebrados e Vertebrados da Amazônia, do Instituto Federal do Amazonas (IFAM).

4.2.6 Análise estatística dos testes *in vivo*

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade e foram aplicadas as transformações necessárias. Posteriormente, foi realizada ANOVA unidirecional utilizando o *software* R (versão 4.1.3) seguindo as diretrizes de Logan (2010). O teste de diferença significativo de Tukey foi utilizado para testar as diferenças significativas entre os valores médios. Os resultados são apresentados como médias e o nível de significância para diferenças foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação *in vitro*

5.1.1 Isolamento

Do isolamento, 300 cepas de bactérias apresentaram características gerais de BAL. A identificação preliminar mostrou morfologia de colônias esféricas e fusiformes, com coloração branca a creme, brilhantes, opacas e translúcidas, caracterizadas como Gram-positiva (Black; Black, 2018) e catalase negativo. A coloração violeta cristalina, caracterizando o Gram-positiva ocorre devido às bactérias possuírem uma espessa camada de peptidoglicano, correspondendo de 50 a 90% do peso celular, enquanto as Gram-negativas, possuem apenas cerca de 10% do peso celular (Dorr *et al.*, 2019).

Destas, nove cepas apresentaram potencial probiótico *in vitro*, após testes e oito foram identificadas molecularmente. Todas as cepas identificadas molecularmente neste estudo estão mantidas na coleção de microrganismos do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM.

5.1.2 Tolerância ao pH ácido

Critério importante para a seleção do microrganismo com potencial probiótico. A capacidade da BAL sobreviver a pH baixo, variando de 1 a 3, por até três horas é essencial para provar sua capacidade probiótica (Shokryazdan *et al.*, 2014).

A tabela 2, mostra os resultados da porcentagem de sobrevivência dos isolados, após o teste de exposição ao baixo pH, dos quais foram capazes de satisfazer os critérios estabelecidos para este teste de tolerância ácida. Os resultados demonstram forte resistência das cepas aos ácidos. Todos os isolados foram capazes de crescer em pH na faixa de 2 a 6,5, porém essa taxa de sobrevivência dos isolados de BAL caiu significativamente ($p < 0,05$) quando usado o pH 2.

Nota-se que a taxa de sobrevivência das BAL foi relativamente maior em pH 3.0 ($p < 0,05$). Essa observação supõe que após três horas de incubação a sobrevivência das BAL é largamente dependente do pH do ambiente. Esses dados evidenciam que em pH mais baixo as cepas tornaram-se susceptíveis devido a ação do ácido que por sua vez reduziu sua taxa de sobrevivência no experimento *in vitro* (Kailasapathy; Chin, 2000). O ácido clorídrico (HCl) tem efeito bactericida e quando adicionado ao meio em maior concentração favoreceu a tendência decrescente de desenvolvimento das cepas em menor pH. O HCl tende a oxidar

moléculas importantes nas células, o que leva a baixa viabilidade celular. Observa-se também que a oxidação com HCl é dependente da cepa, confirmando os resultados encontrados por (Oyewole *et al.*, 2018).

Tabela 2 - Taxa de sobrevivência (%)¹ de bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos, desafiadas a diferentes pH ácido

CEPA	pH 2,0	pH 3,0	pH 6,54
BPCI79	24,65 ± 3,14c	40,97 ± 2,12c	100,00 ± 0,00
BPCC92	22,76 ± 1,16c	43,49 ± 3,13c	100,00 ± 0,00
BPCD109	16,32 ± 2,06c	32,31 ± 2,52c	100,00 ± 0,00
BPCJ114	14,41 ± 2,55c	29,70 ± 2,21c	100,00 ± 0,00
BPCJ117	12,59 ± 3,65c	23,13 ± 3,51c	100,00 ± 0,00
BPCJ121	11,48 ± 2,44c	20,94 ± 2,85c	100,00 ± 0,00
BPCD145	50,00 ± 1,96ab	80,00 ± 2,74ab	100,00 ± 0,00
BPCI174	28,57 ± 0,65c	71,42 ± 2,15ab	100,00 ± 0,00
BPCI175	70,69 ± 2,16a	84,61 ± 2,22ab	100,00 ± 0,00
p-valor ²	0,05	0,05	-
CV ³ (%)	22,53	23,15	-

¹Valores médios ± desvio padrão

² Valores dentro da coluna diferem entre si à 0.05 de significância

³ CV – Coeficiente de variação

⁴ A taxa de crescimento em pH 6.5 foi usada como controle medida a 100 %

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

5.1.3 Teste de tolerância a sais biliares

Os sais biliares tendem a danificar a estrutura da membrana celular por esse motivo é uma característica importante para realização de testes com bactérias, sendo considerada como uma propriedade essencial para que as cepas possam expressar seu potencial probiótico devendo sobreviver às condições do intestino delgado. A concentração de sais biliares no duodeno e cecos de galinhas foi de 0,008 e 1,175% respectivamente (Lin *et al.*, 2003). Então é necessário que as cepas estudadas sejam capazes de crescer em sais biliares com concentrações que podem variar de 0,15 a 0,30% (Suskovic *et al.*, 2000).

Todas as cepas resistiram às concentrações de sais biliares (Tabela 3). Porém, com o aumento da concentração a taxa de crescimento diminuiu ($p < 0,05$). Esse fator pode ser atribuído a incapacidade dos isolados se adaptarem no meio com os sais biliares inicialmente.

Tabela 3 - Taxa de sobrevivência (%)¹ de bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos, desafiadas a diferentes concentrações de sais biliares

CEPA	0,00% ⁴	0,30%	0,50%	1%
BPCI79	100,00 ± 0,00	84,30 ± 2,16 ^{ab}	53,29 ± 2,16 ^a	53,14 ± 1,57 ^{bc}
BPCC92	100,00 ± 0,00	57,53 ± 2,52 ^c	53,18 ± 2,51 ^c	52,22 ± 1,63 ^{bc}
BPCD109	100,00 ± 0,00	74,80 ± 2,15 ^b	60,63 ± 1,56 ^b	53,25 ± 1,79 ^{bc}
BPCJ114	100,00 ± 0,00	98,27 ± 3,52 ^a	61,73 ± 1,62 ^b	55,56 ± 1,23 ^b
BPCJ117	100,00 ± 0,00	65,98 ± 2,16 ^{bc}	60,61 ± 1,13 ^b	52,45 ± 1,63 ^{ab}
BPCJ121	100,00 ± 0,00	73,22 ± 1,56 ^b	58,33 ± 1,53 ^c	52,25 ± 2,12 ^{ab}
BPCD145	100,00 ± 0,00	55,06 ± 1,41 ^c	52,39 ± 1,79 ^c	51,36 ± 2,17 ^{bc}
BPCI174	100,00 ± 0,00	75,93 ± 1,58 ^c	63,71 ± 2,69 ^c	55,37 ± 1,22 ^c
BPCI175	100,00 ± 0,00	75,44 ± 1,63 ^b	60,00 ± 2,53 ^b	56,58 ± 1,35 ^b
p-valor ²	-	0,04	0,05	0,04
CV ³ (%)	-	21,12	22,21	23,15

¹ Valores médios ± desvio padrão;

² Valores dentro da coluna diferem entre si na coluna à 0.05 de significância;

³ CV – Coeficiente de variação;

⁴ A taxa de crescimento de 0% de bile foi usada como controle medida a 100%

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Todos os isolados apresentaram taxa de sobrevivência superior a 50% na concentração biliar de 1% indicando que podem sobreviver através do sistema digestivo. O crescimento das BAL em meio contendo sais biliares pode ser atribuído à capacidade dessas bactérias produzirem hidrolases de sais biliares o que diminui o efeito tóxico conforme relataram (Jafari *et al.*, 2011).

Os dados mostram redução da taxa de sobrevivência bacteriana conforme se aumenta as concentrações de bile no meio. Em grande parte, esse fator pode ser atribuído à própria presença da bile que é capaz de inibir o crescimento de bactérias, especialmente as Gram-positivas (Oyewole *et al.*, 2018). Os ácidos biliares atuam na dissociação da membrana da parede celular interrompendo a homeostase e levando a lise celular e o vazamento do conteúdo das bactérias resultando em baixa sobrevivência conforme os achados por Begley, Gahan e Hill (2005), em consonância com este estudo *in vitro*.

5.1.4 Teste de tolerância ao NaCl

A resistência das cepas frente a diferentes concentrações de NaCl foi avaliada e os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação do efeito do NaCl à sobrevivência das bactérias ácido lácticas isoladas de intestino de patos domésticos

CEPA	Concentração de NaCl		
	2,0%	4,0%	6,5%
BPCI79	++	+	+
BPCC92	++	++	+
BPCD109	++	+	+
BPCJ114	++	++	+
BPCJ117	++	++	++
BPCJ121	+++	++	+
BPCD145	+++	++	+
BPCI174	++	+	+
BPCI175	+++	++	+

Sinal de (+) ou (-) significa crescimento ou nenhum crescimento respectivamente

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Os resultados mostram-se variáveis, porém, indicando que todas as cepas sobreviveram nas três concentrações testadas. Três cepas: BPCJ121, BPCD145 e BPCI175 exibiram maior turbidez na concentração de 2% (0,34 mol/L) de NaCl dados semelhantes aos encontrados por Ahmed *et al.* (2019).

5.1.5 Teste de crescimento em diferentes temperaturas

O crescimento dos isolados selecionados para esse estudo foi observado em três diferentes temperaturas: 15, 37 e 45 °C durante 24 h (Tabela 5). A densidade óptica (OD) definida na absorbância de $\lambda = 595$ nm (Vieira *et al.*, 2013), foi utilizada e todas as cepas foram capazes de sobreviver nas temperaturas avaliadas, sugerindo que as bactérias são mesófilas (Risna *et al.*, 2020). Ressalta-se que as bactérias foram capazes de crescer a 45 °C (Mulaw *et al.*, 2019), demonstrando resistência a temperatura mais elevada do que a do corpo de aves de corte (Reis *et al.*, 2022).

A temperatura corporal da ave é ótima para o crescimento de cepas bacterianas é geralmente cerca de 37 °C (Hu *et al.*, 2018), sendo a temperatura limite 42 °C, portanto, é necessária a triagem de tolerância ao calor das cepas candidatas. Esses resultados mostram que todas as cepas conseguiram sobreviver à maior temperatura testada.

Tabela 5 - Taxa de sobrevivência (%)¹ de bactérias ácido lácticas isoladas de intestino de patos domésticos, desafiadas a diferentes temperaturas de incubação

CEPA	Temperatura		
	15 °C	45 °C	37 °C ⁴
BPCI79	54,69 ± 0,37 ^{bc}	35,66 ± 0,49 ^b	100,00 ± 0,00
BPCC92	82,43 ± 0,52 ^b	49,03 ± 0,13 ^{ab}	100,00 ± 0,00
BPCD109	96,45 ± 0,46 ^a	30,85 ± 0,53 ^b	100,00 ± 0,00
BPCJ114	74,74 ± 1,06 ^{bc}	20,64 ± 0,11 ^{bc}	100,00 ± 0,00
BPCJ117	99,04 ± 0,75 ^a	57,52 ± 0,49 ^a	100,00 ± 0,00
BPCJ121	93,61 ± 0,64 ^a	34,18 ± 0,67 ^b	100,00 ± 0,00
BPCD145	87,64 ± 1,15 ^b	21,46 ± 0,76 ^{bc}	100,00 ± 0,00
BPCI174	84,54 ± 0,44 ^b	20,45 ± 0,19 ^{bc}	100,00 ± 0,00
BPCI175	95,89 ± 0,85 ^a	36,88 ± 0,23 ^b	100,00 ± 0,00
p-valor ²	0,05	0,05	-
CV ³ (%)	19,44	22,12	-

¹ Valores médios ± desvio padrão;

² Valores dentro da coluna diferem entre si na coluna à 0.05 de significância;

³ CV – Coeficiente de variação;

⁴ A taxa de incubação a 37 °C foi usada como controle medida a 100%

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

5.1.6 Teste de susceptibilidade a antibióticos

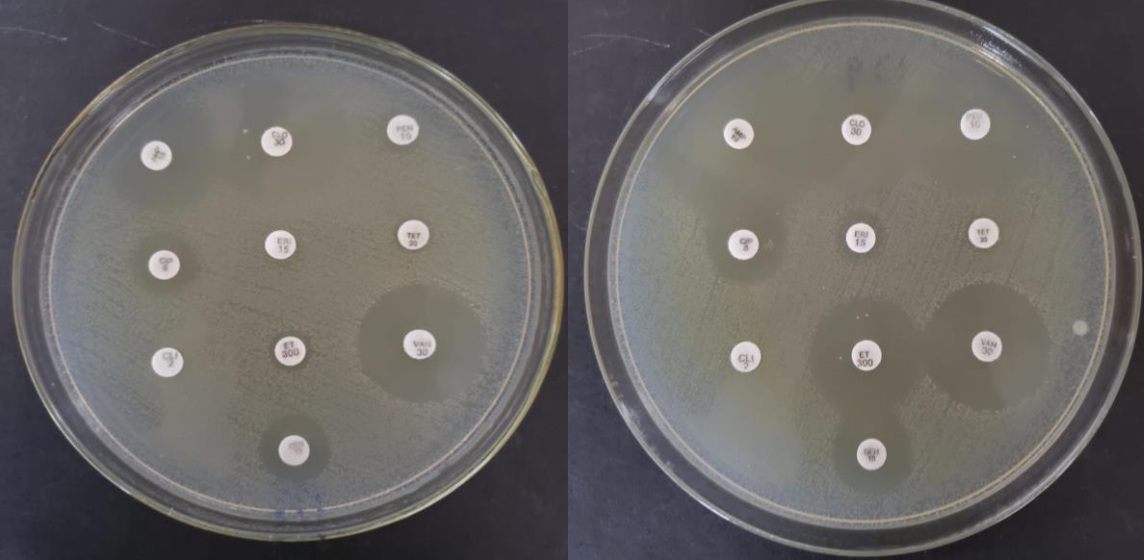
Outro importante critério de seleção para probióticos é a atividade antibiótica. Os isolados foram testados frente a dez antibióticos (Figura 12) para se obter os padrões de susceptibilidade (Tabela 6). Os dados indicam padrões variados em sua resistência. Muito embora a maioria dos antibióticos testados não sejam comumente usados na indústria avícola, essa tendência no padrão de resistência e susceptibilidade pode colaborar com futuros estudos de uso rotineiro de antibióticos na avicultura.

Determinar a susceptibilidade das BAL dessa pesquisa aos antibióticos testados fornece ideia do espectro de resistência a antibióticos dos isolados de intestino de patos domésticos e serve como ponto de partida para avaliação de segurança.

Os resultados indicam que 100% dos isolados investigados são resistentes à clindamicina, o que surpreendeu. Essa resistência antibiótica intrínseca dos *Enterococcus* aos antibióticos lincosamidas já foi relatada em outros estudos (Klare *et al.*, 2003). Os isolados também foram 100% resistentes a eritromicina, corroborando com os dados observados por Lopes *et al.* (2005) onde ocorreu alta prevalência de *Enterococcus* à eritromicina, esse fato pode

ser explicado pela transferência horizontal de genes de elementos genéticos resistentes a drogas através de plasmídeos e transposons, principalmente a antibióticos macrolídeos (Santagati *et al.*, 2000; Arredondo-alonso *et al.*, 2020).

Figura 12 - Testes das cepas frente a diferentes antibióticos



Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade de bactérias isoladas de patos domésticos à diferentes antibióticos

CEPA	AMP	CIP	CLI	CLO	ERI	EST	GEN	PEN	TET	VAN
BPCI79	S	I	R	S	R	S	S	S	R	S
BPCC92	S	I	R	S	R	S	I	S	R	S
BPCD109	S	R	R	I	R	I	I	R	R	S
BPCJ114	S	R	R	I	R	S	I	R	R	S
BPCJ117	S	R	R	I	R	R	I	R	R	S
BPCJ121	S	R	R	I	R	S	I	R	R	S
BPCD145	S	R	R	I	R	R	I	R	R	S
BPCI174	S	R	R	I	R	S	I	R	R	S
BPCI175	S	R	R	I	R	R	I	R	R	S

S: sensível (diâmetro ≥ 21 mm); I: intermediário (diâmetro 16 – 20 mm); R: resistente (diâmetro ≤ 15 mm). AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; EST: estreptomicina; GEN: gentamicina; PEN: penicilina; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Um bom probiótico não deve carregar genes de resistência a antimicrobianos (Montoro *et al.*, 2018) ou seja, apesar de grande quantidade de linhagens de BAL apresentarem resistência

a determinados antimicrobianos não significa que essa resistência seja transferível. Das linhagens avaliadas todas foram sensíveis a ampicilina e todas resistentes à clindamicina, eritromicina e tetraciclina.

5.1.7 Atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas de aves

Uma das propriedades desejáveis para que BAL possam ser candidatas a probióticos é a inibição contra bactérias potencialmente patogênicas (Leclercq *et al.*, 2017). No teste de sobre camada, as cepas são separadas dos microrganismos indicadores por uma camada de ágar semi-sólido, havendo um impedimento do contato direto entre elas. De maneira tal que, é possível avaliar a produção de substâncias extracelulares, como por exemplo ácido lático, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetil e peptídeos, que se difundem no ágar para exercer os seus efeitos sobre as bactérias indicadoras (Leclercq *et al.*, 2017).

Na avicultura, as perdas econômicas por infecções bacterianas trazem prejuízos desde a produção até a comercialização dos produtos (Dipeolu *et al.*, 2005). Os agentes causadores de infecções bacterianas mais comuns, responsáveis por diarreias e baixa produtividade são os sorotipos *Salmonella* sp. e *E. coli*.

O principal reservatório de *S. enterica* inclui galinhas, perús, papagaios e patos (Hassanein *et al.*, 2011). Diante desse cenário geral, os isolados foram testados frente a essas duas bactérias patogênicas indicadoras: *Salmonella Typhimurium* e *E. coli* (área de inibição de no mínimo 12 mm). Dos nove isolados, oito inibiram as cepas indicadoras, seguido, portanto, para os demais testes de comprovação como potenciais probióticos (Tabela 7).

É sabido que aditivos empregados no cotidiano, na dieta de aves, influenciam no tipo e densidade bacteriana no organismo. Salehizadeh *et al.* (2019) demonstraram que aves suplementadas com probióticos ricos em bactérias produtoras de ácido lático, elevam sua capacidade absorptiva, e conseguem reduzir o número populacional de *E. coli*.

Os dados desse estudo *in vitro*, demonstram a capacidade dos isolados de BAL, coletadas de intestinos de patos domésticos, como inibidores eficientes dessas cepas de enterobactérias patogênicas, demonstrando que essas BAL têm alto potencial antimicrobiano. Nossos achados reforçam os resultados de Popova (2017) que testaram aditivos probióticos *in vitro* mostrando redução do número de patógenos, os mesmos aditivos *in vivo*, obtendo resultados também satisfatórios.

Tabela 7 - Zonas (mm) de inibição (média $\pm$ desvio padrão) de crescimento bacteriano frente as bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos

CEPA	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
BPCI79	11,65 $\pm$ 0,68 ^c	11,78 $\pm$ 1,05 ^a
BPCC92	14,01 $\pm$ 1,25 ^{bc}	13,24 $\pm$ 1,06 ^a
BPCD109	14,76 $\pm$ 0,14 ^{bc}	13,53 $\pm$ 1,29 ^a
BPCJ114	14,96 $\pm$ 0,62 ^b	13,46 $\pm$ 1,54 ^a
BPCJ117	13,33 $\pm$ 0,20 ^b	13,07 $\pm$ 0,86 ^a
BPCJ121	13,36 $\pm$ 0,29 ^b	12,43 $\pm$ 1,13 ^a
BPCD145	13,22 $\pm$ 0,54 ^a	13,21 $\pm$ 0,56 ^a
BPCI174	14,74 $\pm$ 1,63 ^{bc}	13,71 $\pm$ 1,49 ^a
BPCI175	14,30 $\pm$ 0,93 ^b	13,19 $\pm$ 1,64 ^a
p-valor ²	0,0000	0,4541
CV ³ (%)	5,79	9,29

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

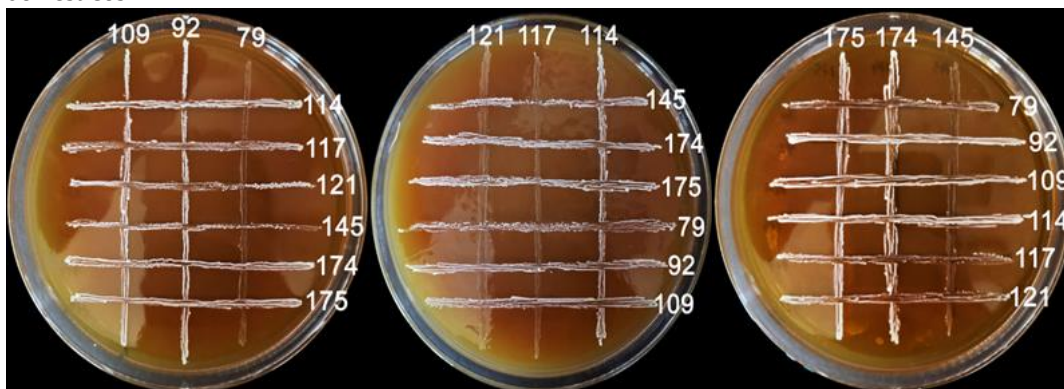
5.1.8 Compatibilidade das cepas bacterianas e índice de seleção de distância ao ideótipo

O teste *cross streak* em ágar MRS foi realizado para identificar a compatibilidade entre todas as cepas bacterianas e, os resultados mostram que estas, são compatíveis entre si, *in vitro*, conforme evidenciado pela fusão das colônias e ausência de zona bacteriostática com inibição na inserção (Figura 13).

Três cepas foram semeadas em ágar MRS e em linhas paralelas, às outras cepas foram semeadas perpendicularmente às três primeiras. A junção e o crescimento das estrias bacterianas foram examinados após 24 h a 37 °C, indicando compatibilidade entre as cepas analisadas, portanto, sendo cepas adequadas para preparações probióticas.

Considerando os testes realizado *in vitro* sobre as concentrações de sais biliares e atividade antimicrobiana com maior halo de inibição contra bactérias patogênicas de maior importância para aves, as cepas *Enterococcus lactis* obteve a menor distância de Mahalanobis, seguida por duas outras cepas de *Enterococcus ratti* e *Enterococcus faecium* (Tabela 8)

Figura 13 - Teste *cross streak*, compatibilidade entre as bactérias ácido lácticas de intestino de patos domésticos



Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

Tabela 8 - Índice de seleção de distância ao ideótipo pela escala de Mahalanobis, das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato gastrointestinal de patos domésticos

Cepa	Distância ao ideótipo	Ranking
BPCD109	1,3682	1 ^a
BPCJ114	1,7173	2 ^a
BPCI174	1,7299	3 ^a
BPCJ121	1,9408	4 ^a
BPCC92	2,0226	5 ^a
BPCJ117	2,2289	6 ^a
BPCI79	2,3992	7 ^a
BPCD145	2,5970	8 ^a
BPCI175	2,6193	9 ^a

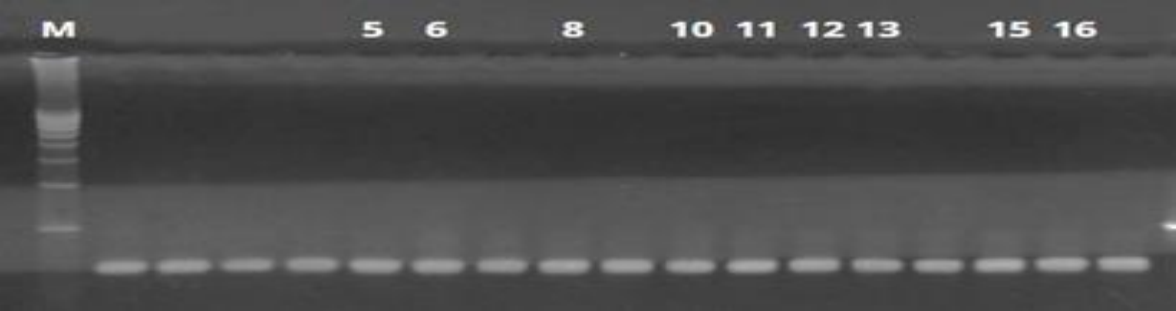
Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

5.1.9 Extração e amplificação do DNA genômico das cepas endógenas

Caracterizar molecularmente o procarioto nos permite entender as características fenotípicas, fisiológicas e ecológicas desses microrganismos (Kant *et al.*, 2017), colaborando para estudo mais abrangente de bactérias potencialmente probióticas.

Por meio do sequenciamento genético de fragmentos do gene 16S rDNA identificou-se os isolados BPCI79, BPCC92, BPCD109, BPCJ114, BPCJ117, BPCJ121, BPCI174 e BPCI175, apresentaram alta similaridade 98,37 a 99,43% de identidade com *Enterococcus* (Figura 14). Não foi possível identificar somente o isolado BPCD145.

Figura 144 - Resultado da PCR realizada para amplificação da região 16S rDNA



Eletroforese em gel de agarose, para amplificação dos genes de 16S rDNA de isolados de intestino de patos. 5; 10 (BPCI79; BPCJ114 - *Enterococcus ratti*), 6 (BPCC92 - *Enterococcus durans*), 8; 11 (BPCD109; BPCJ117 - *Enterococcus lactis*), 12; 15; 16 (BPCJ121; BPCI174; BPCI175 - *Enterococcus faecium*)
Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Enterococcus existem individualmente ou em pares, habitam intestinos de animais vertebrados e invertebrados. Este gênero pertence ao filo Firmicutes da classe Bacilli, ordem *Lactobacilalles* e família *Enterococcacae* (Fiore *et al.*, 2019). Possuem a capacidade de colonização do trato digestivo, permanecendo vivos em faixa de temperatura e pH de grande amplitude, conseguem resistir a dessecação e crescer na presença de 6,5% de NaCl (Lebreton *et al.*, 2014), em concordância com os dados desta pesquisa.

As bandas amplificadas foram sequenciadas e os resultados foram utilizados para busca de similaridade com outras sequências do gene bsh bacteriano que estão disponíveis no *GenBank* usando o BLAST. Os resultados da análise mostraram similaridade de DNA (98,37 a 99,43%) conforme apresentado na tabela 9.

Tabela 9 - Identificação genética utilizando o gene 16S rDNA das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de patos domésticos. Dados *GenBank*

Isolado	Identidade (Blastn) * (%)	E-value	Microorganismo	Acesso <i>Genbank</i>
BPCI79	99,38	0,0	<i>Enterococcus ratti</i>	MN416973.1
BPCC92	98,40	0,0	<i>Enterococcus durans</i>	KF250830.1
BPCD109	98,40	0,0	<i>Enterococcus lactis</i>	MF097970.1
BPCJ114	98,97	0,0	<i>Enterococcus ratti</i>	MN416973.1
BPCJ117	98,41	0,0	<i>Enterococcus lactis</i>	MF097970.1
BPCJ121	99,05	0,0	<i>Enterococcus faecium</i>	MN422615.1
BPCD145	-	-	-	-
BPCI174	98,37	0,0	<i>Enterococcus faecium</i>	MK643159.1
BPCI175	99,43	0,0	<i>Enterococcus faecium</i>	OP020787.1

*Dados obtidos no banco de dados NCBI (*Nacional Center for Biotechnolgy Information*)

Fonte: Maquiné, L.C. (2023)

Os *E. faecium* que são também bactérias Gram-positivas foi o primeiro probiótico a ser usado como aditivo na nutrição de aves pela União Europeia e FDA (He *et al.*, 2021). É um probiótico largamente utilizado em pecuária melhorando a saúde intestinal e o muco jejunal em frangos de corte principalmente. Estudo tem mostrado que essa bactéria tem a capacidade de melhorar o desempenho do crescimento animal e imunidade às doenças (Yu *et al.*, 2019).

Sorotipos de *E. faecium* são considerados seguros na fermentação de carnes e produtos lácteos, também podem ser usados como probióticos para reduzir infecções intestinais por *E. coli*, além de favorecer o desenvolvimento do sistema imune em frangos de corte (Franz *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2013).

5.2 Avaliação in vivo

5.2.1 Desempenho zootécnico

Um dos métodos mais comuns para isolar e identificar novas cepas probióticas é a análise filogenética e a homologia de sequência de 16S rDNA após cultivo em meio de isolamento (Chen *et al.*, 2013; Tulini *et al.*, 2013). Nesse estudo, oito cepas de BAL foram identificadas, das quais, as três que se destacaram com base na escala de Mahalanobis foram utilizadas para os testes com as aves. Os produtos de PCR das cepas foram sequenciados, e as sequências de nucleotídeos foram semelhantes às sequências de *E. lactis*, *E. ratti* e *E. faecium*, com maior identidade de sequência pela análise de BLAST e maior homologia de sequência por homologia de sequência de 16S rDNA.

Os dados de desempenho zootécnico no período inicial de criação (1 a 35 dias) dos patos inoculados com diferentes cepas com potencial probiótico estão apresentados na tabela 10. Para a variável consumo de ração percebe-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$). Apesar dos resultados não significativos observou-se que as aves inoculadas com as diferentes cepas de BAL consumiram mais ração do que as aves do grupo controle, que não foram inoculadas com bactérias.

Dados diferentes foram encontrados por Willis e Reid (2008) e Alkhalf, Alhaj e Al-Homidan (2010), que observaram diferença significativa no consumo de ração e eficiência alimentar em frangos de corte que receberam dieta suplementada com probiótico, muito embora, sejam espécies diferentes. Os resultados mostram que os probióticos não atuam como nutrientes, e sim, como aditivos que podem ou não, afetar a condição microbiana de seu

hospedeiro, o que de acordo com Tarrah *et al.* (2018) as bactérias probióticas podem ter seus efeitos demonstrados quando os animais são alimentados com baixo teor nutricional.

Tabela 10 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas¹ fase inicial (1 a 35 dias)

Fase	Variáveis ²	Probióticos				p-valor ⁴	CV ⁵ , %
		(T1) Controle	(T2) <i>E. lactis</i> ³	(T3) <i>E. ratti</i>	(T4) <i>E. faecium</i>		
Inicial	CR	2,23	2,40	2,29	2,48	0,77	12,07
	GP	1,01	0,98	0,98	0,95	0,93	9,88
	CA	2,21 ^c	2,45 ^b	2,34 ^b	2,61 ^a	0,05	11,28

¹ Todos os dados representam a média de 24 repetições (patos) por tratamento.

² CR = Consumo de ração (g/ave). GP = Ganho de peso (g/ave). CA = Conversão alimentar (g/ave).

³ E. = *Enterococcus*.

⁴ As médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Não significativo = $p > 0,05$.

⁵ CV = Coeficiente de variação

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

A inoculação intencional na microbiota das aves com bactérias probióticas deve ser realizada logo após o nascimento, como nesse estudo, de tal forma que a colonização se inicie nos primeiros dias, para evitar instalação de microrganismos entéricos patogênicos (Linzmeier *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2014) aumentando a probabilidade de colonização bem-sucedida no trato gastrointestinal em desenvolvimento. Nesse sentido, procedeu-se a inoculação nos patinhos desde o primeiro dia de vida (Santos *et al.*, 2005; Ferreira; Kussukawa, 2008), pois após a eclosão as aves podem receber o probiótico, independentemente do tipo de aplicação, de forma contínua.

Para a variável ganho de peso (GP), e considerando o período de fase inicial, não se percebeu diferença estatística ($p > 0,05$). Os tratamentos tiveram resultados semelhantes. Esses resultados iniciais diferem dos encontrados por Hossain *et al.* (2024) que usando 250 e 500 mg de probióticos multicepas liofilizados, por quilo de ração inicial, encontraram diferença significativa ($p < 0,05$) para o ganho de peso corporal dos patinhos, onde a maior inclusão de probiótico causou efeito positivo com o uso das cepas para essa variável. Gaggia *et al.* (2010) citaram que a inclusão contínua de microrganismos benéficos com potencial probióticos, pode induzir a melhor capacidade funcional da barreira gastrointestinal.

O menor ganho de peso nas aves inoculadas com o probiótico pode ser atribuído à maior demanda de nutrientes para manter a homeostase frente a inoculação das cepas de bactérias ácido lácticas (Contini, 2016). A mucosa intestinal reage com reposição celular após ser

envolvida em processos de agressão externa, onde o consumo de nutrientes oriundos da reserva energética da ave é acionado para a manutenção do epitélio intestinal e estruturas anexas de suporte, podendo chegar a 20% da energia bruta consumida pela ave (Fernandes *et al.*, 2017). Pode-se inferir também que, nessa idade das aves, relativamente baixa, no momento da observação, os patos ainda não podiam mostrar seu desempenho real, uma vez, que a idade para o abate é de 90 dias.

Para a variável conversão alimentar nessa fase experimental, foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. O tratamento controle, obteve o menor e melhor resultado, o que significa que patos crioulos submetidos a tratamentos com inoculação de probióticos nessa fase experimental tiveram a pior eficiência alimentar, porém não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos T2 e T3, com a inoculação de probióticos. Didari *et al.* (2014) descreveram que aves tratadas com probióticos podem apresentar maior demanda por nutrientes para manter o balanço da homeostase contra a inoculação dessas cepas bacterianas.

Tabela 11 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas¹ fase crescimento (36 a 70 dias)

Fase	Variáveis ²	Probióticos				p-valor ⁴	CV ⁵ , %
		(T1) Controle	(T2) <i>E. lactis</i> ³	(T3) <i>E. ratti</i>	(T4) <i>E. faecium</i>		
Crescimento	CR	3,69	3,66	3,63	3,74	0,94	5,54
	GP	1,09	1,08	0,98	1,06	0,90	16,47
	CA	3,39 ^c	3,39 ^c	3,70 ^a	3,53 ^b	0,05	13,27

¹ Todos os dados representam a média de 24 repetições (patos) por tratamento.

² CR = Consumo de ração (g/ave). GP = Ganho de peso (g/ave). CA = Conversão alimentar (g/ave).

³ E. = *Enterococcus*.

⁴ As médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Não significativo = $p > 0,05$.

⁵ CV = Coeficiente de variação

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Na fase de crescimento (36 a 70 dias) dos patos crioulos inoculados com bactérias ácido lácticas com potencial probiótico, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) para a variável CR (Tabela 11). A quantidade de ração ingerida por animal varia e depende da qualidade e do manejo aos quais as aves estejam sendo mantidas (Hassan; Komilus, 2020). Conforme mostrado na Tabela 11, os dados indicam que a inoculação de cepas de bactérias probióticas promoveram um maior consumo de ração entre os patos crioulos, embora não tenham sido observadas diferenças significativas.

Resultados de estudos realizados pelos pesquisadores Abou-Elnaga *et al.* (2018) com a utilização de um probiótico comercial Proact à base de *B. subtilis*: $1,75 \times 10^{12}$ e *B. lincheniformis* $1,75 \times 10^{12}$ obtiveram resultados positivos aos 70 dias de experimento com diferenças significativas ($p < 0,05$) para a variável ganho de peso com suplementação de 0,75 e 100 g de Proact/kg de ração.

Para o GP, também não foi possível observar resultados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) aos 70 dias. Para CA no mesmo período observa-se efeito significativo ($p < 0,05$) entre o tratamento controle em comparação aos demais. A menor conversão foi mantida no controle e T2 que foram inoculados por *E. lactis*, seguidos por T4 e T3. Percebe-se, portanto, que houve melhora nos grupos inoculados com cepas probióticas, provavelmente devido a eficiência dos processos de digestão e absorção de nutrientes na presença dessas cepas a nível intestinal (Hassan; Komilus, 2020).

O TGI é o local que pode afetar a viabilidade das células BAL. Grande parte das BAL não sobrevive em baixo pH (Lin *et al.*, 2006). A tabela 12, mostra os dados da fase de terminação do experimento, onde pode-se observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os tratamentos em todas as variáveis analisadas. O menor consumo de ração ($p < 0,05$) foi alcançado pelas aves que tiveram inoculação por *E. faecium*. Porém, o melhor ganho de peso, ficou com o tratamento controle, sem inoculação de cepas probióticas e os tratamentos T2, T3 e T4, não diferiram entre si ($p > 0,05$) para GP. Avaliando a variável CA, percebe-se também que o tratamento controle obteve o menor valor, comparativamente aos tratamentos com inoculação de solução probiótica.

Tabela 12 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas¹ fase terminação (71 a 90 dias)

Fase	Variáveis ²	Probióticos				p-valor ⁴	CV ⁵ , %
		(T1) Controle	(T2) <i>E. lactis</i> ³	(T3) <i>E. ratti</i>	(T4) <i>E. faecium</i>		
Terminação	CR	2,71 ^b	2,83 ^a	2,76 ^b	2,55 ^c	0,05	6,84
	GP	1,00 ^a	0,74 ^b	0,78 ^b	0,71 ^b	0,05	2,44
	CA	2,71 ^c	3,82 ^a	3,54 ^b	3,59 ^b	0,05	2,55

¹ Todos os dados representam a média de 24 repetições (patos) por tratamento.

² CR = Consumo de ração (g/ave). GP = Ganho de peso (g/ave). CA = Conversão alimentar (g/ave).

³ E. = *Enterococcus*.

⁴ As médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Não significativo = $p > 0,05$.

⁵ CV = Coeficiente de variação

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Tabela 13 - Desempenho de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas¹ durante todo o experimento (1 a 90 dias)

Fase	Variáveis ²	Probióticos				p-valor ⁴	CV ⁵ , %
		(T1) Controle	(T2) <i>E. lactis</i> ³	(T3) <i>E. ratti</i>	(T4) <i>E. faecium</i>		
Geral	CR	8,65	8,90	8,69	8,77	0,71	2,99
	GP	3,10 ^a	2,81 ^b	2,75 ^b	2,72 ^b	0,05	11,77
	CA	2,80 ^b	3,17 ^a	3,16 ^a	3,22 ^a	0,05	13,40

¹ Todos os dados representam a média de 24 repetições (patos) por tratamento.

² CR = Consumo de ração (g/ave). GP = Ganho de peso (g/ave). CA = Conversão alimentar (g/ave).

³ E. = *Enterococcus*.

⁴ As médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). Não significativo = p>0,05.

⁵ CV = Coeficiente de variação

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Ao final dos 90 dias foi observado que a inoculação das bactérias ácido lácticas nos patos crioulos não influenciaram significativamente (p>0,05) o consumo de ração (Tabela 13). Esses resultados podem ser explicados porque as bactérias ácido lácticas são aditivos cujo mecanismo de ação é o equilíbrio da composição da microbiota do trato digestivo. Outro fator que pode ser atribuído é o conteúdo energético e protéico da ração para os tratamentos, que foram os mesmos, consequentemente, o consumo não foi afetado estatisticamente (p>0,05).

Roieski *et al.* (2023) obtiveram resultados contrários aos resultados dessa pesquisa, quando utilizaram probiótico a base de *Lactobacillus*, via gavagem, em frangos de corte desafiados com *E. coli* patogênica para aves (APEC), onde o tratamento com o probiótico teve efeito significativo (p<0,05) sobre as variáveis CR e GP.

No geral, os dados indicam que o maior ganho de peso (p<0,05) foi encontrado no tratamento controle e que os demais tratamentos com a concentração probiótica de $1,5 \times 10^8$ de *E. lactis*, *E. ratti* e *E. faecium*, respectivamente, não tiveram diferença significativa (p>0,05). Esses resultados são diferentes dos encontrados por Lokapirnasari *et al.* (2022), que em seus estudos utilizando probiótico contendo *L. casei*, *L. lactis* e *Bifidobacterium* spp., associados a extrato de *M. oleifera* na dieta de patos indonésios, obtiveram resultados positivos para ganho de peso na concentração de $1,2 \times 10^9$ de probióticos. Porém, semelhantes aos de Khattab *et al.* (2021) com suplementação de dietas de patos de pequim com probióticos *L. acidophilus*, onde não houve diferença significativa com os probióticos visando melhorar o desempenho de crescimento.

A conversão alimentar (CA) de todo o experimento obteve diferença significativa (p<0,05) entre o tratamento controle frente aos tratamentos propostos, porém, não teve diferença (p>0,05) entre os tratamentos de aves inoculadas. Os tratamentos com inoculação de

cepas de probióticos nos patos, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre si. A CA é influenciada por diversos fatores, que incluem a digestibilidade, qualidade e conteúdo nutricional das dietas das aves, além do ambiente e genética (Lokapirnasari *et al.*, 2022).

5.2.2 Rendimento de carcaça e parâmetros sanguíneos

Os *Enterococcus* de acordo com Royan (2018) são capazes de melhorar o desempenho e crescimento das aves (Lan *et al.*, 2017; Al-Khalaifah, 2018). Nossos resultados revelaram que as BAL isoladas do TGI de patos crioulo são pertencentes ao grupo *Enterococcus* e com base nos estudos *in vitro*, as BAL identificadas apresentaram alta resistência a pH ácido (Sandi *et al.*, 2019).

Analisando o peso ao abate dos patos ao final dos 90 dias de experimento (Tabela 14), percebe-se variação entre os tratamentos, com diferença significativa ($p<0,05$) nessa variável analisada. Muito embora o tratamento controle tenha obtido dados substanciosos, o que melhor respondeu ao abate, foi o tratamento inoculado com cepas de *E. ratti* (T3), seguido pelo controle e depois, pelos tratamentos que foram inoculados com *E. lactis* (T2) e *E. faecium* (T4), sendo ligeiramente idênticos. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Alkhalf *et al.* (2010) e Thomas *et al.* (2015), onde relataram que ocorreu efeito benéfico com a suplementação com probiótico, melhorando o peso corporal das aves.

Tabela 14 - Rendimento de carcaça de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas¹ durante todo o período experimental

Análise	Variáveis ²	Probióticos				p-valor ⁴	CV ⁵ , %
		(T1) Controle	(T2) <i>E. lactis</i> ³	(T3) <i>E. ratti</i>	(T4) <i>E. faecium</i>		
Rendimentos de carcaça	PA	3,01 ^{ab}	2,98 ^{ab}	3,10 ^a	2,81 ^b	0,03	6,09
	RC	87,40	87,96	88,02	91,15	0,39	4,62
	PT	91,33	91,66	91,33	87,66	0,43	5,22
	FI	38,66	41,33	40,66	38,33	0,72	13,12
	MO	73,66 ^b	80,66 ^a	75,00 ^b	72,66 ^b	0,05	8,68
	CO	22,33	21,33	22,33	20,33	0,52	12,21
	PC	2,70 ^b	3,13 ^a	2,76 ^b	2,66 ^b	0,05	5,24

¹ Todos os dados representam a média de 8 repetições (patos) por tratamento.

² PA = Peso de abate (kg/ave). RC = Rendimento de carcaça (%). PT = Patas (g). FI = Fígado (g). MO = Moela (g). CO = Coração (g). PC = Pâncreas (g).

³ E. = *Enterococcus*.

⁴ As médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Não significativo = $p>0,05$.

⁵ CV = Coeficiente de variação

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

A combinação de bactérias probióticas com os ingredientes alimentares presentes nas rações experimentais pode ter contribuído para melhorar a viabilidade dos microrganismos no trânsito gástrico, levando a maior sobrevivência a nível de TGI (Huang; Adams, 2004).

Os efeitos favoráveis das BAL no peso ao abate, do tratamento T3 se mostraram superiores ao controle T1, ao T2 e ao T4 indicando que pode ter havido aumento da atividade das enzimas digestivas intestinais e melhor absorção de nutrientes no TGI, concordando com os encontrados por Gheisar *et al.* (2016) e Park *et al.* (2016).

Os dados remetem que as BAL isoladas de patos domésticos, favoreceram o peso ao abate (PA) com resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre o controle e os tratamentos com probióticos, mas que poderiam ser melhorados com o uso de um consórcio dessas bactérias, devido a elas possuírem sinergismo, sendo mais benéfico do que utilizar cada tipo separadamente.

Conforme evidenciado na Tabela 14, em relação ao PA, indica que essa variável apresentou tendência linear positiva com a inoculação das bactérias ácido lácticas com potencial probiótico, nos patos crioulo, e podem ser comparados aos resultados encontrados por Pourakbari *et al.* (2016). Yosi *et al.* (2020) também tiveram peso vivo de patos Pegagan afetados positivamente ($p < 0,05$) pelos tratamentos de BAL, de acordo com o nível de concentração, ocorrendo efeito notável quando os patos receberam 10^7 UFC/mL.

No rendimento de carcaça (RC) não foram obtidos resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$), porém, os resultados desse trabalho revelam que houveram aumentos graduais para essa variável, em comparação ao grupo controle, ao passo, que se inoculavam os probióticos nas aves, sendo os resultados de carcaça de todos os tratamentos cuja inoculação com cepas de bactérias ácido lácticas autóctones foi realizada, maiores, indicando que essas bactérias foram capazes de aumentar o peso e percentual das carcaças de patos crioulo em confinamento. Esses dados são superiores ao encontrados Wawro *et al.* (2004) que obteve 74% de rendimento de carcaça em suas aves experimentais.

Abou-Elnaga *et al.* (2018) e Weis e Hrnýár (2013) e Hassan *et al.* (2015) também relataram, não haver diferença significativa em todas as características da carcaça quando as aves foram suplementadas com probióticos. Sihite e Pramono (2022) obtiveram resultados diferentes estatisticamente em comparação a este estudo, onde os autores não observaram o efeito ($p < 0,05$) de uma mistura de probióticos de *S. thermophilus* e *B. cereus* fornecidos em água, sobre o peso ao abate, de patos de Megelang.

Os resultados dos tratamentos que receberam os probióticos, alcançando números mais elevados do RC em relação ao grupo controle, evidencia que as BAL inoculadas deram

resultado positivo em relação ao rendimento de carcaça (Kalavathy *et al.*, 2003; Pelicano *et al.*, 2008), que também obtiveram resultados semelhantes. Ardiansah *et al.* (2020) encontraram efeito estatístico ($p < 0,05$) ao fornecer probiótico em pó e encapsulado para patos locais indonésios, sobre o rendimento de carcaça. A suplementação de bactérias probióticas pode ter colaborado para aumentar a disponibilidade de proteína desse estudo.

Ainda na tabela 14 dos resultados desse estudo, mostra que houveram diferenças significativas ($p < 0,05$) para o peso relativo de órgãos internos como a moela (MO) e o pâncreas (PC), de patos inoculados com cepas na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, semelhante aos dados encontrados por Zhang *et al.* (2012), que supõem que a concentração e as cepas de BAL são cruciais e devem ser consideradas para alcançar desempenho ideal de crescimento.

A análise estatística do peso da moela e pâncreas teve efeito ($p < 0,05$) entres os tratamentos, indicando que a inoculação com as cepas probióticas estimularam esses órgãos internos, diferente dos resultados encontrados por Ardiansah *et al.* (2020) que não obtiveram resultados significativos para os mesmos órgãos, em seu estudo e diferentes dos achados por Midilli *et al.* (2008) que relataram que não houve impacto significativo no peso relativo da moela com o uso de probióticos em frangos de corte. Alguns fatores podem afetar o peso da moela, como raça, genética, idade, sexo e consumo de ração. Além disso, alimentar aves com quantidade maior de ração do que a necessária causa digestão extra e afeta o tamanho desse órgão devido ao espessamento do músculo (Tuli *et al.*, 2014).

Os dados deste estudo corroboram com os de Park e Kim (2014), onde o peso relativo de alguns órgãos internos, como fígado e coração não foram afetados ($p > 0,05$) pela administração de *B. subtilis*.

Sabe-se que o fígado das aves exerce várias funções metabólicas e homeostáticas, que desempenham um papel importante na digestão e metabolismo, estabilizando a produção de carboidratos, proteínas e lipídios (Denbow, 2015).

Muito embora os dados não tenham sido estatisticamente diferentes, percebe-se que as aves que foram inoculadas com *E. lactis* (T2), *E. ratti* (T3) tiveram os maiores pesos de fígado em comparação aos demais e esses dados estão de acordo com estudos prévios com o uso de probióticos onde foi observado o mesmo comportamento sobre o peso do fígado (Reuben *et al.*, 2022).

Esse entendimento sobre a correlação da utilização de um probiótico e o aumento do fígado não está bem elucidada, mas Sharma *et al.* (2022) verificaram que em ratos, a administração de *L. casei* e *B. bifidum*, causou aumento do glicogênio no fígado, devendo, portanto, ser a causa do maior crescimento do órgão.

O uso de BAL como probióticos na produção avícola tem recebido muita atenção devido à sua capacidade de crescer bem em condições gástricas adversas e fornecer efeitos benéficos, como melhor desempenho de crescimento e resistência a patógenos intestinais (El-Sawah *et al.*, 2020).

Ao se avaliar a tabela 15, onde estão apresentados os dados de cortes comerciais dos patos, percebe-se que para as variáveis PES, COX, PEI e DOR houve diferença significativa ($p < 0,05$). Nessa tabela constata-se que os patos crioulos submetidos ao *E. faecium* (T4) apresentaram maior ($p < 0,05$) rendimento de peito.

Tabela 15 - Rendimentos de cortes comerciais de patos crioulo em confinamento inoculados com diferentes cepas de bactérias ácido lácticas¹ durante todo o período experimental

Análise	Variáveis ²	Probióticos				p-valor ⁴	CV ⁵ , %
		(T1) Controle	(T2) <i>E. lactis</i> ³	(T3) <i>E. ratti</i>	(T4) <i>E. faecium</i>		
Cortes comerciais	PES	11,21 ^a	10,49 ^b	9,19 ^c	8,91 ^c	0,03	13,79
	ASA	16,31	16,61	17,03	16,67	0,71	6,21
	COX	13,07 ^a	12,66 ^b	9,84 ^c	11,59 ^b	<0,01	14,96
	SBC	9,20	8,91	10,74	9,27	0,23	17,62
	PEI	24,72 ^c	24,67 ^c	25,42 ^b	27,49 ^a	0,04	13,16
	DOR	25,49 ^c	26,66 ^b	27,78 ^a	26,07 ^b	0,05	8,81

¹ Todos os dados representam a média de 8 repetições (patos) por tratamento.

² PES = rendimento de pescoço (%). ASA = rendimento de asas (%). COX = rendimento de coxas (%). SBC = rendimento de sobrecoxas (%). PEI = rendimento de peito (%). DOR = rendimento de dorso (%).

³ E. = *Enterococcus*.

⁴ As médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Não significativo = $p > 0,05$.

⁵ CV = Coeficiente de variação

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Nos resultados dos parâmetros bioquímicos séricos dos patos crioulo em alojamento (Tabela 16), foram observados efeitos significativos ($p < 0,05$) do uso de BAL como probióticos em todas as variáveis analisadas, onde os patos do grupo controle apresentaram maior ($p < 0,05$) valores de concentração de proteína total, enquanto os grupos suplementados com BAL como probióticos tiveram valores reduzidos e semelhantes entre si, variando de 0,31 a 0,32 g.dL⁻¹.

Isto sugere que a suplementação com BAL pode ter reduzido os níveis de proteína total em comparação com o grupo de controle, o que pode estar relacionado com as suas próprias propriedades, que incluem melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal e melhorar a função da barreira intestinal (Haghighi *et al.*, 2005; Gaggia *et al.*, 2010). Ao fazê-lo, podem facilitar uma melhor absorção e utilização de nutrientes, conduzindo potencialmente a metabolismo

proteico mais eficiente, resultando em níveis circulantes mais baixos de proteína total, uma vez que o corpo pode estar a utilizar proteínas de forma mais eficaz para processos fisiológicos, em vez de permitir que se acumulem no organismo e corrente sanguínea (Gaggia *et al.*, 2010).

Tabela 16 - Parâmetros bioquímicos séricos de patos crioulo em confinamento inoculados com cepas de bactérias ácido lácticas autóctones como aditivos probióticos¹

Variáveis	Probióticos				valor p ³	CV ⁴ , %
	(T1) Controle	(T2) <i>E. lactis</i> ²	(T3) <i>E. ratti</i>	(T4) <i>E. faecium</i>		
Proteínas totais, g.dL ⁻¹	0,46 ^a	0,31 ^b	0,32 ^b	0,32 ^b	0,05	6,22
Triglicerídeos, mg.dL ⁻¹	71,25 ^b	59,07 ^c	74,71 ^b	100,87 ^a	0,05	5,23
Glicose, mg.dL ⁻¹	165,83 ^b	158,95 ^c	163,61 ^b	174,90 ^a	0,05	7,15
Colesterol, mg.dL ⁻¹	124,87 ^b	109,47 ^c	101,32 ^c	149,60 ^a	0,05	3,07
Albumina, mg.dL ⁻¹	2,48 ^b	2,51 ^b	1,82 ^c	3,11 ^a	<0,01	2,46

¹Todos os dados representam a média de 24 réplicas (patos crioulo) por tratamento.

²E. = *Enterococcus*.

³Médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

⁴CV = Coeficiente de variação

Fonte: Maquiné, L.C. (2024)

Por outro lado, os patos crioulos do controle submetidos a *E. faecium* apresentaram maiores (p<0,05) concentrações de triglicerídeos, glicose, colesterol e albumina, sugerindo que a suplementação de *E. faecium* pode ter efeitos metabólicos distintos sobre esses parâmetros bioquímicos séricos em patos domésticos. *E. faecium* é um tipo de bactéria ácido láctica comumente usada como probiótico na nutrição animal (El-Sawah *et al.*, 2020).

Embora as BAL sejam geralmente reconhecidas pelos seus efeitos benéficos na saúde intestinal e no bem-estar geral, as alterações metabólicas observadas no grupo de controle levantam questões sobre as interações específicas entre *E. faecium* e vias metabólicas em patos crioulos (Alagawany *et al.*, 2018; El-Sawah *et al.*, 2020).

Uma explicação potencial para o aumento dos níveis de triglicerídeos, glicose, colesterol e albumina poderia ser alterações na absorção, metabolismo ou utilização de nutrientes induzidas pela suplementação de *E. faecium*.

Os probióticos podem influenciar a composição e atividade da microbiota intestinal, o que por sua vez pode impactar a absorção e o metabolismo de nutrientes (Butel, 2014; El-Sawah *et al.*, 2020). Mudanças na composição da microbiota intestinal podem potencialmente levar ao aumento da absorção de triglicerídeos, glicose e colesterol da dieta, contribuindo para níveis séricos elevados destes compostos (Didari *et al.*, 2014; Alagawany *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

Das 300 BAL selecionadas para o estudo, nove foram capazes de resistir aos tratamentos propostos, porém somente oito cepas foram identificadas por técnicas moleculares. Todas tiveram redução da viabilidade nos testes de triagem, dentro do esperado e, foram capazes de prosseguir para testes *in vivo*.

As cepas probióticas estudadas, são caracterizadas como probióticas autóctones, sendo compatíveis e, apresentando ação sinérgica para a formulação de um consórcio, o que pode servir como um adjuvante potencial para aumentar a saúde intestinal de patos domésticos. Porém estudos adicionais visando esclarecer os mecanismos moleculares de probiose e os efeitos dessas linhagens *in vivo* devem ser realizados para o desenvolvimento de probióticos eficazes para a espécie hospedeira alvo.

O uso de BAL autóctones como probióticos nas dietas dos patos crioulos teve efeitos variados ao longo dos estágios de crescimento, indicando interações complexas com a fisiologia aviária. Embora não tenham sido observados impactos significativos no consumo de ração e no ganho de peso durante a fase inicial, a conversão alimentar foi comprometida. O rendimento de carcaça das aves inoculadas, foi superior quando utilizado *E. faecium*.

Resultados variados foram observados nos estágios de crescimento e terminação para consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar, sugerindo que a cepa e os fatores ambientais influenciam a eficácia dos probióticos. Algumas cepas, como *E. lactis*, melhoraram a conversão alimentar e as características da carcaça, enquanto o *E. faecium* afetou os parâmetros bioquímicos séricos. Estas descobertas destacam a necessidade de seleção de probióticos específicos para cepas e de mais pesquisas para otimizar as estratégias de suplementação de probióticos para a produção de patos domésticos.

7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A.E. *et al.* Effect of *in ovo* inoculation of *Bifidobacterium* spp. on growth performance, thyroid activity, ileum histomorphometry, and microbial enumeration of broilers. **Probiotics Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 873-882, 2020. DOI: 10.1007/s12602-019-09613-x.
- ABOU-ELNAGA, M.K. *et al.* Growth performance, blood parameters and intestinal morphology of molar ducklings fed diets supplemented with probiotics. **Egyptian Journal Nutrition and Feeds**, v. 21, n. 3, p. 847-861, 2018. DOI: 10.21608/ejnf.2018.75823.
- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - **ABPA RELATÓRIO ANUAL 2024**. [s.l:s.n]. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual-2024_capa_frango.pdf. Acesso: 13 de junho de 2024.
- ABREU, P.G. *et al.* Sistemas de aquecimento para criação de aves. Concórdia: Embrapa-CNPISA. **Circular Técnica**, 2004. 35p.
- AGUIHE, P.C. *et al.* Effect of dietary probiotic supplementation on carcass traits and haematological responses of broiler chickens fed shea butter cake based diets. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 39, p. 265-271, 2017.
- AHMED, F.A.M. Early feed restriction can affect the behavior and welfare of mule ducks. **PSM Veterinary Research**, v. 7, p. 43-54, 2021.
- AHMED. Z. *et al.* Antimicrobial role of *Lactobacillus* species as potential probiotics against enteropathogenic bacteria in chickens. **The Journal on Infection in Developing Countries**, v. 13, p. 130-136, 2019.
- AKINYEMI, F.T. *et al.* Dynamic distribution of gut microbiota during embryonic development in chicken. **Poultry Science**, v. 99, n. 10, p. 5079-5090, 2020. DOI: 10.1016/j.psj.2020.06.016.
- ALAGAWANY, M. *et al.* The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10611-10618, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-1687-x.
- ALEXANDRINO, S.L. *et al.* Microbiota intestinal e os fatores que influenciam na avicultura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 6, e87963098, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i6.3098.
- Al-HUSSINI, H.S. *et al.* Biological control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum* by using native antagonistic rhizobacteria isolated from Omani soil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 315-322, 2019. DOI: 10.1007/s42161-018-0184-x.
- AL-KHALAIFAH, H.S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. **Poultry Science**, v. 97, p. 3807-3815, 2018. DOI: 10.3382/ps/pey160.

ALKHALF, A.; ALHAJ, M.; AL-HOMIDAN, I. Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 219-225, 2010.

ALMEIDA, E.C. **Caracterização fenotípica e produtiva de galinhas e patos do estado da Bahia**. 2016. 88 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANGELAKIS, E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 162-170, 2017. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.11.002.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 2, p. 223-232, 2004. DOI: 10.1079/WPS200415.

ARDIANSAH, I.; SHOLIHA, K.; SJOFJAN, O. Dietary supplementation of powdered and encapsulated probiotic: *In vivo* study on relative carcass, giblet weight and intestinal morphometry of local duck. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 42, n. 1, e47140, 2020. DOI: 10.4025/actascianimsci.v42i1.47140.

ARIAS-SOSA, L.A; ROJAS, A.L. A review on the productive potential of the Muscovy Duck. **World's Poultry Science Journal**, v. 77, n. 3, p. 565-588, 2021. DOI: 10.1080/00439339.2021.1921668.

ARIDE, P.H.R. *et al.* Changes on physiological parameters of tambaqui (*Colossoma macopomum*) fed with diets supplemented with Amazonian fruit Camu camu (*Myrciara dubia*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 360-367, 2018. DOI: 10.1590/1519-6984.169442.

ARORA, M.; BALDI, A. Regulatory categories of probiotics across the globe: A review representing existing and recommended categorization. **Indian Journal Medicine Microbiology**, v. 33, p. 2-10, 2015. DOI: 10.4130/0255-0857.1508686.

ARREDONDO-ALONSO, S. *et al.* Plasmids shaped the recent emergence of the major nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. **American Society for Microbiology**, v. 11, p. 3219-03284, 2020. DOI: 10.1128/mBio.03284-19.

ARREGUIN-NAVA, M.A. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria probiotic culture candidates for the treatment of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in neonatal turkey poults. **Animais**, v. 9, n. 696, p. 1-10, 2019. DOI: 10.3390/ani9090696.

AVICULTURA INDUSTRIAL. Carne de pato está em plena valorização, mas faltam criadores em Minas. 2016. Disponível em: [http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/Carne de pato está em plena valorização, mas faltam criadores em Minas/201620061112105_16545](http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/Carne%20de%20pato%20est%C3%A1%20em%20plena%20valoriza%C3%A7%C3%A3o,%20mas%20faltam%20criadores%20em%20Minas/201620061112105_16545). Acesso em: 2 de maio de 2022.

BAHULE, C.E.; SILVA, T.N.S. Probiotics as a promising additive in broiler feed: Advances and limitations. In: PATRA, A.K. (Ed.). **Advances in Poultry Nutrition Research**. [S.l.]: IntechOpen, p. 1-16, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.97957.

BAJAJ, B.K.; CLAES, I.J.J.; LEBEER, S. Functional mechanisms of probiotics. **Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 4, p. 321-327, 2015. DOI: 10.15414/jmbfs.2015.4.4.321-327.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.09.003.

BERNARDEAU, M. *et al.* Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal Food Science Technology**, v. 54, p. 2570-2584, 2017. DOI: 10.1007/s13197-017-2688-3.

BHASKARAM, P. Immunobiology of mild micronutrient deficiencies. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 75-80. 2001.

BISWAS, S. *et al.* Probiotic mixture (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) a potential in-feed additive to improve broiler production efficiency, nutrient digestibility, caecal microflora, meat quality and to diminish hazardous odour emission. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 107, n. 4, p. 1065-1072, 2023. DOI: 10.1111/jpn.13784.

BLACK, J.G.; BLACK, L.J. **Microbiology: Principle and Exploration**, ed 10. John Wiley & Son, New York, 2018.

BLAJMAN, J.E. *et al.* Probiotics and broiler growth performance: a meta-analysis of randomised controlled trials. **British Poultry Science**, v. 55, n. 4, p. 483-494, 2014. DOI: 10.1080/00071668.2014.931930.

BOKHARI, D.M. *et al.* Probiotic characterization of the *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract of poultry in Pakistan. **Pakistan Journal of Agriculture Science**, v. 54, n. 4, p. 881-886, 2017.

BONILLA, O.; DÍAZ, O. Elementos básicos para el manejo de animales de granja: Módulo de aves. San José: C.R.: EUNED, 1988.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Diretrizes para a prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília: MCTI, 2013.

BRYDEN, W.L. *et al.* Nutrition, feeding and laying hen welfare. **Animal Production Science**, v. 61, p. 893-914, 2021. DOI: 10.1071/AN20396.

BUTEL, M-J. Probiotics, gut microbiota and health. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 1, p.1-8, 2014. DOI: 10.1016/j.medmal.2013.10.002.

BILLY, H. *et al.* Composições, formulações probióticas e métodos para promover a digestão e melhorar a nutrição em aves. **Patente** US 10.959.447, de 26 de jun. de 2018.

- CAMPBELL, T.W. Hematologia das aves. In: THRALL, M.A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 19, p. 507-586. 2015.
- CAO, G.T. *et al.* Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. **Poultry Science**, v. 92, p. 2949-2955, 2013.
- CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 16, n. 1, p. 71-120, 2013.
- CARRASCO, J.M.D.; CASANOVA, N.A.; MIYAKAWA, M.E.F. Microbiota, gut health and chicken productivity: What is the connection? **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 1-15, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7100374.
- CEAN, A. *et al.* Effect of human bactérias probióticas isoladas na prevenção da colonização de aves por *Campylobacter jejuni*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, p. 122-130, 2015.
- CELI, P. *et al.* Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88-100, 2017. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.09.012.
- CHARTERIS, W.P. *et al.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.
- CHEN, Y.S. *et al.* Isolation and characterization of lactic acid bacteria from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems), a traditional fermented food in Taiwan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 125-132, 2013.
- CHICHLOWSKI, M. *et al.* Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: A brief review of current knowledge. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 10, p. 694-704, 2007. DOI: 10.3923/ijps.2007.694.704.
- CHOUDHARI, A.; SHINDE, S.; RAMTEKE, B.N. Prebiotics and probiotics as health promoter. **Veterinary World**, v. 1, p. 59-61, 2008.
- CHOWDHURY, M.A.H. *et al.* Current and future interventions for improving poultry health and poultry food safety and security: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 3, p. 1555-1596, 2023. DOI: 10.1111/1541-4337.13121.
- CHRISTOFOLI, M. *et al.* Microbiota intestinal benéfica e prejudicial na avicultura: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e43973667, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i7.3667.
- CLEMENTS, J.F. *et al.* The Clements check list of Birds of the World: Version 6.9; Cornell: Cornell University Press, 2016.

CLIMATE-DATA.ORG: CLIMA: MANAUS. Disponível em:
<https://pt.climatedata.org/location/26632/>. Acesso em: 16 de maio de 2022.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S26. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30 ed. Wayne: CLSI, 256 p, 2020.

COMAN, M.M. *et al.* Antimicrobial activity of SYN BIO® probiotic formulation in pathogens isolated from chronic ulcerative lesions: *in vitro* studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 584-597, 2020. DOI: 10.1111/jam.14482.

CONTINI, J.P. **Óleos funcionais em dietas de frangos de corte, matrizes e progênie**. 2016. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, PR: UFPR, 2016.

COSTA, W.R. **Planos nutricionais com diferentes níveis de fósforo disponível na alimentação fásica de patos crioulos (*Cairina moschata domesticus*) e confinamento**. 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

CRUZ, C.D. Programa Genes - Diversidade Genética. 1st ed. Viçosa: UFV, 2008.

CUNHA, V.M.; JUNIOR, J.S. Criação de marrecos. Viçosa: **Centro de Produções Técnicas (CPT)** Multimídia, 2009.

DAIPRA, M.A. *et al.* Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1189-1194, 2009.

DENBOW, D.M. Gastrointestinal anatomy and physiology. *In: Sturkie's Avian Physiology*. [s.l.] Elsevier, p. 337-366, 2015. DOI: 10.1016/B978-012747605-6/50013-4.

DIDARI, T. *et al.* A systematic review of the safety of probiotics. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 13, n. 2, p. 227-239, 2014. DOI: 10.1517/14740338.2014.872627.

DIPEOLU, M. *et al.* Comparison of effects of antibiotics and enzyme inclusion in diets of laying birds. **Archivos de zootecnia**, v. 54, p. 11, 2005. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00191-0.

DOMINGOS-LOPES, M.F. *et al.* Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178-190, 2017.

DONG, S. *et al.* Improving quality of poultry and its meat products with probiotics, prebiotics, and phytoextracts. **Poultry Science**, v. 103, n. 2, p. 1-18, 2024. DOI: 10.1016/j.psj.2023.103287.

DORR, T.; MOYNIHAN, P.J.; MAYER, C. Bacterial cell wall structure and dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, art. 2051, p. 1-4, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02051.

DOWARAH, R.; VERMA, A.K.; AGARWAL, N. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2017. DOI: 10.1016/j.aninu.2016.11.002.

DRUMOND, E.S.C. *et al.* Curvas de crescimento para codornas de corte. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1872-1877, 2013.

DU, R. *et al.* Probiotics regulate gastrointestinal flora to improve meat quality research progress. **American Chemical Society**, v. 13, p. 2378-2385, 2019. DOI: 10.1021/acsenenergylett.9b01630.

ECKERT, N.H. *et al.* Influence of probiotic administration by feed or water on growth parameters of broilers reared on medicated and nonmedicated diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, p. 59-67, 2010. DOI: 10.3382/japr.2009-00084.

EIRAS, J.F. **Avicultura: Criação racional de pato regional, uma opção para a agricultura familiar**/ Jairo Fernandes Eiras - Marituba: EMATER-PA, 2023. 37p.

EL-MONEIM, A.E.-M.E.A. *et al.*; Assessment of *in ovo* administration of *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* on performance, ileal histomorphometry, blood hematological, and biochemical parameters of broilers. **Probiotics Antimicrobial Protein**, v. 12, n. 2, p. 439-450, 2020. DOI: 10.1007/s12602-019-09549-2.

EL-SAWAH, A.A. *et al.* Efficacy of probiotic *Enterococcus faecium* in combination with diclazuril against coccidiosis in experimentally infected broilers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 1020-1028, 2020. DOI: 10.1111/jam.14691.

EVANS, T. **Global poultry trends**. Ásia domina a produção de patos. O sítio avícola. Disponível em: <http://www.thepoultrysite.com/articles/3506/global-poultry-trends-asia-dominates-duck-production/>. Acesso em: 12 de maio de 2022.

FAO. Probiotics in animal nutrition. **In Physiological reviews**, v. 34, n. 1, 2016. DOI: 10.1152/physrev.1954.34.1.25.

FARIA, P.P. *et al.* Análises bioquímicas para frango de corte - revisão. **Nutri Time**, Revista Eletrônica. v. 18, n. 6, p. 9004-9014, 2021.

FEIJÓ, J.C. *et al.* Planos nutricionais com diferentes níveis de cálcio sobre o desempenho e rendimento de carcaça de patos (*Cairina moschata*) em confinamento. **Revista Científica de Avicultura e Suinocultura**, v. 2, n. 1, p. 11-20, 2016.

FEITOSA, T.J.O. *et al.* Microbiota intestinal das aves de produção: revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. e42952779, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i5.2779.

FERNANDES, J.I.M. *et al.* Avaliação de extratos de plantas sobre a resposta imune, o desempenho produtivo e a morfometria intestinal de frangos de corte desafiados com *Eimeria* sp. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 18, n. 1, p. 127-39, 2017.

FERREIRA, F.A.B.; KUSSUKAWA, K.C.K. Uso de probiótico na alimentação de frango de corte. **Biociência & Desenvolvimento**, p. 40-43, 2008.

IORE, E.; VAN TYNE, D.; GILMORE, M.S. Pathogenicity of Enterococci. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, p. 189–211, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018.

FONTANA, L. *et al.* Fontes, isolamento, caracterização e avaliação de probióticos. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. S35-S50, 2013.

FRAGA, K.B. **Descrição morfológica, análise parasitológica e histológica do intestino do carcará (*Caracara plancus*, Miller, 1777)**. 2013. 53 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2013.

FRANZ, C.M. *et al.* Enterococci as probiotics and their implication in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 125-140, 2011.

FREITAS NETO, O.C. *et al.* Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n.1, p. 01-11, 2010.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141 Suppl 1, p. S15-28, 2010.

GÁMEZ, H.J.; ARGOTI, C.F. Determinación del efecto probiótico *in vitro* de *Lactobacillus gasseri* sobre una cepa de *Staphylococcus epidermidis*. **Biosalud-Revista Ciencias Básicas**, v. 16, n. 2, p. 53-69, 2017. DOI: 10.17151/biosa.2017.16.2.6.

GARCIA, E.F. *et al.* Avaliação do cultivo de *Lactobacillus* isolados de resíduos do processamento de frutas em meio de fermentação geral (MFG). **Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos**, v. 2, 2015.

GHAREEB, K. *et al.* Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, p. 1825-1832, 2012. DOI: 10.3382/ps.2012-02168.

GHEISAR, M.M.; HOSSEINDOUST, A.; KIM, I.H. Effects of dietary *Enterococcus faecium* on growth performance, carcass characteristics, faecal microbiota, and blood profile in broilers. **Veterinária Medicina**, v. 61, p. 28-34, 2016. DOI: 10.17221/8680-VETMED.

GIANG, H.H. *et al.* Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. **Livestock Science**, v. 143, p. 132-141, 2012. DOI: 10.1016/j.livsci.2011.09.003.

GOIS, F.D. *et al.* Estudo preliminar sobre o dimorfismo sexual do pato cinza do catolé (*Cairina moschata*). **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal - AICA**, p. 95-98, 2012.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. **Tecnologia de abate e Tipificação de Carcaças**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2012.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. (Eds): **Anais do primeiro Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 73-89, 2003.

GOLDENFARB, P.B. *et al.* Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971. DOI: 10.1093/ajcp/56.135.

GRIMAUD FRERES. **Guide d'élevage Canedins a rôtir**. Roussay, France: Grimaud Frères Sélection, 2001.

GRIMAUD FRERES SELECTION. **Rearing Guide: Muscovy Ducks**. France, 2016.

HAGHIGHI, H.R. *et al.* Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, p. 1387-1392, 2005.

HANCHI, H. *et al.* The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concern-an update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-16, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01791.

HARIMURTI, S.; HADISAPUTRO, W. Probiotics in poultry. In: **Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas**, Springer, p. 1-19, 2015.

HASSAN, I.M.H. *et al.* Effect of probiotic feeding on the performance of broiler ducks fed different levels of protein. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 5, n. 3, p. 136-142, 2015.

HASSAN, N.A.S.; KOMILUS, C.F. Effects of probiotic (*Lactobacillus* spp) mixed with cassava leaves (*Manihot esculenta*) on growth performances and meat quality of cherry valley duck (*Anas platyrhynchos domesticus*). **Journal of Agrobiotechnology**, v. 11, 2020. DOI: 10.37231/jab.2020.11.1s.232.

HASSANEIN, R.A.M. *et al.* Detection and identification of *Salmonella* species in minced beef and chicken meats by using Multiplex PCR in Assiut city. **Veterinary World**, v. 4, n. 1, p. 5-11, 2011. DOI: 10.5455/vetworld.2011.5-11.

HAWAZ, E. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 1419-1425, 2014.

HE, T. *et al.* Effects of probiotics as antibiotics substitutes on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, and barrier function of broilers. **Animals**, v. 9, n. 11, 985, 2019. DOI: 10.3390/ani9110985.

HEJDYSZ, M. *et al.* A.The use of selected organic acids and their mixtures in broiler feeding. **Scientific Annals of Polish Society of Animal Production**, v. 8, p. 59-68, 2012.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39-51, 2013. DOI: 10.1177/1756283X12459294.

HERNANDEZ-PATLAN, D. *et al.* Impact of a *Bacillus* direct-fed microbial on growth performance, intestinal barrier integrity, necrotic enteritis lesions, and ileal microbiota in broiler chickens using a laboratory challenge model. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 108, 2019. DOI: 10.3389/fvets.2019.00108.

HERNANDEZ-PATLAN, D. *et al.* The use of probiotics in poultry production for the control of bacterial infections and aflatoxins [Internet]. Prebiotics and probiotics - **Potential Benefits in Nutrition and Health**. IntechOpen; 2020. DOI: 10.5772/intechopen.88817.

HIDAYAT, M.N. *et al.* Abdominal fat percentage and carcass quality of broiler given probiotics *Bacillus* spp. **Metabolism**, v. 22, p. 3-60, 2016.

HOSSAIN, M.T. *et al.* Comparative analysis between multi-strain probiotics and antibiotic as starter feed supplement of poultry on growth performance, serum metabolites and meat quality. **Veterinary and Animal Science**, v. 24, p. 1-7, 2024. DOI: 10.1016/j.vas.2024.100346.

HU, X.Q. *et al.* Identification and characterization of probiotic yeast isolated from digestive tract of ducks. **Poultry Science Association**, v. 97, p. 2902-2908, 2018.

HUANG, Y.; ADAMS, M.C. Avaliação *in vitro* da tolerância gastrointestinal superior de potenciais propionibactérias lácteas probióticas. **Jornal Internacional de Microbiologia Alimentar**, v. 91, p. 253-260, 2004.

HUANG, L. *et al.* Effects of the dietary probiotic, *Enterococcus faecium* NCIMB11181, on the intestinal barrier and system immune status in *Escherichia coli* O78-challenged broiler chickens. **Probiotics Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 946-956, 2018. DOI: 10.1007/s12602-018-9434-7.

HUSSEIN, E.O. *et al.* Efeitos de dietas suplementadas com antibióticos, probióticos e fitobióticos sobre o desempenho, saúde intestinal, características de carcaça e qualidade da carne de frangos de corte infectados por *Clostridium perfringens*. **Animals**, v. 10, p. 669, 2020.

HWANHLEM, N.; CHOBERT, J.M.; KITTIKUN, A.H. Bacteriocin-producing lact acidbacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: Isolation, screening and optimization. **Food Control**, v. 41, p. 202-211, 2014.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas, 2019. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnmbpcjpcglclefindmkaj/http://www.idam.am.gov.br/wp-content/uploads/2020/07/RAT-Produ%C3%A7%C3%A3o-Animal-4%C2%BA-Trim-2019.pdf. Acesso: 06 de jun. de 2024.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018). Ibge.gov.br. Acesso em: 15 de maio de 2022.

ISLAM, S. *et al.* The potentials of raising Muscovy duck (*Cairina moschata*) in Bangladesh-a review. **Bangladesh Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 8, n. 2, p. 216-224, 2020.

JAFARI, B.; REZAIE, A.; ALIZADEH, S. Isolation and identification of potentially probiotic bacteria from traditional dairy products of Ardabil region in Iran. **Annals of Biological Research**, v. 2, p. 311-317, 2011.

JAHROMI, M.F. *et al.* Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, p. 1099-1110, 2015. DOI: 10.1007/s00484-015-1103-x.

JALALUDEEN, A.; CHURCHIL, R.R.; BAÉZA, E. (EDS) Duck Production and Management Strategies. Singapore: **Springer Nature**, E-book, 2022. DOI: 10.1007/978-981-16-6100-6.

JENI, R.E. *et al.* An overview of health challenges in alternative poultry production systems. **Poultry Science**, v. 100, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101173.

JHA, R. *et al.* Probiotics (Direct-Fed Microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: A systematic review. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1863, 2020. DOI: 10.3390/ani10101863.

JIANG, T. *et al.* Administração oral de probióticos em aves com comprimidos sensíveis ao pH. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 567-576, 2017.

JUNIOR, M.C. *et al.* Constituintes sanguíneos de vacas da raça holandesa alimentadas com silagens de milho ou de capim-elefante. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 429-438, 2010.

JÚNIOR, D.G.M. *et al.* Prevalência de helmintos em patos domésticos *Cairina moschata dom.* (Linné) (Anseriformes, Anatidae, Cairinini, *Cairina*) provenientes de criações extensivas no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista brasileira de ciência veterinária**, v. 15, n. 3, p. 140-142, 2008.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunological Cell Biology**, v. 78, p. 80-88, 2000. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x.

KALAVATHY, R. *et al.* Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, n. 1, p. 139-144, 2003. DOI: 10.1080/0007166031000085445.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6th ed., San Diego: Academic Press, 2008. 928p.

KANT, R.; PALVA, A.; OSSOWSKI, I. An *in silico* pan-genomic probe for the molecular traits behind *Lactobacillus ruminis* gut autochthony. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. 1-26, 2017.

KARIMI TORSHIZI, M.A. *et al.* Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. **British Poultry Science**, v. 51, n. 2, p. 178-184, 2010. DOI: 10.1080/00071661003753756.

KARIMI TORSHIZI, M.A. *et al.* Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. **The Asian-Australasian Journal Animal Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1495-1500, 2008.

KEAR, J. Ducks, geese, and swans. Oxford: 2ed. **Oxford University Press**, 2005.

KERS, J.G. *et al.* Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00235.

KHALIQUE, A. *et al.* Probiotics mitigating subclinical necrotic enteritis (SNE) as potential alternatives to antibiotics in poultry. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 50, 2020. DOI: 10.1186/s13568-020-00989-6.

KHAN, S. *et al.* The gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 13, p. 1-18, 2020. DOI: 10.1128/AEM.00600-20.

KHATTAB, A.A.A. *et al.* Dietary probiotics as a strategy for improving growth performance, intestinal efficacy, immunity, and antioxidante capacity of White Pekin ducks fed with diferente levels of CP. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, p. 100898, 2021. DOI: 10.1016/j.psj.2020.11.067.

KLARE, I. *et al.* Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 269-290, 2003. Doi: 10.1016/s0168-1605(03)00190-9.

KOBIERECKA, P.A. *et al.* *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. **Microbiology Open**, v. 6, n. 5, e00512, 2017. DOI: 10.1002/mbo3.512.

KOGUT, M.H. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 32-40, 2019. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008.

KRÁL, I.; SUCHÝ, P. Haematological studies in adolescent breeding cocks. **Acta Veterinaria Brno**, v. 69, p. 189-194, 2000.

KRYSIK, K.; KONKOL, D.; KORCZYŃSKI, M. Overview of the use of probiotics in poultry production. **Animals**, v. 11, 2021. DOI: 10.3390/ani11061620.

LACONELLI, C. *et al.* O processo de secagem afeta fortemente a viabilidade e funcionalidade dos probióticos. **Revista de Biotecnologia**, v. 214, p. 17-26, 2015.

LAN, R.X.; LEE, S.I.; KIM, I.H. Effects of *Enterococcus faecium* SLB 120 on growth performance, blood parameters, relative organ weight, breast muscle meat quality, excreta

microbiota shedding, and noxious gas emission in broilers. **Poultry Science**, v. 96, p. 3246-3253, 2017. Doi: 10.3382/ps/pex101.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R.J.L.; GILMORE, M.S. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: GILMORE, M.S. *et al.*, editors. **Enterococci**: From commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet], p. 1-59, 2014.

LECLERCQ, S. *et al.* Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. **Nature Communication**, v. 8, n. 15062, p. 1-12, 2017.

LOGAN, M. Biostatistical design and analysis using R: a practical guide. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Ltd; 2010.

LIN, J. *et al.* Critical role of multidrug efflux pump *cmeABC* in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4250-4259. 2003.

LIN, W.H. *et al.* Feasible Counts, Characteristic Evaluation for Commercial Lactic Acid Bacteria Products. **Food Microbiology**, v. 23, p. 74-81, 2006.

LINZMEIER, L.G. *et al.* Uso de antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, a. VII, n. 12, 2009.

LOKAPIRNASARI, W.P. *et al.* Effect of probiotic and *Moringa oleifera* extract on performance, carcass yield, and mortality of Peking duck. **Veterinary World**, v. 15, n. 3, p. 694-700, 2022. DOI: 10.14202/vetworld.2022.694-700.

LOPES, M.F.S. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 03, p. 191-198, 2005. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.025.

LUNEDO, R.; PEDROSO, A.A. Microbiota intestinal: a microbiota intestinal e seus efeitos sobre a fisiologia da ave. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**, Jaboticabal-SP: Funep/Fapesp/Facta, cap. 29, p. 1-16, 2017.

MACARI, M.; LUNEDO, R.; PEDROSO, A. Microbiota intestinal de aves. In: **Produção de Frangos de Corte** (Issue June, p. 565), 2014.

MAJEED, M. *et al.* Evaluation of the *in vitro* cholesterol-lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 1, p. 212-220, 2019. DOI: 10.1111/ijfs.13926.

MANUAL DE TÉCNICAS HISTOLÓGICA DE ROTINA E COLORAÇÕES DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. Vitória de Antão, 2021. 37p.

MAQUINÉ, L.C. *et al.* Effects of particle size of corn and stocking densities on the performance, carcass traits and gastrointestinal tract development of Muscovy ducks in housing. **Tropical Animal Health and Production**, v. 56, n. 1, 2023. 12p. DOI: 10.1007/s11250-023-03861-4.

MATTHEWS, G.V.T.; GILL, F. Anseriform. Encyclopedia Britannica. 09/2016. Disponível em: <https://www.britannica.com/animal/anseriform/Form-and-function>. Acesso em: 06 de jun. de 2024.

MATTÉ, F.; BOIAGO, M.M.; ROIESK, P.I. Floramax-B11: Alternativa probiótica frente ao desafio de *Escherichia Coli* Patogênica Aviária (APEC) em frangos de corte. **Revista AviNews Brasil**, n. 1, [online], 2023.

McDOUGAL, W. **What is blood plasma?** - Function & Components - Video & Lesson Transcript Study.com. 2015. Disponível em: <http://study.com/academy/lesson/what-is-blood-plasma-function-components.html>. Acesso em: 26 de abr. de 2024.

McFARLAND, L. Efficacy of single-strain probiotics versus multi-strain mixtures: systematic review of strain and disease specificity. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 66, p. 694-704, 2021. DOI: 10.1007/s10620-020-06244-z.

MELILLO, A. Applications of serum protein electrophoresis in exotic pet medicine. **The Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice**, v. 16, p. 211-225, 2013.

MIDILLI, M. *et al.* Efeitos da suplementação dietética de probióticos e prebióticos sobre o desempenho zootécnico e a concentração sérica de IgG de frangos de corte. **South African Journal of Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 21-27, 2008.

MONTORO, D.T. *et al.* A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. **Nature**, v. 560, n. 7718, p. 319-324, 2018. Doi: 10.1038/s41586-018-0393-7.

MULAW, G. *et al.* *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented ethiopian food products. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, art. ID 7179514, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1155/2019/7179514.

NÉVOA, M.L. *et al.* Antimicrobianos e prebióticos nas dietas de animais não ruminantes. **Revista Scientia Agraria Paranaensis - SAP**, v. 12, n. 2, p. 85-95, 2013.

NGUYEN, A.T.V. *et al.* Isolamento e caracterização da cepa de *Bacillus subtilis* CH16 do trato gastrointestinal de frangos para uso como suplemento alimentar para promover ganho de peso em frangos de corte. **Cartas de Microbiologia Aplicada**, v. 60, p. 580-588, 2015.

OCEJO, M.; OPORTO, B.; HURTADO, A. 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14. DOI: 10.1038/s41598-019-39323-x, 2019.

OHIMAIN, E.I.; OFONGO, R.T.S. The effect of probiotic and prebiotic feed supplementation on chicken health and gut microflora: A review. **International Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 4, p. 135-143, 2012.

OKAMOTO, A.S. *et al.* Bacterial communication between *Lactobacillus* spp. isolated from poultry in the inhibition of *Salmonella heidelberg* - proof of concept, **Poultry Science**, v. 97, n. 8, p. 2708-2712, 2018. DOI: 10.3382/ps/pey141.

OKUMURA, R.; TAKEDA, K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. **Inflammation and Regeneration**, v. 38, p. 5, 2018. DOI: 10.1186%2Fs41232-018-0063-z.

OLIVEIRA, E.B. *et al.* Impact of intestinal health at poultry. **Open Access Journal of Science**, v. 1, n. 5, p. 136-137, 2017. DOI: 10.15406/oajs.2017.01.00026, 2017.

OLIVEIRA, J.E. *et al.* *In ovo* inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 818-829. 2014. DOI: 10.3382/ps.2013-03409.

OTERO, M.C.; OCAÑA, V.S.; NADER-MACÍAS, M.E. Bacterial surface characteristics applied to the selection of probiotic microorganisms. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p. 435-40, 2004. DOI: 10.1385/1-59259-766-1:435

OYEWOLE, F.O. *et al.* *In vitro* study potential probiotic lactic acid bacteria isolated from the gut of chockens in Abeokuta. Nigeria. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 58, p. 73-84, 2018.

PARK, J.H.; KIM, I.H. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. **Poultry Science**, v. 93, p. 2054-2059, 2014. DOI: 10.3382/ps.2013-03818.

PARK, J.W. *et al.* Management and production: Effect of dietary supplementation with a probiotic (*Enterococcus faecium*) on production performance, excreta microflora, ammonia emission, and nutrient utilization in ISA brown laying hens. **Poultry Science**, v. 95, p. 2829-2835, 2016. DOI: 10.1111/poms.12405.

PATTERSON, J.A; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003. DOI: 10.1093/ps/82.4.627.

PAULONI, A.N.; ANTIORIO, A.T.F.B. Vias de administração de substâncias. **Serviço de Apoio Veterinário Especializado**, v. 1, p. 1-10, 2020.

PELICANO, E.R.L. *et al.* Efeitos de diferentes probióticos na qualidade da carcaça e da carne de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 5, n. 3, p. 207- 214, 2008.

PENDER, C.M. *et al.* *In ovo* supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 96, n. 5, p. 1052-1062, 2017.

PINGEL, H. Waterfowl production for food security. **Lohmann Information**, v. 46, n. 2, p. 32-42, 2011.

POPOV, I.V. *et al.* A review of the effects and production of spore-forming probiotics for poultry. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1941, 2021. DOI: 10.3390/ani11071941.

POPOVA, T. Effect of probióticos em aves para melhorar a qualidade da carne. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 72-77, 2017.

POURAKBARI, M. *et al.* Probiotic level effects on growth performance, carcass traits, blood parameters, cecal microbiota, and immune response of broilers. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 1011-1021, 2016. DOI: 10.1590/0001-3765201620150071.

QUINALHA, M.M. *et al.* Que bichos moram no jardim botânico de IB? Botucatú, 2011. Disponível em: https://www.flickr.com/people/jb_unespbtu/ Acesso em: 02 de jun. de 2024.

QUINN, P.J. *et al.* Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Ed. Artmed, 2005. 512p.

QUINTEIRO-FILHO, W.M. *et al.* O estresse térmico prejudica os parâmetros de desempenho, induz lesões intestinais e diminui a atividade dos macrófagos em frangos de corte. **Poultry Science**, v. 89, p. 1905-1914, 2010.

RAGHUWANSHI, S. *et al.* Indian perspective for probiotics: A review. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 3, p. 195-205, 2015.

RAJOKA, M.S. *et al.* Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. **Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 116-126, 2018.

RAMLUCKEN, U. *et al.* Production and stability of a multi-strain *Bacillus* based probiotic product for commercial use in poultry. **Biotechnology Reports**, v. 29, e00575, 2021. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00575.

RAUD, H.; FAURE, J.M. Welfare of ducks in intensive units. **Revue Scientifique et Technique**, v. 13, p. 119-129, 1994.

REIS, T.L. *et al.* Correlações entre as temperaturas da superfície corpórea e retal e os pesos médios de frangos de corte. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 21, n. 3, p. 349-353, 2022. DOI: 10.5965/223811712132022349.

REUBEN, R.C. *et al.* Novel mono-and multi-strain probiotics supplementation modulates growth, intestinal microflora composition and haemato-biochemical parameters in broiler chickens. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 2, p. 668-680, 2022. DOI: 10.1002/vms3.709.

REUBEN, R.C. *et al.* Novel multi-strain probiotics reduces *Pasteurella multocida* induced fowl cholera mortality in broilers. **Scientific Reports**, v. 11, p. 8885, 2021. Doi: 10.1038/s41598-021-88299-0.

RIBEIRO, A.G. *et al.* Habitats da microbiota residente e aditivos equilibradores intestinais para aves de produção: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, e242101018800, 2021. Doi: 10.33448/rsd-v10i10.18800.

RIGOBELLO, E.C.; MALUTA, R.P.; ÁVILA, F.A. Desempenho de frangos de corte suplementadas com probiótico. **ARS Veterinaria**, v. 27, n. 2, p. 111-115, 2011. DOI: 10.15361/2175-0106.2011v27n2p111-115.

RISNA, Y.K. *et al.* Screening for probiotic of lactic acid bacteria isolated from the digestive tract of a native Aceh duck (*Anas platyrhynchos*). **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, n. 7, p. 3001-3007, 2020. DOI: 10.13057/biodiv/d210717.

RODJAN, P. *et al.* Effect of organic acids or probiotics alone or in combination on growth performance, nutrient digestibility, enzyme activities, intestinal morphology and gut microflora in broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 2, p. 931-940, 2018. DOI: 10.1111/jpn.12858.

ROIESKI, P.I.; MATTE, F; BOIAGO, M.M. Floramax-B11: Alternativa Probiótica Frente ao Desafio de *Escherichia Coli* Patogênica Aviária (APEC) em Frangos de Corte. In: **Revista aviNews Brasil** 1T, 2023. Disponível em: <https://avinews.com/pt-br/floramax-b11-alternativa-probiotica-frente-ao-desafio-de-escherichia-coli-patogenica-aviaria-apec-em-frangos-de-corte/>. Acesso em: 04 de abril de 2024.

ROSTAGNO, H.S. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Universidade Federal de Viçosa, 2017, 488p.

ROTO, S.M.; KWON, Y.M.; RICKE, S.C. Applications of *in ovo* technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, p. 63, 2016. DOI: 10.3389/fvets.2016.00063.

ROYAN, M. The use of enterococci as probiotics in poultry. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 8, p. 559-565, 2018.

RUFINO, J.P.F. *et al.* Classificação taxonômica, diferenças fisiológicas e aspectos nutricionais de marrecos e patos no Brasil. **Revista Científica de Avicultura e Suinocultura**, v. 3, n. 1, p. 020-032, 2017.

RUFINO, J.P.F. *et al.* Quality and sensory evaluation of meat ducks (*Cairina moschata*) in confinement under different nutritional planes and housing densities. **International Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 1, p. 44-48, 2015.

RUIZ, J.P.A.; LABATUT, M.F.C. **Manual de criação de patos**. Universidade Católica de Temuco. Chile, 1ª edição, 2006. 84p.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal, SP: Funep, 2016.

SALEHIZADEH, M. *et al.* Effects of probiotic lactic acid bacteria on growth performance, carcass characteristics, hematological indices, humoral immunity, and IGF-I gene expression in broiler chicken. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p. 2279-2286, 2019. DOI: 10.1007/s11250-019-01935-w.

SANDERS, M.E. *et al.* Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, p. 605-616, 2019. DOI: 10.1038/s41575-019-0173-3.

SANDI, S. *et al.* Acid resistance test of probiotic isolated from silage forage swamp on *in vitro* digestive tract. **Indonesian Journal of Fundamental and Applied Chemistry**, v. 4, p. 15-19, 2019. DOI: 10.24845/ijfac.v4.i1.15.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.

SANTAGATI, M. *et al.* Characterization of a genetic element carrying themacrolide efflux gene *mef* (a) in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, p. 2585-2587, 2000. DOI: 10.1128/AAC.44.9.2585-2587.2000.

SANTOS, A.L.Q. *et al.* Anatomia funcional e comportamento das artérias coronárias do *Cairina moschata* (Linnaeus, 1758) (Anseriformes, Anatidae). **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 19, Ed. 166, Art. 1119, 2011.

SANTOS, A.N.A. *et al.* Sodium requirement for Muscovy ducks in housing. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 22, p. 001-006, 2020.

SANTOS, J.R.G.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-47, 2005.

SARUP, P. *et al.* The metabolic profile of long-lived *Drosophila melanogaster*. **Plos one**, v. 7, n. 10, p. 1-11, 2012.

SAS. **Statistical Analysis System**. [CD-ROM]. SAS/STAT Software Version 9.2. Cary: SAS Institute Inc, 2008.

SCANES, C.G.; CHRISTENSEN, K.D. **Poultry Science**. 5^a ed. Long Grove, IL: Waveland Press, 2020.

SHANG, Y. *et al.* Chicken gut microbiota: importance and detection technology. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, art. 254, p. 1-11, 2018. DOI: 10.3389/fvets.2018.00254.

SHARMA, M.K. *et al.* Effect of dietary supplementation of probiotic *Aspergillus niger* on performance and cecal microbiota in hy-line W-36 laying hens. **Animals**, v. 12, n. 18, p. 2406, 2022. DOI: 10.3390/ani12182406.

SHEHATA, A.A. *et al.* Probiotics, prebiotics, and phytogetic substances for optimizing gut health in poultry. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 395, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10020395.

SHOKRYAZDAN, P. *et al.* Isolation and characteriozation of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for chickens. **Agricultural Science**, v. 37, p. 141-157, 2014.

SHROYER, N.F.; KOCOSHIS, S.A. Anatomy and physiology of the small and large intestines. In: MAHAJAN, L.A. *et al.*; (eds.). **Pediatric gastrointestinal and liver disease**. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, p. 324-336, 2011. DOI: 10.1016/B978-1-4377-0774-8.10031-4.

SIHITE, M.; PRAMONO, P.B. The effect of probiotic *Streptococcus thermophilus* and *Bacillus cereus* on body weight, weekly body gain, and carcass weight of Magelang duck. **Advances in Biological Sciences Research**, v. 20, p. 136-140, 2022. DOI: 10.2991/absr.k.220309.028.

- SILVA, I.G. **Efeito da inoculação *in ovo* de probiótico e produto de exclusão competitiva em frangos de corte desafiados com *Salmonella Heidelberg***. Botucatu, 2016, 56 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2016.
- SKONIECZNA-ŻYDECKA, K. *et al.* Gut biofactory - neurocompetent metabolites within the gastrointestinal tract. A scoping review. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. e3369, 2020. DOI: 10.3390/nu12113369.
- SOSA-COSSIO, D. *et al.* Efecto del aditivo probiótico *Lactobacillus pentosus* LB-31 en pollos de ceba. **Journal MVZ Córdoba**, v. 26, n. 1, e2037, 2020. DOI: 10.21897/rmvz.2037.
- SUN, H. *et al.* Effects of compound probiotics on cecal microbiome and metabolome of shaoxing duck. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 813598, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.813598.
- SUPERCAC. **Ração de custo mínimo**. Versão 6.2 Windows TD Software, 1993-2004.
- SUSKOVIC, J. *et al.* The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 673-678, 2000.
- SUSWOYO, I.; ISMOYOWATI, I.; TUGIYANTI, E. Study on probiotic as antibiotic replacement to improve egg production in commercial duck farms. **Technium BioChemMed**, v. 2, n. 4, p. 65-72, 2021. DOI: 10.47577/biochemmed.v2i4.5204.
- TARRAH, A. *et al.* Effect of different initial pH on the growth of *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains. **Jornal Internacional de Laticínios**, v. 86, p. 65-68, 2018.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. **Wilimpres**: Ribeirão Preto, 2004.
- THOMAS, K.S. *et al.* Influence of dietary supplementation of probiotic on body weight of white penkin ducks. **Indian Veterinary Journal**, v. 92, n. 12, p. 34-36, 2015.
- TODOROV, S.D.; LEBLANC, J.G.; FRANCO, B.D. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 973-984, 2012.
- TOLOUEI, T. *et al.* Eficácia de *Echinacea purpurea* e protexina na resposta imune sistêmica e mucosa à vacinação contra o vírus da doença de Newcastle (cepa VG/GA) em perus comerciais. **Jornal iraniano de Medicina Veterinária**, v. 11, p. 85-95, 2017.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ª edição, Artmed, 2012.
- TULI, H.S. *et al.* Otimização das condições de extração e potencial antimicrobiano de um metabólito bioativo, cordycepin de *Cordyceps militaris* 3936. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 1525-1535, 2014.

TULINI, F.L.; WINKELSTROKER, L.K.; MARTINIS, E.C. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated Brazilian semi-hard artisanal cheese. **Anaerobe**, v. 22, p. 57-63, 2013.

TUYARUM, C. *et al.* Avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus* isolados de esterco de suínos nativo. **Veterinary Word**, v. 14, n. 5, p. 1133-1142, 2021.

VASE-KHAVARI, K. *et al.* The effect of three tropical medicinal plants and superzist probiotic on growth performance, carcass characteristics, blood constituents, immune response, and gut microflora of broiler. **Tropical Animal and Health Production**, v. 51, n. 1, p. 33-42, 2019. DOI: 10.1007/s11250-018-1656-x.

VIEIRA, F.N. *et al.* *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotic in marine shirp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 998-1004. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800027, 2013.

VIEIRA, J.F. **Animais domésticos**. Origem, manejo, sanidade, alimentação e importância econômica. 1º Ed. Rio de Janeiro. Impresso no Brasil, 2012.

WANG, L. *et al.* Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Tibetan yaks. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 293-298, 2018.

WAWRO, K. *et al.* Slaughter value and meat quality of Muscovy ducks, Pekin ducks and their crossbreeds, and evaluation of the heterosis effect. **Archiv Tierzucht**, v. 47, n. 3, p. 287-299, 2004.

WEIS, J.E.; HRNÝÁR, C. Effect of probiotic supplementation on the performance of different genotypes of broiler chickens. **Animal Welfare, Ethology and Housing System**, v. 9, n. 3, p. 626-632, 2013.

WILLIS, W.L.; REID, L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. **Poultry Science**, v. 87, p. 606-611, 2008.

WU, Y. *et al.* Pretreatment with probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 ameliorates necrotic enteritis-induced intestinal barrier injury in broiler chickens. **Scientific Reports**, v. 9, p. 10256, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-46578-x.

XIANG, Q. *et al.* Efeito de diferentes probióticos no desempenho de postura, qualidade do ovo, status oxidativo e saúde intestinal em galinhas poedeiras. **Animals**, v. 9, p. 1110, 2019.

XIE, Z.L. *et al.* Intestinal lactic acid bacteria from Muscovy duck as potential probiotics that alter adhesion factor gene expression. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 12262-12275, 2015. DOI: 10.4238/2015.October.9.15.

YADAV, S.; JHA, R. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1186/s40104-018-0310-9.

YAKUBU, A. Characterization of the local Muscovy duck genetic resource of Nigeria and its potential for egg and meat production. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 931-938, 2013.

YAKUBU, A.; UGBO, S. B. An assessment of biodiversity in morphological traits of Muscovy ducks in Nigeria using discriminant analysis. **International Conference on Biology, Environment and Chemistry**, v. 1, p. 389-391, 2010.

YAQOOB, M.; WANG, G.; WANG, M. An updated review on probiotics as an alternative of antibiotics in poultry - A review. **Animal Bioscience**, v. 35, n. 8, p. 1109-1120, 2022. DOI: 10.5713/ab.21.0485.

YAZHINI, P. *et al.* Dietary encapsulated probiotic effect on broiler serum biochemical parameters. **Veterinary World**, v. 11, n. 9, p. 1344-1348, 2018. DOI: 10.14202/vetworld.2018.1344-1348.

YEOMAN, C.J. *et al.* The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 89-99, 2012.

YOSI, F. *et al.* Supplementation of lactic acid bacteria derived from ensiled kumpai tembaga on live body weight, gastrointestinal tract, internal organs, and blood profiles in pegagan ducks. **Advances Animal Veterinary Science**, v. 8, n. 9, p. 916-924, 2020. DOI: 10.17582/journal.aavs/2020/8.9.916.924.

YU, L. *et al.* *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 supplementation improves the meat quality and antioxidant capacity of muscle of broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, p. 1099-1106, 2019. DOI: 10.1111/jpn.13097.

YU, Z. *et al.* Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 489-498, 2013.

ZENG, T. *et al.* De novo assembly and characterization of Muscovy duck liver transcriptome and analysis of differentially regulated genes in response to heat stress. **Cell Stress & Chaperones**, v. 20, n. 3, p. 483-493, 2015.

ZHANG, Z.F. *et al.* Effects of B-glucan and *Bacillus subtilis* on growth performance, blood profiles, relative organ weight and meat quality in broilers fed maizesoybean meal based diets. **Livestock Science**, v. 150, p. 419-424, 2012. DOI: 10.1016/j.livsci.2012.10.003.

APÊNDICE

Probióticos como aditivos melhoradores de desempenho produtivo e econômico de aves em produção: uma revisão

Artigo publicado na Revista Observatório de La Economia Latinoamericana

Sumbimissão: 24/04/2024

Aceito: 14/05/2024

MAQUINÉ, L.C., RUFINO, J.P., COSTA NETO, P.Q., PEREIRA, J.O. Probióticos como aditivos melhoradores de desempenho produtivo e econômico de aves em produção: uma revisão, v. 22, n. 5, p. 01-23, 2024. DOI: <https://doi.org/10.55905/oelv22n5-165>.