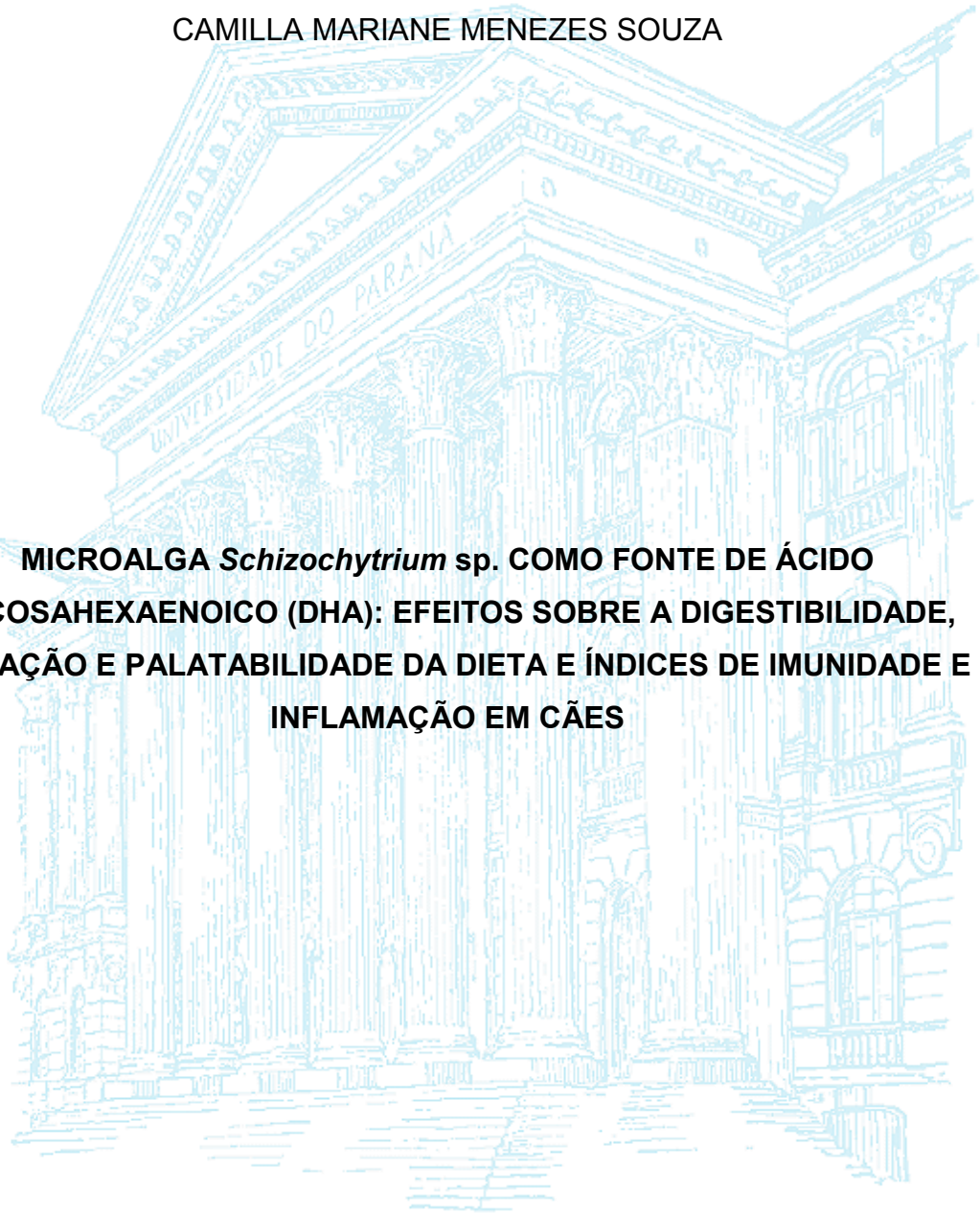
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILLA MARIANE MENEZES SOUZA



MICROALGA *Schizochytrium* sp. COMO FONTE DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA): EFEITOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE, OXIDAÇÃO E PALATABILIDADE DA DIETA E ÍNDICES DE IMUNIDADE E INFLAMAÇÃO EM CÃES

CURITIBA

2018

CAMILLA MARIANE MENEZES SOUZA

MICROALGA *Schizochytrium* sp. COMO FONTE DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA): EFEITOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE, OXIDAÇÃO E PALATABILIDADE DA DIETA E ÍNDICES DE IMUNIDADE E INFLAMAÇÃO EM CÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, ofertado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como um dos requisitos à obtenção de Título de mestre.

Orientador: Prof. Dra. Ananda Portella Félix

CURITIBA

2018

Souza, Camilla Mariane Menezes
S729 Microalga S*chizochytrium* sp. como fonte de ácido docosahexaenoico (DHA): efeitos sobre a digestibilidade, oxidação e palatabilidade da dieta e índices de imunidade e inflamação em cães / Camilla Mariane Menezes Souza. - Curitiba, 2018.
85 f. : il., grafs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Ananda Portella Félix
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

1. Cão - Alimentos. 2. Cão - Nutrição. 3. Nutrição animal. I. Félix, Ananda Portella. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDU 636.7: 614.95

Douglas Alex Jankoski CRB 9/1167

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILLA MARIANE MENEZES SOUZA** intitulada: **Microalga (*Schizochytrium* sp.) como fonte de ácido docosahexaenóico (DHA): efeitos sobre a digestibilidade, oxidação e palatabilidade da dieta e índices de imunidade e inflamação em cães**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2018.

ANANDA PORTELLA FÉLIX
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ADRIANA HELENA DO NASCIMENTO FERREIRA
Avaliador Externo (UFV)

SIMONE GISELE DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UFPR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 027/2017, referente ao projeto **"AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA ALGA (*SCHIZOCHYTRIUM SP.*) COMO FONTE DE DHA EM CÃES"**, sob a responsabilidade de **Ananda Portella Félix** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 05/05/2017.

Vigência do projeto	Maio/2017 até Junho/2017
Espécie/Linhagem	*Canis lupus familiaris* (cão)
Número de animais	16
Peso/Idade	10 kg / 1,5 a 1,6 anos
Sexo	Ambos
Origem	Laboratório de Estudos em Nutrição Canina – Lenucan no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná – UFPR

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 027/2017, regarding the project **"NUTRITIONAL EVALUATION OF ALGA (*SCHIZOCHYTRIUM* SP.) AT DHA SOURCE IN DOGS"** under **Ananda Portella Félix** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 05/05/2017.

Duration of the project	May/2017 until June/2017
Specie/Line	*Canis lupus familiaris* (dog)
Number of animals	16
Wheight/Age	10 kg / 1,5 to 1,6 years
Sex	Both
Origin	Laboratory of Studies on Canine Nutrition – Lenucan in the Sector of Agricultural Sciences of the Federal University of Paraná

Curitiba, 5 de maio de 2017.

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha
Coordenadora CEUA-SCA

DEDICO

A minha amada família, pelo apoio na caminhada em busca dos meus sonhos.

Aos cães que me remetem paz e alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor incondicional e por iluminar o meu caminho, dando-me discernimento e renovando as minhas forças a cada manhã. Obrigada por não me deixar desistir frente aos obstáculos. Acredito e confio no seu propósito em minha vida.

Aos meus pais Cláudia Maria e Alberto Alves por todo amor, carinho e dedicação. Por acreditar e apoiar os meus sonhos mesmo perante as dificuldades. Obrigada por cercar-me dia após dia de fidelidade, amor e esperança. Tudo que eu tenho e que sou devo a vocês. Essa conquista é nossa!

Aos meus irmãos Tallita e Rafael por todas as palavras de incentivo e todo carinho. Sou imensamente grata por estarmos juntos nesta caminhada chamada vida. Sem dúvida, com vocês, a caminhada se torna menos árdua, mais equilibrada e alegre.

Aos meus avós Maria e Manoel e a minha madrinha Clarice por todo carinho, zelo e orações. Ao meu primo Lucas Henrique e tia amada Claudiane (in memorian) que sempre acreditaram na minha capacidade e coragem. A todos os meus familiares, o meu obrigada.

Ao meu cunhado Wesley Vieira pelo coração gigante.

Ao Rafael Slomp de Azevedo, meu amigo e companheiro, por me ensinar a enxergar a felicidade nas pequenas coisas, pelo incentivo e cumplicidade. O carinho e cuidado que você tem comigo não deve apenas ao fato de termos um relacionamento, mas por você ser essa pessoa de luz, que se importa com o próximo. A você o meu amor, carinho, respeito e admiração.

Aos meus fiéis amigos que encontrei no decorrer da minha trajetória e que mesmo frente a distância mantivemos firme o laço de amizade: Vanessa Araújo, Janaina Gonçalves, Hellen Fernandes, Moisés Cardoso, Patrícia Almeida, Francielle Matos, Ane Ellen, Renato Guerreiro.

A Josiane Panisson, uma irmã que a pós-graduação me deu. Obrigada por todos os ensinamentos tanto acadêmicos como da vida. Você é uma pessoa singular.

Ao Rodrigo Girata e Daniele Lima, amigos queridos. Obrigada por estarem comigo deixando os meus dias mais alegres.

Aos meus colegas do LEPNAN por toda a troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração.

A toda o grupo do LENUCAN, pós-graduandos e estagiários, pelo auxilio nas atividades e execução dos experimentos. Agradeço especialmente a: Daniele Lima, Tabyta Sabchuck, Fabiane Murakami, Larissa Risolia e Cleusa Brito por terem me acolhido tão bem logo que cheguei. Todo o aprendizado que adquiri ao longo desses dois anos tem um pouco de cada uma de vocês.

Aos meus amados cães, que são minha alegria no trabalho e em casa: Amora, Amarula, Babalu, Bexiga, Bud, Cacau, Chanel, Cookie, Olivia, Paçoca, Soluço, Scooby, Tequila, Toddy, Thor, Xuxo, Zi, Fred, Problema, Goiaba, Luna (in memorian) e Eva.

A minha orientadora Ananda Portella Félix pelos ensinamentos, confiança depositada e desafios concedidos. A você minha admiração como pessoa e profissional.

Aos professores Alex Maiorka, Simone Gisele e Chayane da Rocha pelo apoio, oportunidade, confiança e por terem me recebido tão bem desde que cheguei ao LEPNAN.

A professora Cristina Sá Fortes, por ter alicerçado a minha vida acadêmica. Graças a você e seu apoio, estou caminhando rumo aos meus objetivos.

A todos do Laboratório de Nutrição Animal (UFPR), pelo auxilio e aprendizado.

A empresa Alltech pelo apoio na execução dos experimentos.

A Capes e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada a todos!

Camilla Mariane Menezes Souza

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”

(Mário Sergio Cortella)

MICROALGA *Schizochytrium* sp. COMO FONTE DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA): EFEITOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE, OXIDAÇÃO E PALATABILIDADE DA DIETA E ÍNDICES DE IMUNIDADE E INFLAMAÇÃO EM CÃES

RESUMO

A microalga *Schizochytrium* sp. apresenta alta concentração de ácido docosahexaenoico (DHA), sendo uma alternativa aos derivados de peixes na formulação de dietas para cães. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da microalga *Schizochytrium* sp. como fonte dietética de DHA sobre os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia metabolizável (EM), variáveis sanguíneas e indicadores de imunidade e inflamação em cães. Além disso, foi avaliado a estabilidade oxidativa e palatabilidade da dieta. Duas dietas contendo 0 e 0,4% de microalga *Schizochytrium* sp. foram avaliados em 3 experimentos. No experimento I as dietas foram ofertados durante 30 dias, para 12 cães adultos da raça Beagle, distribuídos de modo inteiramente casualizado, para determinar a digestibilidade, características fecais, parâmetros sanguíneos e gengivite. Foram realizadas coletas sanguíneas ao final dos 30 dias de fornecimento das dietas para estabelecer o perfil bioquímico, eritrograma, leucograma, atividade fagocitária e linfócitos supressores (CD4). O escore e área de gengivite dos cães foram analisados nos dias 0 e 30. No experimento II foi realizado a palatabilidade em que a dieta contendo 0 vs 0,4% de microalga S*chizochytrium* sp. foram comparados utilizando 16 cães adultos. No experimento III, a estabilidade oxidativa das dietas contendo 0,8% de microalga vs 0,4% óleo de anchova foi avaliada. Observou-se um aumento nos CDA dos nutrientes (exceto do extrato etéreo) e da energia metabolizável (EM) da dieta com a inclusão da microalga. Não foi constatado efeito sobre as características fecais ($P<0,05$). Não foi observado alteração ($P<0,05$) no perfil bioquímico, eritrograma, leucograma e linfócitos CD4 supressores sanguíneos. No entanto, a quantidade de monócitos e granulócitos fagocíticos foi maior ($P<0,05$) em cães alimentados com 0,4% de microalga. Houve maior razão de ingestão da dieta contendo microalga ($P<0,05$). A amostra contendo microalga apresentou maior estabilidade oxidativa em comparação à com óleo de anchova. Desta forma, a adição de 0,4% de microalga S*chizochytium* sp. na dieta aumenta a digestibilidade dos nutrientes e a EM. Além disso, aumenta as células fagocitárias, reduz a área de gengivite, apresenta alta palatabilidade e demonstra estabilidade oxidativa superior ao óleo de anchova.

Palavras-chaves: ômega 3, lipídeos, sistema imune, palatabilidade.

MICROALGAE *Schizochytrium* sp. AS A SOURCE OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA): EFFECTS ON DIET DIGESTIBILITY, OXIDATION AND PALATABILITY AND ON IMMUNITY AND INFLAMMATORY INDEXES IN DOGS

ABSTRACT

The microalgae *Schizochytrium* sp. has a high concentration of docosahexaenoic acid (DHA), being an alternative to fish derivatives in the formulation of diets for dogs. The objective of this study were to evaluate the effects of the microalgae *Schizochytrium* sp. as a dietary source of DHA on apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients and metabolizable energy (ME), and dog blood variables and indicators of immunity and inflammation. We also evaluated diet palatability and oxidative stability. Two diets containing 0 and 0.4% of microalga *Schizochytrium* sp. were evaluated in 3 experiments. In the experiment I, the diets were offered during 30 days, to 12 adult beagle dogs, distributed in a completely randomized manner, to determine the digestibility, fecal characteristics, blood parameters and gingivitis. Blood samples were collected at the end of the 30 days of diet to establish the biochemical profile, erythrogram, leukogram, phagocytic activity and suppressor lymphocytes (CD4). The scoring and gingivitis area of the dogs were analyzed on days 0 and 30. In experiment II palatability was performed in which the diet containing 0 vs 0.4% of microalga *Schizochytrium* sp. were compared using 16 adult dogs. In experiment III, the oxidative stability of the diets containing 0.8% of microalgae versus 0.4% of anchovy oil was evaluated. There was an increase in the ADC of the nutrients (except the ethereal extract) and the metabolizable energy (ME) of the diet with the inclusion of the microalgae. There was no effect on fecal characteristics ($P<0.05$). No change ($P<0.05$) was observed in the biochemical profile, erythrogram, leukogram and CD4 suppressor blood lymphocytes. However, the amount of monocytes and phagocytic granulocytes was higher ($P<0.05$) in dogs fed with 0.4% of microalgae. There was a higher intake ratio of the diet containing microalga ($P<0.05$). The microalgae sample showed higher oxidative stability compared to anchovy oil. Thus, the addition of 0.4% of microalgae *Schizochytium* sp. in the diet increases nutrient digestibility and MS. In addition, it increases phagocytic cells, reduces the area of gingivitis, presents high palatability and demonstrates oxidative stability superior to anchovy oil.

Key words: omega 3, lipids, immune system, palatability.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I – Microalga *Schizochytrium* sp. como fonte de ácido docosahexaenoico (DHA): Efeitos sobre a digestibilidade, oxidação e palatabilidade da dieta e índices de imunidade e inflamação em cães

Figura 1 – Estrutura química do ácido alfa-linolênico (ω-3) e ácido linoleico (ω-6).. 17

Figura 2 – Representação esquemática do metabolismo dos ácidos graxos essenciais em mamíferos..... 18

Figura 3 – Principais fontes dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). 19

Figura 4 – Esquema da metabolização dos eicosanoides sintetizados pelo ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenoico (EPA). 27

Figura 5 – Síntese de ácidos graxos realizado no cloroplasto das células das microalgas. 38

Figura 6 – Fotobiorreator do tipo tubular. 33

Figura 7 – Esquema de um sistema de cultivo e produção de microalgas. 34

Figura 8 – Imagem microscópicas da microalga *Schizochytrium sp.* 40

Capítulo II - Microalgae *Schizochytrium* sp. as a source of docosahexaenoic acid (DHA): Effects on diet digestibility, oxidation and palatability and on immunity and inflammatory indexes in dogs

Figure 1 – Circulating percentage of suppressor helper T lymphocytes in dogs fed control diet (0%) or containing 0.4% of microalgae *Schizochytrium* sp. (DHA)..... 55

Figure 2 – Number of phagocytic cells in blood and the phagocytosis intensity of monocytes and granulocytes in dogs fed a control diet (0%) or containing 0.4% of microalgae *Schizochytrium* sp (DHA). 56

LISTA DE TABELAS

Capítulo I – Microalga *Schizochytrium* sp. como fonte de ácido docosahexaenoico (DHA): Efeitos sobre a digestibilidade, oxidação e palatabilidade da dieta e índices de imunidade e inflamação em cães

Tabela 1 – Recomendações de ômega 3 (ω-3) e ômega 6 (ω-6) para cães nas diferente fases de vida (% da matéria seca)..... 20

Capítulo II - Microalgae *Schizochytrium* sp. as a source of docosahexaenoic acid (DHA): Effects on diet digestibility, oxidation and palatability and on immunity and inflammatory indexes in dogs

Table 1 – Analysed chemical composition (% dry matter) of experimental diets. 48

Table 2 – Chemical composition of the microalgae *Schizochytrium* sp. 48

Table 3 – Means of apparent nutrient digestibility coefficients (ADC) and metabolizable energy (ME, kcal/kg) of diets and faecal characteristics of dogs fed with 0 and 0.4% of microalgae *Schizochytrium* sp. 53

Table 4 - Average (1st and 3rd quartiles) of blood parameters of dogs fed diets containing 0 and 0.4% of microalga *Schizochytrium* sp..... 54

Table 5 – Average (1st and 3rd quartiles) of the score and means of the gingivitis area of dogs fed diets containing 0 and 0.4% of microalgae *Schizochytrium* sp. on days 0 (initial) and 30 (final) and their difference over time..... 57

Table 6 – First choice and intake ratio of dogs fed diets with 0% or 0.4% microalgae *Schizochytrium* sp. 57

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico
AGPI – Ácidos graxos poliinsaturados
ALA – Ácido alfa-linolênico
AL – Ácido linoleico
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
AO – Ácido oleico
COOX – Ciclooxigenase
CIS-LT – Cisteinil-leucotrienos
DGLA – Dihomo-gamma-linolênico
DHA – Ácido docosahexaenoico
EPA – Ácido eicosapentaenoico
IFN-γ – Interferão gama
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
LOOX – Lipooxigenase
LT – Leucotrienos
NK – Células natural killer
PCI – Prostaciclinas
PG – Prostaglandinas
PGE – Prostaglandina E
PK – Piruvato quinase
TNF-α – Fator de necrose tumoral
Th1 – Linfócito T-helper
TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta
TAG – Triacilglicerois
TX – Tromboxanos

SUMÁRIO

Capítulo I – Microalga *Schizochytrium* sp. como fonte de ácido docosahexaenoico (DHA): Efeitos sobre a digestibilidade, oxidação e palatabilidade da dieta e índices de imunidade e inflamação em cães

1 INTRODUÇÃO 14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1 Ácidos graxos poliinsaturados na dieta para cães 16
2.2 Ácido docosahexaenoico (DHA) 22
2.3 Interação do DHA com processos inflamatórios 28
2.4 Produção das microalgas 33
2.5 Microalgas na alimentação animal 35
2.6 Microalga *Schizochytrium* sp. 40
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS 43
1 Introduction 45
2 Material and methods 47
2.1 Animals and facilities 47
2.2 Diets 47
2.3 Experiment I: Digestibility, blood parameters and gingivitis 48
2.3.1 Experimental procedures 48
2.3.2 Faecal characteristics 49
2.3.3 Blood Collection and analysis 49
2.3.4 Gingival index 50
2.3.5 Calculations and statistical analyses 51
2.4 Experiment II: Palatability trial 51
2.4.1 Animals and tests 51
2.4.2 Statistical analyses 52
2.5 Experiment III: Oxidative stability 52
3 Results 53
3.1 Experiment I: Digestibility, blood parameters and gingivitis 53
3.1.1 Digestibility and faecal characteristics 53
3.1.2 Blood parameters 53
3.1.3 Gingival index 56
3.2 Experiment II: Palatability 57
3.3 Experiment III: Oxidative stability 57
4 Discussion 58

4.1 Experiment I: Digestibility, blood parameters and gingivitis 58
4.1.1 Digestibility and faecal characteristics 58
4.1.2 Blood parameters..... 59
4.1.3 Gingival index 61
4.2 Experiment II: Palatability trial 63
4.3 Experiment III: Oxidative stability 63
5 Conclusions 65
References 66

1 INTRODUÇÃO

Os lipídeos são de grande importância para o funcionamento fisiológico normal do organismo, visto que fornecem ácidos graxos essenciais, energia e melhoram a palatabilidade do alimento. Ainda, o perfil lipídico do organismo pode ser alterado conforme o tipo de ácidos graxos ingeridos pela dieta. Desta forma, a inclusão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da série ômega 3 (ω-3) em dietas para cães pode melhorar a sua qualidade nutricional, fornecendo níveis significativos de ácidos graxos, como o eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA), os quais desempenham papéis importantes nos processos biológicos do organismo.

O DHA possui efeito modulador nas propriedades que regulam a síntese de eicosanoides e citocinas atuantes nos processos inflamatórios do organismo (WALLACE et al., 2003). Além disso, auxiliam no desenvolvimento neurológico de cães (HEINEMANN et al., 2005), sendo comprovado seu efeito na melhoria da saúde desses animais (STOECKEL et al., 2011; SCHEIBEL et al., 2015). No entanto, a taxa de conversão do ácido alfa-linolênico (ALA, ω-3) em DHA em cães é ineficiente, sendo necessário o fornecimento via fontes especificas.

As fontes tradicionais de DHA utilizadas em dietas para cães são os óleos e derivados de peixes. Entretanto, os recursos de peixe são instáveis, pois dependem da estação, clima, localização, além de competirem com a alimentação humana. Desta forma, cria-se a necessidade de estabelecer fontes de DHA alternativas e sustentáveis (TACON e METIAN, 2008). Neste contexto, as microalgas já disponíveis no mercado, tornam-se uma opção, visto que produzem diversas substâncias, como vitaminas, sais minerais, pigmentos, lipídeos e ácidos graxos (MORAIS e COSTA, 2008), além de apresentarem produção rápida, continua e sustentável.

A microalga *Schizochytrium* sp. é um organismo de grande potencial na produção de DHA, tornando-se promissora como fonte renovável de ω-3 (MILLER et al., 2007), podendo ser inclusa como ingrediente nas formulações de dietas animal, substituindo fontes convencionais. No entanto não foram encontrados estudos que avaliassem os efeitos dessa microalga, fonte de DHA, sobre parâmetros fisiológicos e nutricionais de cães. Baseando-se no exposto, essa revisão aborda os ácidos graxos poliinsaturados essencial para cães, enfatizando a importância e influência do DHA nos processos inflamatórios, e de que forma as microalgas, especialmente a *Schizochytrium* sp. pode ser uma fonte alternativa de DHA.

O objetivo do estudo foi avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia metabolizável (EM) e a palatabilidade da dieta, bem como as características das fezes, variáveis sanguíneas e de imunidade e o índice de inflamação gengival de cães alimentados com microalga *Schizochytrium* sp. como fonte de DHA. Além disso, foi comparada a estabilidade oxidativa de dietas contendo microalga ou óleo de anchova.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS NA DIETA PARA CÃES

Os ácidos graxos são fontes energéticas de expressiva importância nas dietas para animais de companhia (NRC, 2006). São componentes estruturais das membranas celulares (CARCIOFI et al., 2002; TREVISAN e KESSLER, 2009) sendo utilizados pelo organismo a partir da digestão, absorção, transporte, lipogênese e beta oxidação (NRC, 2006).

Essas moléculas são definidas como ácidos carboxílicos com grupos laterais integrados por longas cadeias de hidrocarbonetos. Apresentam em suas ligações o grupo carboxila (COOH), ligado a uma longa cadeia alquílica. Podem ser classificadas quanto ao tipo e número de ligações em: saturados (todas as ligações entre carbonos são ligações simples), monoinsaturados (uma dupla ligação) ou poliinsaturados (mais de uma dupla ligação). Ainda, podem ser classificadas baseando-se no número de átomos de carbono e na localização das duplas ligações (LEHNINGER, 1997).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são precursores de prostaglandinas e de outros eicosanoides (NRC, 2006). São caracterizados pelas duplas ligações separadas por um grupo metileno (−CH=CH−CH2−CH=CH−), para diminuir a oxidação quando expostos em meio contendo oxigênio. A posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metílico ao final da molécula de ácido graxo, denomina o tipo de ômega (LIMA JUNIOR et al., 2011). A Figura 1 exemplifica esse conceito.

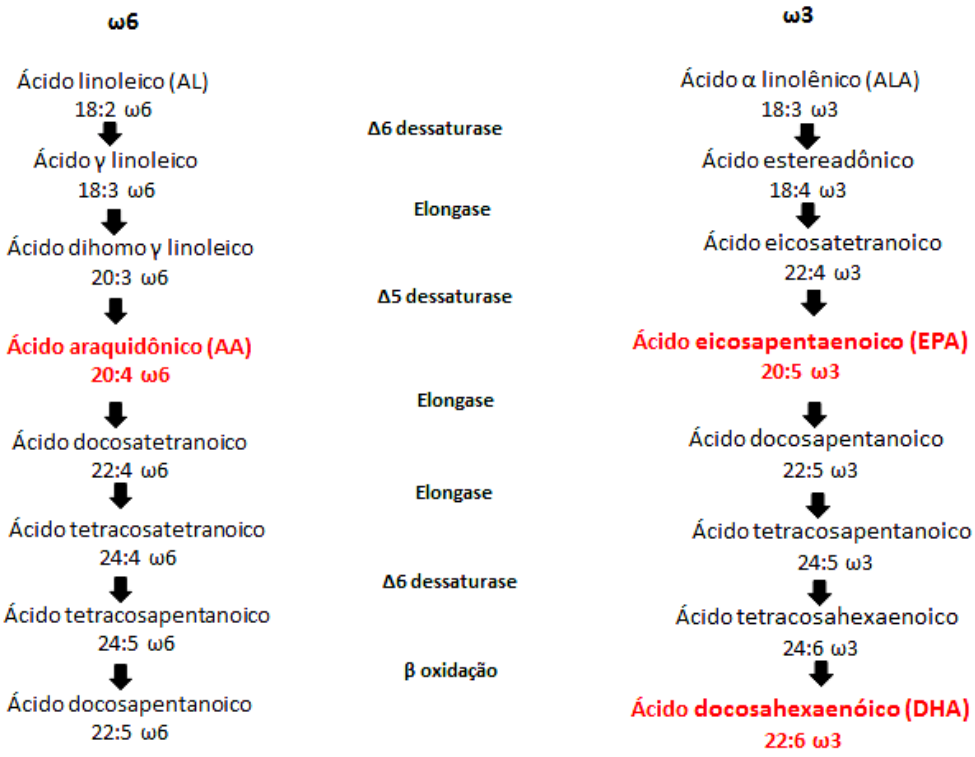
FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ALFA-LINOLÊNICO (ω -3) E ÁCIDO LINOLEICO (ω -6)

FONTE: NRC (2006)

Os AGPI se estabelecem em três series: a do ômega 3 (ω-3), representada pelo ácido alfa-linolênico (ALA, 18:3); ômega 6 (ω-6), que inclui derivados do ácido linoleico (AL, 18: 2) e a do ômega 9 (ω-9), proveniente do ácido oleico (AO, 18:1).

É importante ressaltar que os ácidos graxos ω-6 exercem grande influência no metabolismo e ação do ω-3, pois estão interligados e dependentes por compartilharem das mesmas enzimas, que participam das reações bioquímicas de ambos (Figura 2). Essas enzimas modificam a estrutura química das moléculas desses AGPI por sucessivas reações de dessaturações (oxidação com formação de duplas ligações, por ação das dessaturases) e alongamentos (ação das elongases). Ou seja, aumento da cadeia carbônica com 2 átomos de carbono, sintetizando desta forma a partir do ALA (ω-3) o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6). Já a partir das reações envolvendo o AL (ω-6) é sintetizado o ácido araquidônico (AA, 20:4).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS EM MAMÍFEROS.

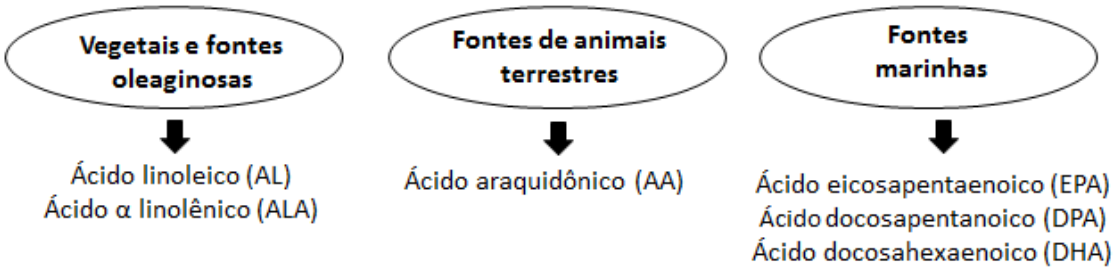


FONTE: adaptado do NRC (2006)

Em cães, o AL (ω-6) é considerado essencial e o ALA (ω-3) condicionalmente essencial (gestação, amamentação e crescimento) (NRC, 2006), tendo em vista que esses animais são incapazes de sintetiza-los no organismo devido à ausência de enzimas específicas. Desta forma, deve-se recorrer a fontes exógenas para que a necessidade desses compostos seja atendida.

As principais fontes de AGPI são as plantas terrestres e aquáticas (marinhas). O AL (ω-6) pode ser encontrado em grande abundância nas sementes de plantas oleaginosas, principalmente nos óleos de soja, milho, girassol e nas castanhas. Entre as gorduras de origem animal, é abundante em óleo de frango (CARCIOFI et al., 2002). O ALA (ω-3) tem como principais fontes as plantas e animais marinhos, principalmente os fitoplânctos, as algas, os óleos de peixes e também em óleos vegetais de linhaça (YOUDIM et al., 2000). O EPA e o DHA podem ser achados em alta concentração nos óleos de peixes oriundos de águas frias e profundas, como a cavala, sardinha, salmão e truta (CONNOR, 2000), sendo bastante expressiva nas microalgas (SANTOS, 2015). A Figura 3 exemplifica as principais fontes dos AGPI.

FIGURA 3 – PRINCIPAIS FONTES DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (AGPI).



FONTE: adaptado do NRC (2006)

Para que os ácidos graxos das séries ω-3 e ω-6 exerçam sua ação nos processos fisiológicos, é necessário que estejam em proporções adequadas no organismo (SHEIBEL, 2016). Para cães, as relações dietéticas desses AGPI indicadas a partir de pesquisas são inferiores a 10:1 ω-6 e ω-3, respectivamente (HOLMAN, 1998).

Os cães possuem capacidade de converter eficientemente o AL em AA. Entretanto a sua conversão do ALA em EPA e DHA é limitada (NRC, 2006). Essa taxa de conversão é baixa (aproximadamente 5% do ALA se transforma em EPA e somente 0,5% do ALA é convertido em DHA), não sendo o suficiente para estabelecer níveis adequados para o organismo. Além disso, essa baixa eficiência limita a utilização de fontes ω-3 na dieta, ressaltando desta forma, a necessidade de suplementação de fontes prontamente disponíveis de EPA e DHA, havendo então menor necessidade de metabolização (TREVISAN e KESSLER, 2009).

Segundo Carciofi et al. (2002), as necessidades nutricionais mínimas de AL são estimadas para animais domésticos como sendo 1% da dieta ou 2% da energia. Dados do NRC (2006) indicam que existem exigências específicas para cães em crescimento para o AL, ALA, AA e para o EPA+DHA. Por outro lado, em relação ao AA, não há exigência definida para cães em manutenção e reprodução. Para essa espécie na fase de crescimento, consideram-se importante suplementar os ácidos graxos ω-3 (ALA, EPA e DHA), uma vez que possuem funções fisiológicas importantes, especialmente em relação ao sistema nervoso central, estando em elevadas concentrações no leite da cadela, supondo-se desta forma, que possam ser condicionalmente essenciais para filhotes (NRC, 2006). As recomendações dos

ácidos graxos essenciais para cães estão descritas na tabela 1.

TABELA 1 – RECOMENDAÇÕES DE ÔMEGA 3 (ω -3) E ÔMEGA 6 (ω -6) PARA CÃES NAS DIFERENTE FASES DE VIDA (% DA MATÉRIA SECA).

Nutriente	FEDIAF (2016)			NRC (2006)		
	Adulto	Crescimento precoce e Reprodução	Crescimento	Adulto manutenção	Crescimento	Gestação e Lactação
AL (ω-6)	1,32	1,30	1,30	1,10	1,18	1,3
AA (ω-6)	-	0,3	0,3	-	0,03 - 0,05	-
ALA (ω-3)	-	0,08	0,08	0,04	0,07	0,08
EPA+ DHA (ω-3)	-	0,05	0,05	0,04	0,06	0,05

AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidônico; ALA: ácido linolênico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico.

A partir do estudo realizado por Burr e Burr (1929), demonstrando a necessidade dietética de AGPI, constatou-se que todos os animais precisam destas substâncias para manutenção das suas funções orgânicas (LLOYD, 1989).

As funções biológicas dos AGPI são muitas. As mais importantes segundo estudos descritos na literatura parecem estar associadas à composição e integridade das membranas (WERTZ e DOWNING, 1982; TABOREK et al., 2002); interação lipídeo-proteína (ANONYMOUS, 1992a), prevenção à aterosclerose e alterações cardiovasculares (HU et al., 2001); estimulação a liberação de insulina (VESSBY, 2003); inibição à vasoconstricção e à agregação plaquetária (KELLEY, 2001); participação no desenvolvimento normal da placenta, do crescimento fetal e do desenvolvimento neuronal (OLLER et al., 2003), além da atuação nas funções imunomoduladoras a partir da produção de eicosanoides (GRIM et al., 2002).

Desde 1975, os ácidos graxos da família ω-3 são estudados pela importância na prevenção de doenças que acometem humanos. Dyerberg et al. (1995) demonstraram em estudos com a população de esquimós da Groelândia, que o consumo de peixes com altos níveis de ω-3, proporcionou baixa incidência nos problemas cardíacos e artrites, quando comparados aos outros povos.

Atualmente, em humanos são relatados vários benefícios da ingestão de AGPI da família ω-3, sob a forma de fontes de alimentos como o óleo de peixe, estando relacionado com a prevenção e tratamento de enfermidades cardiovasculares (HU et al., 2001), com as doenças inflamatórias do trato gastrintestinal (PERES e TAVARES, 1998) e ultimamente, prevenindo lesões e alterações imunológicas (TABOREK et al., 2002).

As modificações de respostas metabólicas ao consumo de ácidos graxos são pouco conhecidas em pequenos animais de companhia (BAUER, 2007). Foi observado que suplementos de óleo de peixe causam efeito antiarrítmico e com isso minimizam a insuficiência cardíaca em cães (BAUER et al., 2006). Um dos mecanismos desse efeito pode estar relacionado com a sua incorporação à membrana de miócitos que altera a função de canais de cálcio e sódio, que levam a alterações na despolarização dessas células, o que diminui a frequência cardíaca. Além disso, o efeito anti-inflamatório do ω-3 e a redução de triglicerídeos plasmáticos causado pelo EPA e DHA são importantes fatores no controle de cardiopatias.

A prevenção de casos oncológicos de neoplasias mamárias em cadelas pode ser feita a partir da suplementação de ω-3. O óxido nítrico é um potenciador carcinogênico, por isso a inibição de sua síntese por esse ácido graxo é benéfica (STEHR e HELLER, 2006). Além disso, os eicosanoides sintetizados pelo AA (série par) são relacionados com metástases e proliferação celular, a síntese desses é diminuída pela ingestão do ω-3 (STOLL, 1998).

As dermatites e periodontites são doenças inflamatórias e por isso foi possível observar o efeito benéfico a partir do uso de ácidos graxos da série ω-3 pelas maiores proporções de eicosanoides menos inflamatórios (CARCIOFI et al., 2002; LLOYDE 1989).

Em pesquisas com cães caquéticos, Freeman (2008) constatou que a suplementação diária de EPA e DHA levou a menores níveis de eicosanoides, ajudando desta forma o tratamento da caquexia. Segundo Ogilvie e Robinson (2004), com o uso do ω-3 em modelos animais verifica-se diminuição da lipólise e na degradação de proteínas, o que em animais caquéticos ajudaria em melhor manutenção de seu escore corporal. Além disso, têm recebido atenção significativa no que se refere à diminuição dos sinais clínicos associados à osteoartrite (CARCIOFI et al., 2002).

Para Bauer (2007), em estudos de respostas metabólicas lipídicas é necessário primeiramente compreender os efeitos da modificação dietética em animais clinicamente normais, e quando surgirem oportunidades ter melhor interpretação das interações dieta-doença.

2.2 ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA)

O DHA é um AGPI de cadeia longa da familia ω-3. As vias para biossíntese de ω-3 e 6 compartilham das mesmas enzimas de alongamento e dessaturação, motivo pelo qual a síntese de DHA pode ser comprometida. Além disso, as dietas elaboradas atualmente são ricas em ω-6, o que pode potencializar ainda mais essa competição (GIL-CAMPOS e CRESPO, 2012).

A síntese de DHA ocorre principalmente no fígado, no retículo endoplasmático das células, a partir de reações de dessaturação do ALA (C18: 3 ω-3) pela enzima Δ-6-dessaturase, que insere uma dupla ligação na posição 6. Em seguida, com a ação da enzima elongase, este ácido graxo se converte em 20:4 ω-3 (cis-8,11,14,17-20:4) e é transformado pela Δ-5-dessaturase a 20:5 ω-3 (cis-5,8,11,14,17-20:5), sendo novamente alongado a 22:5 ω-3 (cis-5,8,11,14,17-22:5) ainda no retículo endoplasmático (Figura 2). Desta forma, são adicionados dois carbonos obtendo o 24:5 (cis-9,12,15,18,21-24:5), o qual, pela ação da Δ-6-dessaturase, é convertido a 24:6 (cis-6,9,12,15,18,21-24:6). Nos peroxissomos, o DHA sofre novas reações de alongamento, dessaturação e em seguida de encurtamento da cadeia, sendo retirados dois carbonos por β-oxidação. Posteriormente, O DHA retorna ao retículo endoplasmático para evitar novas β-oxidações nos peroxissomos e é incorporado aos fosfolipídeos por nova esterificação ou por reação de deacilação-reacilação, indicando que a biossíntese do DHA é estritamente regulamentada (Hu et al., 2008).

Os cães obtêm DHA principalmente de sua dieta por meio de fontes alimentares como o óleo de peixes e algas (WAKSHLAG e SHMALBERG, 2004). A FEDIAF (2016) recomenda para cães em crescimento e reprodução a concentração de 0,05 g (100g/MS) de EPA+DHA. Entretanto, alguns autores relatam que o valor de recomendação mínima ou quantidade ideal de DHA ingerido na dieta ainda precisa ser bem estabelecido (GIL-CAMPOS e CRESPO, 2012).

O DHA é o principal AGPI da serie ω-3 presente no cérebro e compreende 30-40% dos ácidos graxos aminofosfolípidos nas membranas celulares neuronais (KIM et al., 1986; LAURITZEN et al., 2001). Como componente integral das membranas celulares neurais, esse composto está envolvido em vários processos, incluindo a ordem das membranas, a ativação do receptor e a transdução de sinal (SALEM et al., 2001). Também há indícios de que as concentrações de DHA sub-ótimas podem contribuir para a disfunção cognitiva e a demência ao longo do

envelhecimento, em alguns indivíduos (LUKIW e BAZAN et al., 2008).

Salem (1989) relata que o DHA é abundante na substância cinzenta do cérebro e na retina do olho, estando em alto nível nos fosfolipídeos da retina dos cães (TREVISAN e KESSLER, 2009). Neste contexto, estudos evidenciam que o DHA auxilia para o desenvolvimento neurológico desses animais, pois a suplementação durante a gestação e a lactação propiciou aos filhotes melhorias no desenvolvimento do sistema nervoso, com reflexos positivos na memória e na aprendizagem (HEINEMANN et al., 2005).

A fortificação dietética com óleos de peixe ricos em DHA e possivelmente outros nutrientes implicados no desenvolvimento neurocognitivo após o desmame melhoraram as funções cognitivas, de memória, psicomotoras, imunológicas e retinianas em cães em crescimento (ZICKER et al., 2012).

Hadley et al. (2017) afirmam que são necessárias investigações adicionais para confirmar as observações relacionadas ao desempenho em avaliações cognitivas de aprendizagem e memória espacial e processamento visual em animais pré-senescentes e envelhecidos. Em geral, no estudo supracitado, essas observações são consistentes com uma associação entre o consumo de uma dieta fortificada com microalga rica em DHA e o suporte de função cerebral saudável durante a senescência cerebral em cães.

Em uma avaliação com suplementação dietética de EPA e DHA em cães, foi observado que a ingestão aumentada desses ácidos graxos de cadeia longa aparentemente diminui as concentrações séricas de triglicéridos e tiveram um papel no tratamento da hiperlipidemia (ARAUJO et al., 2012).

Nesta mesma especie, dietas com altos níveis de ácidos graxos da série ω-3 a partir do uso de óleo de peixe em relação a dietas com baixo nível, determinaram aumento de 219% nos teores de DHA dos fosfolipídeos do plasma (DELTON-VANDENBROUCKE et al., 1998). Por outro lado, comparando dietas com alto nível de AL (semente de girassol) ou alto nível de ALA (linhaça) foi observada redução no nível de AA e aumento de EPA, mas não houve efeito sobre os níveis de DHA (REES et al., 2001).

Existem diversos relatos na literatura refentes as funções do DHA no organismo, os quais estão descritos no quadro 1.

QUADRO 1 – RELATOS NA LITERATURA SOBRE AS PRINCIPAIS FUNÇÕES DO DHA NO ORGANISMO.

Capacidade cognitiva, neurogenese.	SALEM, 1989; SALEM et al., 2001; BAUER, 2007; HADLEY et al., 2017.
Redução da cicatrização e agregação plaquetária	SHEIBEL et al., 2016.
Precursores de eicosanoides (Sinalizadores menos inflamatórios)	CALDER e NEWSHOLME, 1992; MANCUSO et al., 1997; SADEGHI et al., 1999; CASANOVA E MEDEIROS, 2011.
Redução do estresse oxidativo	MEYDANI et al., 1991; WALTERS et al., 2010; CASAÑAS-SÁNCHEZ et al., 2015.
Constitui fosfolipideos das membranas celulares	MADSEN et al., 1998.
Condições reprodutivas	SHEIBEL et al., 2016.
Modulação da resposta inflamatória e imune	HALL et al., 2003; WANDER et al., 1997; AJMONE-CAT et al., 2012.

Além disso, o DHA foi relatado na prevenção e tratamento da demência senil, hipertensão, artrite, aterosclerose, depressão, diabetes mellitus, infarto do miocárdio, trombose, doença cardíaca e alguns tipos de câncer (HORROCKS e YEO, 1999).

Para Campos et al. (2012) é possível que a suplementação do DHA na dieta regule diretamente os processos inflamatórios no trato gastrinstestinal. Neste contexto de controle da inflamação, Neqvi et al. (2010) afirmam que o DHA está associado a menos doença periodontal, em que o aumento da ingestão dietética desse AGPI seja capaz de modular o sistema imunitário e consequentemente reduzir os processos inflamatórios (SERHAN et al., 2008).

Estudos demonstram que a modulação do efeito terapêutico do DHA a partir da ingestão dietética pode influenciar diretamente as propriedades de regulação importantes, como a formação de eicosanoides, liberação de citocinas, funções de receptores e composição da membrana celular (ANGULO-GUERRERO et al.,1998; WALLACE et al., 2003).

Os eicosanoídes são metabólitos oxigenados dos ácidos graxos essenciais. Estes metabólitos contêm 20 átomos de carbono e são sintetizados localmente, sob demanda, por tipos de células individuais em resposta imediata (NRC, 2006). A família dos eicosanoides é composta pelas prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), prostaciclinas (PCI), tromboxanos (TX) e derivados dos ácidos graxos hidroxilados.

Os substratos para a formação dos eicosanoídes são o ácido dihomo-gamma-linolênico (DGLA), o AA e o EPA. Para a síntese destas substâncias, o ácido graxo precursor é clivado dos fosfolipídeos de membrana pela ação da fosfolipase A2 ou fosfolipase C, dependendo do subtipo fosfatidil ao qual o ácido graxo está ligado (KONIG et al., 1997)

As vias que ocorre essa metabolização é a da ciclooxigenase (COOX), na qual há a síntese da formação de endoperóxidos lábeis como os prostanóides: PG, TX e PCI e a outra via é a de lipooxigenase (LOOX), a qual leva a síntese de LT. Os eiocosanoides derivados do AA (ω-6) são considerados substâncias pró-inflamatórias.

Os prostanóides são definidos como substâncias muito ativas mesmo estando em concentrações muito baixas (10-9 g/g). Possuem meia-vida muito curta (menor que 1 minuto), sendo degradados rapidamente a metabólitos com fraca ou nenhuma atividade (KONIG et al., 1997).

As prostaglandinas compreendem muitos subtipos, sendo um típico vasodilatador (NRC, 2006). A prostaglandina E (PGE) tem sido amplamente investigada, em função do seu importante papel como imunomoduladora. A PGE_2 que pertencem à série par constitui um potente mediador pró-inflamatório de grande relevância. O seu efeito imunossupressor se estabelece devido à inibição da proliferação de linfócitos e células natural killer (NK) e da produção de citocinas de interleucina (IL-2) e interferão gama (IFN-γ). Por outro lado, a PGE_2 também possui características anti-inflamatórias quando inibe a produção de fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina 1 (IL-1) (GAROFOLO e PETRILLI et al., 2006). Outros efeitos imunossupressores atribuídos são o decréscimo das atividades fagocíticas, quimiotáticas, agregação, metabolismo oxidativo e proliferação de leucócitos (PARKER, 1986; PARKER, 1987). Já para Watanabe et al. (1991) os efeitos imunossupressores da PGE_2 estão associados à liberação de hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH).

Os tromboxanos (TX) podem ser da série 1, 2 ou 3, de acordo como número de duplas ligações e A ou B pela estrutura do anel. Apenas o TX_A é ativo, sendo o TX_B inativo. O TX_{A2} tem efeitos na agregação plaquetária e na contração dos vasos sanguíneos assim como o TX_{A3} (SARDESAI, 1992).

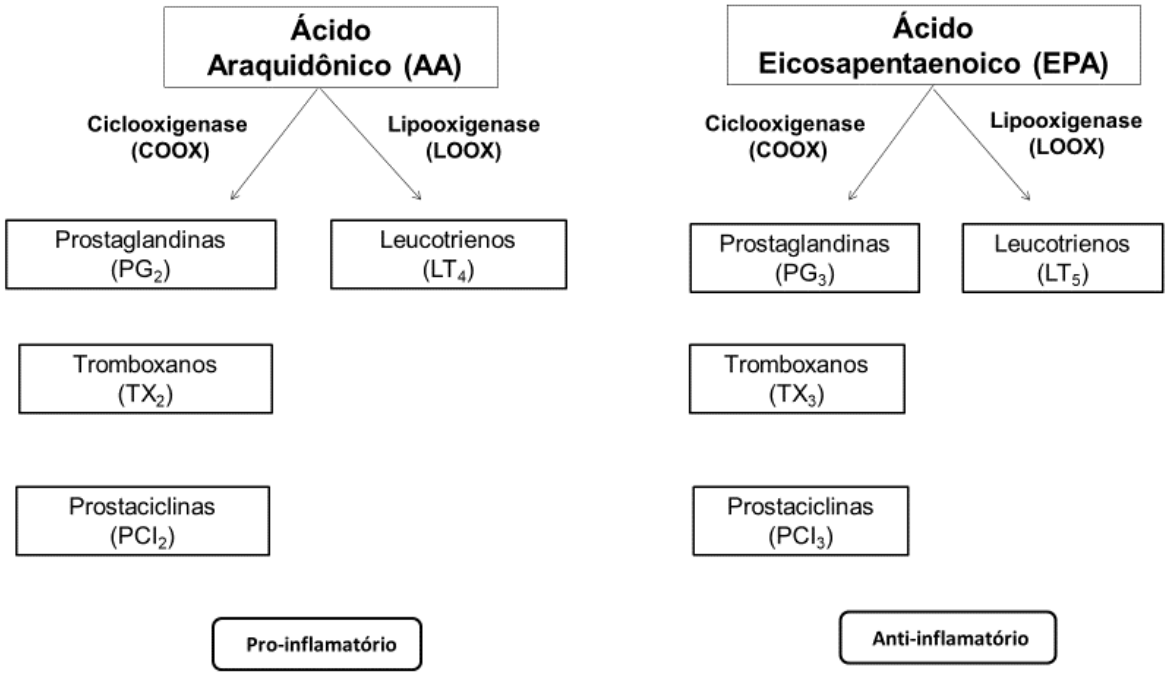
As prostaciclinas (PCI) incluem a PCI_1, utilizada para produzir anticorpos e a PCI_2 que tem ação inibidora na agregação plaquetária e é vasodilatadora (SARDESAI, 1992).

De todos esses metabólitos formados a partir de AA a partir da COOX recebem um sufixo “2” (PGE_2, TXA_2, PCI_2) e aqueles oriundos do EPA recebem o sufixo “3” (PGE_3, TXA_3, PCI_3). O ácido DGLA origina prostaglandinas do tipo 1, das quais a PGE_1 é a mais importante do grupo.

Da mesma forma que a formação dos prostanóides, os AGPI liberados dos fosfolipídeos pelas fosfolipases, são transformados em LT pela enzima 5-lipoxigenase. Nesta via, há a formação do ácido hidroperoxieicosanóico e do LT_A, os quais sucedem a formação dos demais membros ativos da família dos LT, que são subdivididos em A, B, C, D, E e cisteinil-leucotrienos (CIS-LT). Possuem ação quimiostática, atraindo macrófagos e neutrófilos, aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a contração da musculatura lisa (FUNK, 2001). Além disso, estimulam a liberação dos TX (NRC, 2006). Os LT derivados do AA recebem um sufixo “4” e aqueles oriundos do EPA recebem o sufixo “5”. Os LTs derivados do ácido DGLA recebem o sufixo “3”, mas há pouca informação disponível sobre sua relevância clínica e bioquímica.

O EPA é preferivelmente degradado pela via da LOOX, em comparação com o AA, ocasionando a maior formação de LT_5 e menores níveis de LT_4 (HAWTHORNE et al., 1989). O EPA, também com 20 carbonos, compete com o AA levando a menor produção de PGE_2 e LTB_4. Todos aqueles eicosanoides originados tanto do EPA quanto do DGLA têm efeitos insuficientes, menos potentes, sobre as células imunes.

FIGURA 4 – ESQUEMA DA METABOLIZAÇÃO DOS EICOSANOIDES SINTETIZADOS PELO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA) E ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO (EPA).



FONTE: do autor (2017)

Além disso, o DHA é utilizado na biossíntese de uma nova classe de mediadores de lipídicos de pro-resolução como as lipoxinas, resolvinas e protectinas (SERHAN et al., 2008) que contrarregulam os sinais da inflamação.

As lipoxinas servem como um sinal para pausar o processo inflamatório e promovem a resolução, inibindo a entrada dos neutrófilos nos sítios de inflamação, reduzindo a permeabilidade vascular e estimulando a apoptose dos neutrófilos pelos macrófagos. Além disso, exercem um papel de quimiotaxia sobre os monócitos, células necessárias para a cicatrização (CALDER, 2009).

As resolvinas derivam principalmente do EPA e do DHA, sendo denominadas como resolvinas da série E (RvE) e resolvinas da série D (RvD), respectivamente (SERHAN et al., 2008) Possuem a capacidade de inibir a infiltração e transmigração dos neutrófilos, bem como a produção de mediadores pro-inflamatórios, além de possuir efeitos anti-inflamatórios e imunorregulatórios potentes.

Em relação as protectinas, também derivadas do DHA, essas são produzidas pelas células gliais (células não neurais do sistema nervoso) e reduzem a expressão das citocinas. Assim como as resolvinas, inibem a infiltração dos neutrófilos e reduzem a expressão de citocinas nas células. Essas moléculas possui uma potente atividade

protetora em sistemas inflamatórios (SIMOPOULOS, 2004) e neurais. Quando produzido por tecidos neurais são denominados neuroprotectina D1. Esta bloqueia a migração de células T in vivo, reduz TNF e secreção de interferão e promove a apoptose das células T (SERHAN et al., 2008).

Neste contexto, lipoxinas, resolvinas e protectinas, mediadores lipídicos de pro-resolução, representam agonistas naturais para receptores responsáveis pelo início e manutenção das vias de sinalização da inflamação. Basicamente, essas moléculas pausam a inflamação e agem como “sinais de bloqueios” para atividade neutrofilica, indicando que o controle da inflamação é um processo ativo.

Saldanha e Gonzales (2012) estipularam as quantidades de DHA que podem ser incluídas na dieta de poedeiras para obtenção de ovos com maior nível nutricional de ácidos graxos essenciais. Os autores observaram que o ideal é que essa suplementação nas dietas de animais deva vir acompanhada de maior adição de antioxidantes. Pois o DHA, por conter seis instaurações, é muito susceptível à oxidação por espécies reativas, produzindo compostos polares como hidroperóxidos (LOOH) e peróxidos. Os LOOH, produtos da peroxidação lipídica, danificam as membranas celulares, fazendo-as perderem sua função, com consequências deletérias ao organismo, ocorrendo propagação da peroxidação (CATALÁ, 2009).

Evidência de peroxidação lipídica, bem como redução significativa no α-tocoferol plasmático (Vitamina E) tem sido documentada em cães que consomem rações ricas em EPA e DHA. Enumeram-se possíveis efeitos colaterais ao seu consumo por longo tempo devendo ser compensado com maior suplementação de vitamina E (CARCIOFI et al., 2002). Em dietas para cães, para cada grama de óleo de peixe incluído deve-se adicionar 10 UI de vitamina E acima das necessidades dietéticas mínimas (AAFCO, 2000).

2.3 INTERAÇÃO DO DHA COM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

O sistema imunológico está relacionado na defesa do organismo diante a agentes infecciosos como bactérias, vírus, fungos e parasitas; células tumorais e agressões externas (SIERRA et al., 2004; CALDER et al., 2007).

Esse sistema de defesa é dividido em sistema imune inato e adquirido (Quadro 2). O sistema imune inato é definido com a primeira linha de defesa contra os microrganismos. É constituído de barreiras físicas e químicas (pele e mucosas);

fatores solúveis (sistema complemento) e células fagocíticas (granulócitos, monócitos e macrófagos). Os linfócitos T citotóxicos naturais como as células NK também têm um papel importante na resposta imune inata. As células fagocíticas expressam receptores de superfície específicos para os antígenos. A fagocitose é o primeiro estágio de eliminação de vários patógenos. Subsequente à destruição intracelular destes patógenos há a geração de peptídeos que junto com o complexo de histocompatibilidade principal (CPH) e células T iniciarão a resposta imune adquirida, que envolve a presença dos linfócitos. Essa resposta é intensamente específica, pois há memória imunológica, a qual é a base para uma resposta mais efetiva contra a reexposição a um mesmo patógeno (CALDER et al., 2007).

A imunidade do tipo adquirida ou adaptativa quando abrange anticorpos é denominada de reposta humoral, sendo caracterizada pela produção de imunoglobulinas (Ig) específicas para antígenos específicos, a partir dos linfócitos B. Quando ocorre a infecção de uma célula por um patógeno intracelular, a resposta imune envolvida neste caso é a do tipo celular, mediada pelos linfócitos T. Os linfócitos T-Helper (CD4) podem ser subclassificados de acordo com os padrões de citocinas produzidas. O linfócito T-helper 1 (Th1) produz citocinas do tipo pró-inflamatórias, como a IL-2 e IFN-γ e o TNF-α, os quais ativam macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos (CD8). Já o linfócito T-helper 2 (Th2) secreta citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 5 (IL-5), fator de crescimento (IGF) e fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), anticorpos específicos não protetores e interleucina 4 (IL-4), esta última estimula a produção de imunoglobulina E (IgE).

QUADRO 2 – COMPONENTES DO SISTEMA IMUNE INATO E ADQUIRIDO.

Sistema Imune	Inata	Adquirido
Barreiras físicas e químicas	Pele, epitélio das mucosas, substâncias químicas antimicrobianas	Linfócitos nos epitélios, anticorpos secretados nas superfícies epiteliais
Proteínas sanguíneas	Complemento	Anticorpos (Imunoglobulinas)
Células	Fagócitos Granulócitos Macrófagos Neutrófilos Natural killer (NK)	Linfócitos

Diversos estudos têm se intensificado a fim de elucidar as funções dos

eicosanoides na modulação das respostas inflamatórias e imunitárias (KELLEY et al., 1991). Eles estão envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória e também na regulação das funções dos linfócitos B e T (CALDER, 2007; CALDER et al, 2009).

Embora o AA seja preferencialmente metabolizado pela via da COOX, os ácidos graxos ω-3, assim como o EPA o DHA, inibe competitivamente a atividade dessa via (GARG e HASSID, 1990). Por exemplo, a ingestão aumentada de óleo de peixe, rico em ácidos graxos ω-3 resulta na diminuição plasmática de AA (BROUGHTON e WADE, 2002). Consequentemente, sua disponibilidade e reversão pela COOX estão reduzidas, resultando na menor formação de derivados do AA, aumentando a formação de prostanoides derivados do DHA. Isso é importante não só pela alteração das concentrações de tais compostos, mas sim pela diferença em suas atividades biológicas. Apesar de serem menos potentes em relação aos derivados do AA não possuem diferenças importantes em suas ações.

O DHA não é um substrato para as enzimas COOX e LOOX, mas a sua inibição a síntese de eicosanoides do AA permite a síntese de PG e TX da série 3 e LT da série 5, que têm ação menos inflamatória (WALL et al., 2010). Desta forma, a suplementação dietética com fontes desse ácido graxo altera a razão entre estes eicosanoides (BARRETT e BIGBY 1995, REINHART et al., 1996; SCHEIBEL et al., 2015). Esse efeito imunomodulador assim como do EPA e DGLA é benéfico para auxiliar no tratamento de doenças com propriedades inflamatórias (CALVIELLO et al., 2013.

Além disso, essa regulação demonstra que alterações no metabolismo dos eicosanoides pela alteração na DHA, permite o organismo desenvolver mecanismos endógenos de controle para regular a liberação dos eicosanoides (ANDRADE e CARMO, 2006).

A PG_2 é sem dúvida a mais importante eicosanoide. Ela induz um aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) em leucócitos, linfócitos T e B, além de suprimir respostas inflamatórias e imunes nas células B e T, NK e diminuir a apresentação de antígenos em macrófagos peritoneais (KONING et al., 1997). Além de ser considerado pro-inflamatório na pele por seu efeito de dilatação vascular enquanto que protege a mucosa gástrica e o trato gastrointestinal (MILLER e JACOBSON, 1979).

Modelos experimentais mostram que animais alimentados com dietas ricas

em ácidos graxos ω-3 tendem a diminuir a resposta proliferativa de linfócitos, apresentam diminuição das células NK e prejuízo na fagocitose (POMPEIA et al., 2000).

Foi observado em pesquisa com cães, que a suplementação da dieta com alto teor de ω-3 a partir de fontes marinhas reduziu a produção de LT_{B4} e de neutrófilos dos animais em comparação aos que receberam dieta com óleo de milho (BYRNE et al., 2000).

Em camundongos, foi demonstrado que o DHA é capaz de reduzir sinais de doenças inflamatórias ao aumentar a quantidade de linfócitos T supressores (FoxP3+) (HAN et al. 2015). Isto foi confirmado em outro trabalho, que demonstrou que o uso de DHA aumentou a quantidade de linfócitos CD4+FoxP3+ no fígado de camundongos, por estimular a proliferação destas células. Estes linfócitos produzem mais citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 (IL-10) e TGF-β (LIAN et al. 2015). De acordo com Hjorth et al. (2013) o DHA reduz marcadores inflamatórios ao mesmo tempo em que induz a fagocitose por meio de macrófagos/monócitos M_2.

Em estudo em cães com osteoartrite utilizando óleo de peixe, observou-se aumento no teor de DHA no plasma e no fluido sinovial com uma redução concomitante do AA. Além disso, foram encontradas reduções significativas no líquido sinovial de marcadores genéticos que contribuem para a destruição da cartilagem e biomarcador de inflamação de cães alimentados com a dieta suplementada com esse ω-3 (BAUER, 2007).

A administração de óleo de peixe (18 mg de DHA) em dietas para cães com caquexia e insuficiência cardíaca secundária reduziu os sinais clínicos, visto que houve redução na produção de IL-1. Para os autores apesar destas mudanças de curto prazo ser importantes, as reduções na IL-1 também podem ter benefícios em longo prazo nessa população de cães, pois está correlacionado com a sobrevivência melhorada desses animais (WRIGHT-RODGERS et al., 2005).

Além da deterioração progressiva da função dos tecidos, acredita-se que o estresse oxidativo contribua para mudanças negativas observadas no desempenho cognitivo durante o envelhecimento em cães (HEAD et al., 2008). O DHA e EPA administrados em doses terapêuticas demonstraram diminuir as concentrações de isoprostanos (um tipo de PG) no plasma de indivíduos dismetabólicos (MAS et al., 2010) e em tecidos pulmonares de roedores com inflamação (YIN et al., 2009).

Em indivíduos mais velhos, existem relatos que altas doses de DHA podem

reduzir a atividade das células NK. Além disso, a atividade dos linfócitos T citotóxicos, a proliferação dos linfócitos e a produção de citocinas, principalmente a IL2 e o IFN-γ também sofreram grande influência das dosagens administradas.

De acordo com Perine et al. (2010) o balanço na ingestão destes ácidos graxos, e consequentemente a incorporação dos AGPI na membrana das células imunes, é importante para determinar a severidade do processo inflamatório. No geral os AGPI ω-3 possuem efeitos supressores, como inibição da proliferação de linfócitos, produção de anticorpos e citocinas, expressão de moléculas de adesão e ativação das células NK. No entanto, os AGPI ω-6 possuem ambos os efeitos, tanto inibitório quanto estimulatório da resposta imune (ANDRADE e CARMO, 2006; CALDER et al., 2009).

Portanto, a suplementação com DHA aumenta a incorporação deste ácido graxo na membrana das células imunes, aumentando a produção dos mediadores lipídicos anti-inflamatórios, regulando a resposta à inflamação (SIJBEN e CALDER, 2007).

Tendo em vista que maior aporte dietético de ácidos graxos ω-3 resultaria numa diminuição da concentração de AA na membrana de células envolvidas na inflamação e imunidade, a suplementação com óleo de peixe ou uma microalga, por exemplo, resultaria numa diminuição da capacidade das células imunes em sintetizar eicosanoides a partir do AA.

Dois terços do óleo de peixe são usados em alimentos destinados a humanos e um terço em alimentos para animais, neste último com intuito de suplementação de EPA e DHA. Conforme o aumento na demanda dessas fontes é exigido mais da produção atual. Desta forma, além dos peixes de águas salgadas, novas alternativas como as microalgas vem sendo buscadas, pois podem ser fontes prontamente disponíveis de DHA devido à presença de altos níveis desse ácido graxo em sua composição (KUS e MANCINI-FILHO, 2010).

No entanto, a sua inclusão em rações para animais ainda precisa ser mais abordado, visto que a sua utilização nas formulações poderá melhorar a qualidade nutricional das dietas e a saúde dos animais (SHIELDS e LUPATSH, 2012).

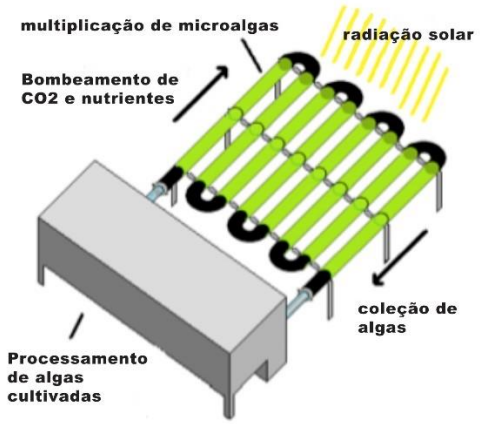
2.4 PRODUÇÃO DAS MICROALGAS

Na busca de fontes alternativas as microalgas passaram a ser exploradas, ganhando espaço na produção comercial devido ao grande potencial de produção de ω-3, rápido crescimento e por possuírem a capacidade de converter luz solar e dióxido de carbono em biomassa durante a fotossíntese (ADARME-VEGA et al., 2012).

Atualmente, 30% da produção de algas no mundo é vendida para aplicações na alimentação animal (SPOLAORE et al., 2006). Apesar da ampla gama de aplicações, a tecnologia disponível para a produção de microalgas ainda é ineficiente (DASSEY e THEEGALA, 2013). Pesquisas vêm sendo desenvolvidas (GUO et al. 2018) com intuito de buscar estratégias para o aumento de escala altamente eficiente e econômica na produção de microalgas.

A alta produção da microalga é realizada em fotobiorreatores (sistemas de culturas fechados), lagoas abertas ou sistemas híbridos, os quais contêm um meio com carbono e nitrogênio, pH e temperatura controlada, além de nutrientes como glicose.

FIGURA 6 – FOTOBIORREATOR DO TIPO TUBULAR.



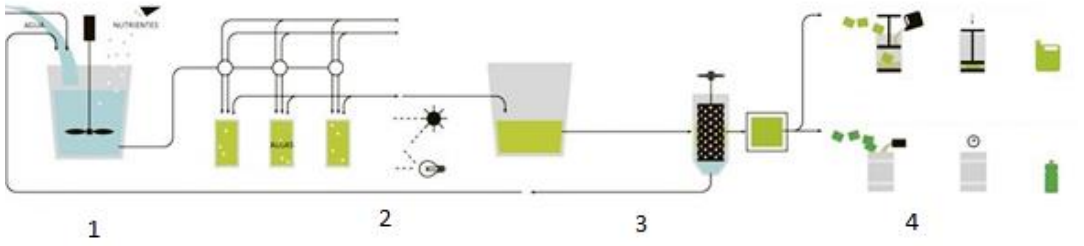
FONTE: Duarte (2013)

Através de filtragem e centrifugação, as células são separadas do meio de cultura e secas. Os lipídeos são extraídos usando um solvente orgânico não miscível em água. Para pequenas escalas é usado o método de Bligh e Dyer, que utiliza clorofórmio e metanol para extrair os lipídeos da célula (BLIGH e DYER, 1959). Já as grandes escalas usam o hexano como solvente. Os ácidos graxos insaturados são separados por destilação fracionada ou “winterization”, método realizado pelo

resfriamento lento de um óleo, onde certos componentes cristalizam e sedimentam, sendo eliminados por filtração. Assim, ao cair a temperatura do óleo, as gorduras saturadas precipitam. Após, são realizados procedimentos de filtragem, branqueamento, desodorização, polimento e adição de antioxidantes para garantir a qualidade dos ácidos graxos essenciais (SUBHADRA e GEORGE, 2011; ADARME-VEGA et al., 2012).

O cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens como a simplicidade de nutrientes necessários, a duplicação da biomassa em um curto período de tempo e a possibilidade de manipular suas condições, de modo a aumentar a produção de um metabólito específico.

FIGURA 7 – ESQUEMA DE UM SISTEMA DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE MICROALGAS.



FONTE: ElodieBrans (disponível em: elodiebrans.wordpress.com)

1.Para o cultivo adiciona-se água e nutrientes para permitir o crescimento das microalgas; 2. É realizado o controle do ambiente para fermentação: com CO_2, luminosidade, pH; 3. Posteriormente é feita a coleta e a secagem a partir de métodos de liofilização e centrifugação, retirando excesso de água e permitindo a elaboração de um bloco de biomassa de microalga; 4. Por seguinte pode ser destinado a elaboração de vários produtos.

Alguns autores relatam que a produção das microalgas é baseada em biorrefinação o qual pode ser um processo que possa reduzir os custos globais de produção (RAWAT et al., 2011).

A extração e refinamento de células inteiras de microalgas resultam em óleos em que o DHA compreende mais de 50% do ácido graxo total para uso como fonte concentrada de ω-3 dietético (HADLEY et al., 2017). Novas tecnologias de fermentação têm permitido a produção de microalgas heterotróficas ricas em DHA com constância de qualidades microbiológica e nutricional em laboratórios e indústrias, além da encapsulação natural da biomassa de células de microalgas, que confere proteção aos seus ácidos graxos contra agentes oxidativos (GANUZA et al., 2008).

A procura pela melhoria da eficiência na produção das microalgas tem sido

constante, especialmente por não existir relatos de que esses organismos produzam produtos químicos, tóxicos ou patogênicos (RYAN et al., 2010). Acreditando, assim, que a produção em larga escala possibilitaria a redução dos custos de produção e reduzindo o preço do produto final (WATTERS et al. 2013).

2.5 MICROALGAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

As microalgas são constituintes importantes de muitos ecossistemas, sendo responsáveis por mais de metade da produção primária total na base da cadeia alimentar mundial (VAN DEN et al., 1995).

Há milhares de anos, as algas eram consumidas por tribos indígenas, mas só no início da década de 50 tornaram-se uma alternativa de nutrientes de fonte sustentável, sendo produzidas em larga escala comercial nos anos 60 (SHEIBEL, 2016).

Microalgas crescem autotroficamente utilizando luz e dióxido de carbono, podendo também ser cultivadas em sistema heterotrófico, usando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou ainda em sistema de cultivo mixotrófico (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004), sendo capazes de se desenvolverem em condições de cultivo bem controladas (ADARME-VEGA et al., 2012).

As microalgas são cultivadas de forma contínua em curto tempo, requerendo pequenas áreas para seu cultivo, cuidados simples, tais como: reposição mineral, controle de pH, luminosidade, sendo que uma das principais vantagens é que em seu cultivo as mesmas dispensam a utilização de agrotóxicos (BERTOLDI et al. 2008). Além disso, as microalgas podem utilizar CO_2 como fonte de carbono para se multiplicarem e produzirem compostos de interesse. Assim, auxiliam na diminuição dos níveis de CO_2 do ar, os quais são responsáveis pelos efeitos do aquecimento global.

Embora as microalgas sejam geneticamente um grupo de organismos muito heterogêneo, possuem grande diversidade de fatores fisiológicos e bioquímicos. As espécies mais importantes são *Arthrospira* (anteriormente *Spirulina*, algas azul-verde), *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematocusus*. Além disso, para a produção de ácidos graxos ω-3, organismos heterotróficos marinhos, como *Crypthecodinium*, *Schizochytrium* e *Ulkenia*, são usados.

As microalgas possuem um potencial de produzir compostos energéticos

importantes a partir da sua eficiência no aproveitamento da energia solar superando até mesmo organismos superiores como as plantas. Essa característica provocou uma pesquisa em constante expansão sobre a utilização desta biomassa para alimentos e rações, bem como para biocombustíveis (CHEW et al., 2017).

As microalgas são uma fonte rica de quase todos os minerais importantes como o cobre, iodo, ferro, potássio e zinco, além de serem abundantes em vitaminas A, B1, B2, B6, B12, C, E, niacina, nicotinato, biotina e ácido fólico (CHRISTAKI et al., 2011). Além disso, esses organismos podem ser uma excelente fonte de carotenóides. De acordo com Aki et al. (2003) as microalgas heterotróficas, têm o potencial para produzir β-caroteno e a astaxantina. Para alguns autores o teor de nitrogênio no meio de cultivo é um fator determinante sobre a produção dessas substâncias lipofílicas (HONG et al., 2011). Portanto, é possível aumentar a produção de carotenóides nesses microorganismos que atuam como antioxidantes naturais em produtos alimentares.

No geral, a introdução de biomassa de microalgas em alimentações pode fornecer vitaminas, aminoácidos essenciais, polissacarídeos, ω-3 e ω-6, minerais e pigmentos (PRIYADARSHANI e RATH, 2012). Algumas microalgas geralmente apresentam elevado teor de proteínas, além de possuir alta digestibilidade (SARKER et al., 2016). Além disso, o conteúdo lipídico das células das microalgas pode chegar até a 90% de peso seco.

Muitas microalgas são importantes fontes de AGPI, principalmente EPA e DHA, pois esses organismos possuem a enzima Δ-4-dessaturase, que transforma diretamente o 22:5 ω-3 em DHA (APPOLINÁRIO et al., 2011). Algas como as *Dunaliella* sp., *Crythecodinium conhii*, *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Schizochytrium limacinum*, e *Thraustochytrium* conseguem acumular um teor entre 30 a 40% de DHA e EPA. Algumas cepas de algas têm alto teor de óleo e a porcentagem de lipídeos totais varia entre 30 a 70% do peso seco (ADARME-VEGA et al., 2012).

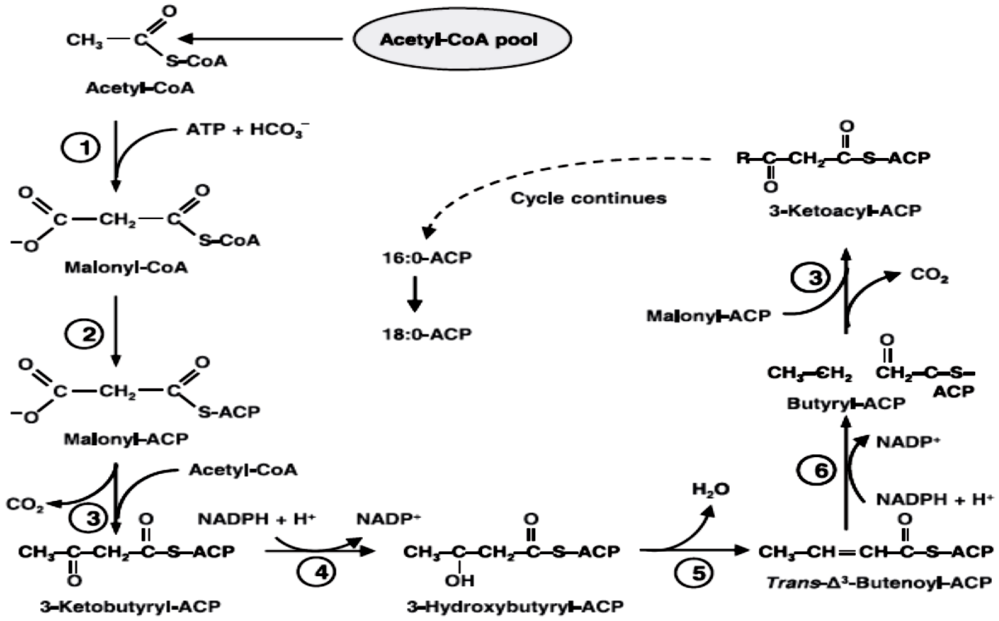
A síntese dos ácidos graxos realizado pelas microalgas ocorre no estroma do cloroplasto. A sintetize de DHA em geral se estabelece por meio de policetido-sintase anaeróbica (PKS), em que o baixo oxigênio dissolvido favorece a produção desse ácido graxo (CHANG et al., 2013). A via metabólica de síntese produz uma cadeia de 16 ou 18 carbonos, utilizados para formação de organelas, membranas e Triacilglicerois (TAG), que são incorporados em lipídeos e se acumulam de acordo

com as condições ambientais (HU et al., 2008; ADARME-VEGA et al., 2012).

A biossíntese tem início na carboxilação do acetil-CoA convertidos para malonil-CoA, reação catalisada por acetil-CoA carboxilase (ACCase) para formar acetato ou piruvato. Em algas, no cloroplasto, o fosfoenolpiruvato (PEP) se transforma em piruvato, através de uma reação irreversível, catalisada pela piruvato quinase (PK). O piruvato é o principal produto da fotossíntese que será convertido em acetil-CoA, para então ser transformado em ácido graxo. Esta reação é catalisada por um complexo enzimático único. O próximo passo é dependente de adenosina trifosfato (ATP) e de dióxido de carbono (proveniente do HCO_3), que são transferidos para um grupo prostético da biotina (vitamina H), e a carboxiltransferase faz o papel de um catalisador, ativando a reação, onde o dióxido de carbono é transferido para a biotina a partir do acetil-CoA, formando o malonil-CoA, e este produto proveniente da reação de carboxilação é que irá doar carbono para síntese de ácidos graxos. O malonil é transferido do CoA com a ajuda de um co-fator da acilo proteína transportadora (ACP) para glicerol-lipídeos ou exportados do cloroplasto. Esse grupo malonil e o acilo da ACP atuam em várias reações de condensação, onde um produto de quatro carbonos é catalisado pela enzima β-cetoacil-ACP-sintase III (ACP III ou KAS III) e condensado. Já a β-cetoacil-ACP-sintase I (KAS I) é responsável por produzir cadeias de vários comprimentos (6 a 16 átomos de carbono) (HU et al., 2008).

Em seguida, cada condensação ocorre mais reações. É formado um ácido graxo saturado a partir da ACP β-cetoacil, que então é reduzido pela enzima ACP redutase β-cetoacil, desidratado por desidratase ACP hidroxiacil e depois reduzido por enoil ACP redutase, proporcionando o alongamento com mais dois átomos de ácido graxo precursor. Desta forma, são transferidos então para um glicerol-3-fosfato no retículo endoplasmático por meio do metabolismo intermediário do ácido fosfatídico e lá terminam de ocorrer reações de elongação e dessaturação, sendo sintetizado ácido graxo saturado 16:0 e 18:0 e introduzida uma dupla ligação para formar um ácido graxo insaturado (HU et al., 2008; ADARME-VEGA et al., 2012). A figura 5 resume a síntese dos ácidos graxos nas microalgas.

FIGURA 5 – SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS REALIZADO NO CLOROPLASTO DAS CÉLULAS DAS MICROALGAS.



FONTE: Hu et al., (2008)

Acetil-CoA entra na via como um substrato para a acetil-CoA carboxilase (reação 1), bem como um substrato para a reação de condensação inicial (reação 3). Reação 2 é catalisada pela malonil-CoA: ACP-transferase e transferências de malonil-CoA para formar malonil-ACP. A malonil ACP doa carbono para as reações subsequentes de alongamento. Depois de condensações subsequentes, o produto β-cetoacil ACP é reduzida (reação 4), desidratada (reação 5) e reduzida outra vez (reação 6) pelo ACP redutase β-cetoacil, desidratase ACP β-hidróxiacil e enoil ACP redutase, respectivamente (HU et al., 2008).

As microalgas como recurso de sobrevivência utilizam a fotossíntese, para produzir e estocar carboidratos e lipídeos (SUN et al., 2014). Segundo Ishida (2000), a baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento das microalgas e a adição de dióxido de carbono no meio de cultivo pode aumentar até sete vezes a produtividade.

A produção de até 30% da alga mundial atual é destinada para aplicações de alimentação animal e inclui como espécies predominantes: *Schizochytrium* sp., *Chlorella* sp., *Arthrospira* sp*., Isochrysis* sp. e *Porphyridium* sp. O uso de pequenas quantidades de biomassa de microalgas na ração pode beneficiar a fisiologia dos animais, melhorando a resposta imune, resistência a doenças, ação antiviral e antibacteriana, função intestinal e estimulação de colonização probiótica (BECKER, 2004).

Neste contexto, a produção de AGPI por microalgas marinhas é objeto de intensa pesquisa e aumento da atenção comercial (SIJTSMA e SWAAF, 2004). Visto que os derivados de peixes, fonte geralmente usual, têm-se tornado atualmente

inconsistentes e limitadas por depender das espécies, estação/clima, localização geográfica dos locais de captura, qualidade dos alimentos consumidos, e do nível da contaminação por poluentes ambientais.

Desta forma, as microalgas se inserem nesse cenário tornando-se uma alternativa (SANTOS, 2015), ganhando espaço devido ao acelerado crescimento e ao grande potencial de produção de ω-3.

A utilização das microalgas vem sendo direcionado para muitos tipos de animais: gatos, cães, peixes ornamentais, equinos, aves, ovinos e bovinos; destacando neste domínio as microalgas *Spirulina* e, em certa medida, *Chlorella* (SPOLAORE et al., 2006). No entanto, estudos sobre a inclusão desse organismo em rações para animais ainda precisa ser mais abordado (SANTOS, 2015).

Em peixes a incorporação de microalgas torna-se alternativa promissora devido às qualidades nutritivas e alta digestibilidade, podendo ser aplicada em várias fases de desenvolvimento do animal (CASPARI, 2012). Em camarões, a inclusão de farinha de microalgas em rações peletizadas estimulou o consumo, melhorando o ganho de peso (SILVA-NETO et al., 2012).

As aves caipira destacam-se como o animal doméstico alvo para o uso de microalgas como ingredientes para dietas, principalmente porque oferece a visão mais favorável para seu uso comercial (BECKER, 2007).

Em frangos de corte a inclusão na dieta de *Sargassum* aumentou os ácidos graxos poliinsaturados e os ácidos graxos ω-3 na carne, melhorando a sua qualidade (EL-DEEK et al., 2011). Em galinhas poedeiras, a inclusao de níveis de 3% a 6% de *Sargassum dentifolium*, foi benéfico para a qualidade do ovo, diminuindo o colesterol da gema, os triglicerídeos e os ácidos graxos ω-6 (AL-HARTHI e EL-DEEK, 2012). O uso da *Chlorella vulgaris* em dieta de pato exibiu benefícios na produtividade (OH et al., 2015).

Uma melhora mínima no desempenho do crescimento de suínos foi relatada por Grinstead et al. (2000) a partir de dietas contendo 0,2-2% de *Arthrospira platensis*. Os autores afirmam que o estado de saúde dos suínos e processamento de alimentos (pellets) podem ser fatores que afetam a eficácia da microalga como suplemento alimentar. Em leitões desmamados, a suplementação de 1% da microalga *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgar* apresentou um efeito potencial no desenvolvimento intestinal, e em particular a *Chlorella* por gerenciar distúrbios digestivos leves sem comprometimento da digestibilidade dos nutrientes (FURBEYRE et al., 2017).

Em gatos, dietas com níveis crescentes de 0,14% e 0,12% da microalga *Schizochytrium* sp. rica em DHA permitiu efeitos positivos na recuperação pós cirúrgico de gatos castrados (SHEIBEL, 2016).

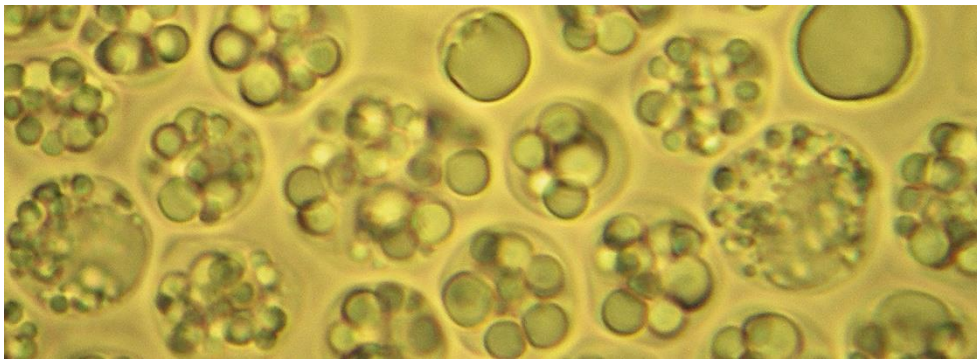
Becker (2007) ressalta que os ruminantes são modelos adequados para alimentação com microalgas, pois possuem a capacidade de digerir uma parede celular desses organismos que muitas vezes não são processadas. É por isso que, nos últimos anos, as microalgas foram utilizadas na dieta desses animais com o intuito de enriquecer seus produtos, em particular a carne, com ω-3.

No entanto, atendendo ao grande número de espécies de microalgas, uma caracterização bioquímica completa é essencial para escolher a microalga mais adequada para aplicações específicas de tecnologia de alimentação, como suplementos em novas dietas de animais (BATISTA et al., 2013). Neste contexto, devido em grande parte aos seus perfis metabólicos únicos e diversos, as microalgas têm tornado-se uma das fontes mais promissoras para serem introduzidas nas dietas animais (BRENNAN e OWENDE, 2010).

2.6 MICROALGA *Schizochytrium* sp.

A microalga *Schizochytrium* sp (Figura 8) é pertencente ao reino *Stramenopilia*, filo *Heterokonta*, classe *Thraustochytrida*, ordem *Thraustochytriales*, família *Thraustochytriaceae*, gênero *Schizochytrium* (LEIPE et al., 1994).

FIGURA 8 – IMAGEM MICROSCÓPICAS DA MICROALGA *Schizochytrium* sp.



FONTE: Smart microfarms (disponível em: smartmicrofarms.com)

É um organismo fortemente fermentável, unicelular esférico, possui parede celular e produz zoósporos (AKI et al., 2003). Apresenta alta taxa de crescimento (divisão binária) sendo de fácil cultivo (WU et al., 2005) o qual foi introduzida no

mercado comercialmente (YOKOYAMA e HONDA, 2007).

A microalga *Schizochytrium* sp. têm demonstrado facilidade em crescer rapidamente em cultivos heterotróficos. Geralmente, um organismo utilizado para produção heterotrófica deve possuir as seguintes características: (1) habilidade para se dividir e metabolizar na ausência de luz; (2) possibilidade de crescer em meio de baixo custo; (3) facilidade para se adaptar rapidamente em novos ambientes e (4) capacidade para resistirem a stress hidrodinâmico na fermentação (WEN e CHEN, 2003)

Schizochytrium sp. é cultivado utilizando métodos de fermentação (BAYNE et al., 2013). É considerado um organismo altamente eficiente em consumir nutrientes na presença de baixos níveis de oxigênio dissolvido, com uma taxa de pico relatada de 9 dobras por dia, o que se traduz em mais de 200 g/l de biomassa seca acumulada em menos de 4 dias (BERCLAY et al., 2005). Dez toneladas por ano de óleo foi produzido usando *Schizochytrium*, após cultura em volumes maiores que 150.000 litros de mídia totalmente definida (RATLEDGE, 2004; BAILEY et al., 2010). Esta produtividade se traduz ainda em menores custos materiais, energéticos e trabalhistas por massa unitária produzida em fermentadores, em comparação com muitos outros sistemas eucarióticos baseados em células.

A microalga *Schizochytrium* sp. é uma fonte rica em AGPI, incluindo o DHA. Segundo Chisti (2007) a quantidade de lipídeos presentes na *Schizochytrium* sp. está em torno de 50 a 77% e a quantidade de DHA no óleo extraído dessa alga é cerca de 40%, tornando-se promissora como fonte de ω-3 (MILLER et al., 2007). Estes mesmos autores ao compararem a adição de 13,0% de óleo de peixe com 13,0% de óleo de microalga *Schizochytrium* sp. na dieta de salmão do Atlântico, observaram aumento de DHA na carne dos animais de 12,8% e 23,4% respectivamente.

Devido ao seu alto valor nutricional, a *Schizochytrium* sp. vem sendo empregada em vários setores da aquicultura como, por exemplo, na alimentação de larvas de peixes (BARCLAY e ZELLER, 1996). Li et al (2009) trabalhando com a *Schizochytrium* sp. em dietas para o bagre-americano (*Ictalurus punctatus*) concluíram que a utilização dessa microalga ao nível de 1,5% proporciona maior ganho de peso dos peixes e melhora a eficiência alimentar. Em outro estudo, a inclusão dietética com 6% de alga *Schizochytrium* sp. melhorou o crescimento do pepino de mar juvenil (ANISUZZAMAN et al., 2017).

Em estudo realizado com juvenis de perca jade (*Scortum barcoo*),

Hoestenberghe et al. (2014) avaliaram a inclusão de três fontes de óleo (óleo de peixe, óleo de linhaça e óleo de *Schizochytrium* sp.) na dieta desses animais. Os autores concluíram que pequenas quantidades da microalga proporcionaram igual desempenho quando comparado ao tratamento com farinha de peixe e melhor ganho de peso e conversão alimentar em relação ao tratamento com óleo de linhaça.

A inclusão da *Schizochytrium* sp. na dieta de suínos machos desmamados a níveis cinco vezes a dose comercial recomendada (261 g de DHA) aumentou a ganho diário e a taxa de conversão alimentar (ABRIL et al., 2003). Estudos realizados por Sardi et al. (2006) e Vossen et al. (2016) utilizando a mesma espécie, mostraram que o teor de DHA dos produtos de carne aumentou significativamente adicionando níveis moderados da microalga *Schizochytrium* sp. na dieta.

Embora não consensual essa fonte de ω-3 pode afetar positivamente no desempenho produtivo dos frangos de corte, levando a uma melhoria no peso corporal final e ganho de peso corporal (YAN e KIM, 2013).

O uso de *Schizochytrium* sp. em dietas para cães em conjunto com a suplementação dietética utilizando antioxidantes, incluindo β-caroteno e tocoferol, tem sido associada a função cognitiva melhorada nos animais (DE RIVERA et al., 2005). É importante salientar que as atividades antioxidantes variam entre as microalgas (LI et al., 2007)

Sarker et al. (2016) afirmam que a *Schizochytrium* sp. pode ser utilizada em substituição ao óleo de peixe, pois apresenta altos teores de AGPI (particularmente DHA) e coeficiente de digestibilidade de lipídeos (97,5%) superior ao óleo de peixe.

Efeito sobre o sistema inflamatório foi observado por Lopes et al. (2017) em estudos com *Schizochytrium* sp. em relação a função neurológica de ratos Wistar, o qual os animais que receberam alimentação com essa microalga apresentaram aumento na produção de interleucina 6 (IL-6).

A inclusão de *Schizochytrium* sp. como ingrediente na alimentação seca pode apresentar novos desafios no processo de extrusão de ração (SAMUELSEN et al., 2017). Para estes mesmos autores a utilização dessa microalga pode produzir efeitos de processamento favoráveis em relação à melhora na plasticidade geral e à qualidade física dos extrusados. No entanto, pesquisas avaliando extrusados contendo *Schizochytrium* sp. (50 g/kg de dieta nível de inclusão) apresentaram redução da durabilidade dos grânulos em comparação com uma dieta sem microalgas (KOUSOULAKI et al., 2016).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características nutricionais apresentadas pela alga *Schizochytrium* sp., especialmente por ser uma fonte prontamente disponível de DHA, a torna um ingrediente de alto potencial na utilização para nutrição de cães.

Os beneficios obtidos pelo DHA, principalmente os destinados a controle de processos inflamatórios, podem ser promissores para manutenção da saúde e qualidade de vida desses animais, que são características almejadas pelos tutores.

Embora os teores de DHA sejam bastante elevados na microalga *Schizochytrium* sp. e que o seu potencial como ingredientes em dietas para animais seja demonstrado em algumas espécies, deve-se ter mais informações referentes à digestibilidade e a qualidade nutricional desse ingrediente na dieta de cães, além do seu efeito nos processos fisiológicos e imunológicos, sendo necessários mais estudos.

MICROALGAE *Schizochytrium* sp. AS A SOURCE OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA): EFFECTS ON DIET DIGESTIBILITY, OXIDATION AND PALATABILITY AND ON IMMUNITY AND INFLAMMATORY INDEXES IN DOGS

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the effects of the microalgae *Schizochytrium* sp., as a dietary source of docosahexaenoic acid (DHA), on apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients and metabolizable energy (ME), and dog blood variables and indicators of immunity and inflammation. We also evaluated diet palatability and oxidative stability. Two diets containing 0 and 0.4% of microalgae *Schizochytrium* sp. were evaluated in 3 experiments. In Experiment I test diets were offered for 30 days to 12 randomly distributed adult Beagles to determine digestibility, faecal characteristics, blood parameters, and gingivitis. Blood samples were taken at the end of the 30-day test period to determine biochemical profile, erythrogram, leukogram, phagocytic activity, and suppressor lymphocytes (CD4). Gingivitis score and area were analysed on days 0 and 30. On Experiment II palatability of diets containing 0 vs 0.4% microalgae was compared using 16 adult dogs. In Experiment III, the oxidative stability of diets containing 0.8% microalgae *vs* 0.4% anchovy oil was evaluated. Metabolizable energy and ADC of nutrients increased ($P<0.05$), except for ether extract after acid hydrolysis, with the inclusion of the microalgae in diet. There was no effect on faecal characteristics ($P>0.05$). There was no change ($P<0.05$) in the biochemical profile, erythrogram, leukogram or CD4 suppressor blood lymphocytes. However, the amount of monocytes and phagocytic granulocytes was greater ($P<0.05$) in dogs fed 0.4% microalgae. There was a greater intake ratio of the diet containing microalgae ($P<0,05$). There was greater oxidative stability for the sample containing microalgae compared to the sample containing anchovy oil. The addition of 0.4% dietary microalgae increased digestibility of the nutrients and the ME. In addition, microalgae increased phagocytic cell numbers, reduced the area of gingivitis, presented high palatability, and demonstrated oxidative stability superior to anchovy oil.

Keywords: algae; immunity; inflammation; lipids; omega 3.

1 INTRODUCTION

Studies on companion animal nutrition have been seeking to increase the longevity and life quality of dogs and cats. In order to optimize nutritional status and to meet nutritional requirements, a variety of ingredients are utilized. In this context, polyuunsaturated fatty acids (PUFA) are important nutrients, being essential to growth and survival of dogs as well as providing an energy source.

Inclusion of omega 3 (ω-3) PUFA in diets can improve nutritional quality profiles and are able to modulate inflammatory response. The eicosapentaenoic (EPA, 20:5, ω-6) and docosahexaenoic (DHA, 22:6, ω-3) fatty acids are of special importance. These compounds are precursors of eicosanoids (prostaglandins, leukotrienes, thromboxanes, and prostacyclins) with less inflammatory action (CALDER, 2012) and resolvins and protectins, which reduce inflammation (VAN DYKE, 2011).

Studies in dogs and other species have shown DHA to modulate the inflammatory response, neurodevelopment, improvement in cognitive ability and in the immune system, in addition to reducing gingivitis. Considering that the conversion of alpha-linolenic acid to DHA is inefficient in dogs (BAUER, 2007), dietary sources are necessary. The main DHA sources are marine and cold-water fish oil (KUS and MANCINI-FILHO, 2010). However, the availability of these traditional sources is becoming limited, due to species seasonality, contamination of natural fish environments, and higher levels of vegetable-based diets fed to farmed fish. Therefore, alternative sources should be investigated (LENIHAN-GEELS et al., 2013).

Microalgae such as the genus *Schizochytrium* are potential alternatives to conventional PUFA sources, given their nutritional value and high DHA concentration (approximately 18%). In addition, microalgae do not have seasonal variation, do not generate marine pollution, present high productive potential and may have lower processing costs compared to fish (JUNWEI et al., 2015). However, further studies are needed regarding the stability of microalgae DHA for commercial use, in addition to effects on the gastrointestinal system, blood parameters, immunity and inflammatory processes of dogs.

The objectives of this study were to evaluate the apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients, metabolizable energy (ME), faecal characteristics, blood and immunity variables, gingival inflammation index, and diet palatability in dogs

fed microalgae *Schizochytrium* sp. as a source of DHA. Furthermore, the oxidative stability of diets containing microalgae or anchovy oil was compared.

2 MATERIAL AND METHODS

Three experiments were approved by the Committee of Ethics on Animal Use of the Agrarian Science Section of the University Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brazil, under protocol number 027/2017. Experiments I and II presented the same diet, facilities and animal health conditions.

2.1 ANIMALS AND FACILITIES

Twelve healthy adult Beagle dogs (six males and six females) with average body weight of 10.3 ± 1.7 kg were used in this study. The animals were individually housed in concrete kennels (5 x 2 m) with shelter and solarium during a 31-d period.

2.2 DIETS

Two test diets based on a commercial dry extruded diet for adult dogs (with absence of rich ingredient in DHA) were compared: control (no microalgae) and test (0.4% *Schizochytrium* sp. microalgae, ALL-G RICH®, Alltech Inc, Lexington, USA). The diet contained the following ingredients: poultry byproduct meal , meat meal, ground whole corn, soybean meal, poultry fat, hydrolyzed swine liver, sodium chloride, citric acid, antioxidants (BHA, BHT) , propionic acid, vitamin A, vitamin D3, vitamin E, vitamin B1, vitamin B6, vitamin B12, vitamin K3, nicotinic acid, folic acid, biotin, calcium pantothenate, zinc sulfate, calcium iodate, sodium selenite, sulfate copper, iron sulfate, manganese monoxide, manganese sulfate and zinc oxide. The analysed chemical composition of diets is described in Table 1.

TABLE 1 – ANALYSED CHEMICAL COMPOSITION (% DRY MATTER) OF EXPERIMENTAL DIETS.

Item	0% microalgae	0.4% microalgae
Dry matter	92.13	91.93
Crude protein	20.71	21.35
Ether Extract in acid hydrolysis	8.02	9.12
Asher	5.98	6.38
Crude Fiber	1.25	1.38
Gross Energy	4370	4470
Calcium	0.89	0.89
Phosphorus	0.51	0.55

Enrichment per kg of product: vitamin A (retinol) = 20,000 IU; vitamin D3 = 2,000 IU; vitamin E (alpha-tocopherol) = 48 mg; vitamin K3 = 48 mg; vitamin B1 = 4 mg; vitamin B2 = 32 mg; pantothenic acid = 16 mg; niacin = 56 mg; choline = 800 mg; Zn zinc oxide Zn = 150 mg; Fe as ferrous sulphate = 100 mg; Cu as copper sulfate = 15 mg; I, such as potassium iodide = 1.5 mg; Mn as manganese oxide = 30 mg; Se as selenite sodium = 0.2 mg; antioxidant = 240 mg.

Prior to each feeding, 0.4% microalgae was weighed with a digital scale (MH-Series, PocketScale) and subsequently added and manually homogenized in the diets to supplement ~560 mg of DHA/kg. There was no record of leftover diets and incidence of vomiting. The microalgae physical characteristics were a finely ground powder. Its chemical composition is shown in Table 2.

TABLE 2 – CHEMICAL COMPOSITION OF THE MICROALGAE *Schizochytrium* sp.

Item	(% dry matter)
Moisture	3.70
Crude protein	9.53
Ether extract in acid hydrolysis	68.6
Docosahexaenoic acid (DHA)	18.66
Eicosapentaenoic acid (EPA)	0.19
Crude fiber	0.90
Ash	3.67
Calcium	0.34
Phosphorus	0.47

2.3 EXPERIMENT I: DIGESTIBILITY, BLOOD PARAMETERS AND GINGIVITIS

2.3.1 Experimental procedures

Dogs were fed the experimental diets twice daily (8:00 a.m. and 3:30 p.m.) in sufficient amounts to meet ME needs as recommended by the National Research Council (NRC, 2006): MEN (kcal/day) = 130 · body weight $^{0.75}$. Water was offered *ad libitum*.

Between the 25th and 31st experimental days all faeces were collected twice a day. Stool collection followed the recommendations of Association of American Feed

Control Official (AAFCO, 2004). Faeces were weighed and frozen (-14ºC) in individual containers, identified, and pooled by animal. After the collection period, the faeces were thawed, homogenized and dried in a forced air ventilation oven (320-SE, Fanem, São Paulo, Brazil) at 55ºC for 48 h. After drying, faeces and diets were ground to 1 mm sieve in a Willey hammer mill (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA) and analysed for dry matter at 105°C (DM105). After 12 h, crude protein (CP, method 954.01), crude fiber (CF, method 962.10), ether extract in acid hydrolysis (EEAH, method 954.02) and ash (method 942.05), according to AOAC (1995). Gross energy (GE) was determined in a bomb calorimeter (Parr Instrument Co., model 1261, Moline, IL, USA).

2.3.2 Faecal characteristics

Faecal characteristics were evaluated by total faecal dry matter (DMf), faeces production (g faeces/g DM intake/5 days), faecal score, ammonia concentration, pH and sialic acid. Faecal pH and ammonia concentration were measured in faeces collected at a maximum of 15 min after defecation. The faecal score was always evaluated by the same researcher, using the following 1 to 5 scale: 1 = watery faeces; 2 = soft and unshaped stools; 3 = soft, shaped and moist stools; 4 = well-shaped and uniform stools; 5 = well-shaped, hard and dry stools, according to Carciofi et al. (2009).

Faecal pH was measured using a digital pHmeter (331, Politeste Instrumentos de Teste Ltda, São Paulo, SP, Brazil) in 3.0 g of fresh feces diluted in 30 ml of distilled water. The concentration of ammonia in faeces was determined according to Felix et al. (2013). For analysis of sialic acid, faeces were lyophilized (Alpha 1-4 LO plus, Christ, Osterodeam Hans, Germany) and the analysis done according to Jourdian et al. (1971).

2.3.3 Blood Collection and analysis

Blood collection was performed on the 31st experimental day. Prior to the procedure dogs fasted for 12 h with water allowed for 8 h. Four ml of blood was collected from jugular with anticoagulant (EDTA) for evaluation of the complete blood count (erythrogram and leukogram) and flow cytometry and 2 ml of blood was collected without anticoagulant for serum analysis (biochemical profile using commercial

chemical kit Dialab® and the B5-200 equipment; Mindray Chemistry Analyzer). The blood parameters analysed were: erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean globular hemoglobin concentration (MGHC), leukocytes, eosinophils, lymphocytes, platelets, total plasma protein (TPP), cholesterol, alkaline phosphatase, triglycerides, urea, and alanine. For cell counts, the slides were stained by the rapid panotype method.

For analysis of immunosuppressive and phagocytic activity, 2 ml of blood were treated as modified by Beirão et al. (2012). Basically, 1000 µl of whole blood was purified on histopaque for leukocyte isolation. Cells were permeabilized to allow intracellular labeling with FoxP3. One million cells were incubated for 30 min (37°C) with the specific antibodies and fixed with paraformaldehyde for 30 min at 4°C, then packed into cytometry tubes in final volume of 2 ml PBS.

The phagocytosis analysis after cell purification involved incubation of leukocytes with the pHrod reagent for 30 min at 37°C before being fixed. The samples were analysed on a FACS Calibur (FACS Calibur, Becton Dickinson and Co, Franklin Lakes, New Jersey, USA) equipped with argon laser. Suppressor lymphocytes were identified by fluorescence in green (CD4 cells) and yellow (FoxP3 cells). The phagocytes were separated for cellular granularity (CSS) in monocytes or granulocytes. The percentage of phagocytic cells of green color was calculated. The intensity of phagocytosis was measured as the mean fluorescence intensity.

2.3.4 Gingival index

The gingival index was determined by evaluating the score and area of gingivitis in the oral cavity on days 0 and 30 of the experiment. Prior to the analysis, the area was cleaned gently with cotton wool on the surface of the crown of the teeth. Gingival inflammation score was always performed by the same evaluator, who was unaware of the treatments. The marks from 0 to 3 were attributed, being: 0 = absence of inflammation; 1 = mild inflammation (slight change in color and texture, no bleeding at probing); 2 = moderate inflammation (redness, edema and hypertrophy, bleeding at probing); 3 = severe inflammation (marked redness and hypertrophy, spontaneous bleeding, ulceration) according to Loe and Silness (1963).

To measure the gingivitis area, photos with a resolution of 2364x1728 were taken, with the distance of the camera relative to the teeth proportional to the desired

visual field. The scanned images were treated by the ImageJ® program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) using mainly threshold and tools to measure the inflamed gingiva area (characterized by more intense red).

2.3.5 Calculations and statistical analyses

The organic matter (OM) was calculated as: 100 - Ash and the original faecal dry matter obtained by: (DM55 · DM105)/100. The ME was estimated according to AAFCO (2004):

ME (kcal g^{-1}) = {kcal g^{-1} GE intake - kcal g^{-1} GE faecal excretion - [(g CP intake - g CP faecal excretion) · 1.25 kcal g^{-1}]} /g feed intake.

Based on the laboratory results obtained, apparent digestibility coefficients (ADC) of the diets were determined according to the following equation:

ADC% = [(g of nutrient intake – g of nutrient excretion) / g of nutrient intake] · 100.

The experiment was in a completely randomized design, with two treatments of six replicate dogs each. Data were previously analysed for their normality by the Shapiro Wilk test at 5% probability. Data with normal distribution were evaluated by the Student t-test ($P<0.05$) and the non-parametric data were analysed by the Mann-Whitney test at 5% probability.

The formulation of immuno-suppressive phagocytic and CD4 activity figures were performed by GraphPad Prism 6 software.

2.4 EXPERIMENT II: PALATABILITY TRIAL

2.4.1 Animals and tests

Sixteen adult Beagle dogs (1.5 years old), eight males and eight females were used in a palatability trial. Palatability was measured using a 2-plate test, totaling 32 observations, using diets containing 0 or 0.4% microalgae. The test was performed for two consecutive days. The two foods were offered simultaneously to the dogs once a day (08:00 hours). The amount supplied was 30% higher than the recommendations of the NRC (2006) for the maintenance of adult dogs. Once one of the diets was completely consumed, both bowls were withdrawn and the amount remaining

quantified. The relative position of bowls was alternated on the second day of the experiment so that the animal was not conditioned to the feeding site.

Palatability test was determined using the intake ratio and the first choice between the diets offered to the dogs. The first choice was defined by noting the first bowl that the animal approached. To determine the intake ratio, the quantities supplied and remaining were quantified using the following equation:

Intake ratio = g of diet A or B intake / g of total food consumed (A + B) · 100.

2.4.2 Statistical analyses

Data were analysed according to a completely randomized design. Intake ratio results were compared by the paired Student's t-test at 5% significance and the first choice by the 5% Chi-square test, totaling 32 replicates per test (16 dogs, 2 days of evaluation).

2.5 EXPERIMENT III: OXIDATIVE STABILITY

Two 200 g samples of the control diet were collected (Table 1). In each sample, the amount of microalgae or anchovy oil (DHA min.12%, EPA min 18%, ω-3 min 35%) was added so that the samples had the same EEAH content at the end.

The oxidative stability of the samples was evaluated according to the MA - 0.80 method (ML Oxipres, Instruction Manual, version 2009.02.01, Mikrolab Aarhus A / S) using the OXIPRESTM equipment (Microlab Aarhus, Denmark), consisting of a control unit, one heater block and two pressure vessels. The conditions established by the equipment were of temperature 30-150 º C and maximum pressure of 1Mpa. The estimated period of induction of dietary oxidation in days was evaluated.

3 RESULTS

3.1 EXPERIMENT I: DIGESTIBILITY, BLOOD PARAMETERS AND GINGIVITIS

3.1.1 Digestibility and faecal characteristics

Dogs totally consumed the diets. There were no episodes of vomiting or diarrhea. The diet with 0.4% microalgae *Schizochytrium* sp. presented higher ADC of DM, CP, GE, OM and ME, when compared to the control diet (P<0.05). However, there was no difference (P>0.05, Table 2) in relation to the ADC of the EEAH.

Microalgae supplementation did not change faecal characteristics of the dogs (P>0.05). However, there was a tendency (P = 0.062) for lower faecal production (DM) in dogs fed the diet containing microalgae (Table 3).

TABLE 3 – MEANS OF APPARENT NUTRIENT DIGESTIBILITY COEFFICIENTS (ADC) AND METABOLIZABLE ENERGY (ME, KCAL/KG) OF DIETS AND FAECAL CHARACTERISTICS OF DOGS FED WITH 0 AND 0.4% OF MICROALGAE *Schizochytrium* sp.

Item	0% microalgae	0.4% microalgae	SEM†	P€
Apparent digestibility coefficients [%]				
Dry matter	76.9	80.9	1.04	0.049
Ether extract	87.5	88.9	0.76	0.379
Crude protein	74.8	82.3	1.40	0.001
Gross energy	81.5	84.8	0.85	0.049
Organic matter	81.7	85.8	1.08	0.051
ME	3551.6	3775.4	45.43	0.005
Faecal characteristics				
Sialic acid [mg]	0.613	0.607	0.034	0.380
Faecal dry matter [%]	32.78	34.50	0.780	0.292
pH	6.11	6.10	0.036	0.881
Ammonia [%]	0.064	0.075	6.070	0.356
Fecal production*	0.115	0.097	5.052	0.062
Faecal score ‡	3.84	3.61	0.081	0.154

*Fecal production (g faeces / g DM intake / 5 days); ‡ Fecal score = 1 (liquid stools) to 5 (dry stools); †SEM: Standard error of the mean; €P: Probability by Student t-test (p<0.05).

3.1.2 Blood parameters

There were no differences in the biochemical profile, erythrogram and leukogram in dogs given 0.4% microalgae and controls (P>0.05). All blood variables remained within the normal range for dogs (Table 4).

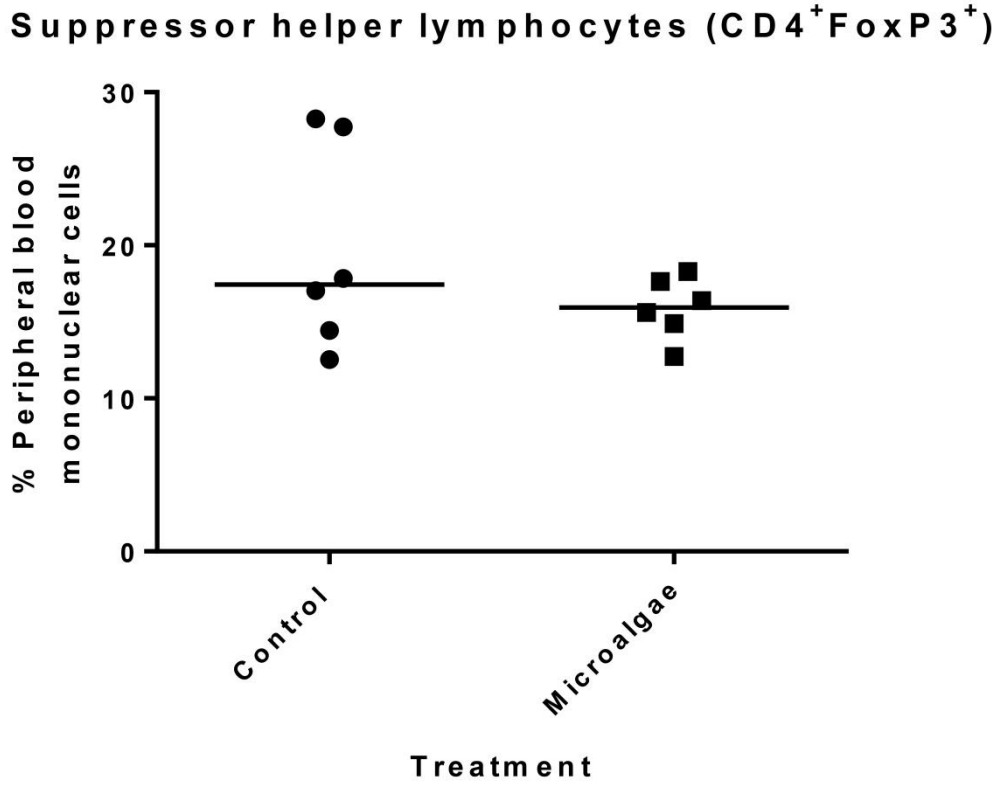
TABLE 4 - AVERAGE (1ST AND 3RD QUARTILES) OF BLOOD PARAMETERS OF DOGS FED DIETS CONTAINING 0 AND 0.4% OF MICROALGA *Schizochytrium* SP.

	0% *Schizochytrium*	0,4% *Schizochytrium*	P[1]
Biochemical profile			
Cholesterol (mg/ dL)	145,0(136,0/166,0)	147,0 (137,2/163,2)	0,976
Creatinine mg/ dL)	0,90 (0,90/0,90)	0,85 (0,80/0,92)	0,522
Phosphatase (UI/L)	109,0 (87,0/128,0)	90,5 (76,0/117,5)	0,667
Triglycerides (mg/DL)	60,0 (53,0/93,0)	78,5 (62,2/97,2)	0,726
Urea (mg/ dL)	46,0 (42,0/50,0)	50,0 (46,0/54,0)	0,667
Alanine (UI/L)	41,0 (35,0/46,0)	37,5 (30,2/40,5)	0,794
Erythrogram (%)			
MGHC	36,0 (34,7/36,2)	35,5 (35,0/37,0)	0,976
Erythrocytes (milh./µL)	7,4 (7,3/7,6)	7,5 (6,7/7,9)	0,624
Hematocrit	47,0 (46,7/47,5)	48,5 (44,2/49,2)	0,841
Hemoglobin (g/dL)	16,7 (16,4/17,3)	17,1 (15,6/17,9)	0,794
MGV (µm³)	63,0 (62,0/64,7)	64,0 (62,0/66,5)	0,888
Leukogram (%)			
Eosinophils	1,0 (1,0/2,25)	1,5 (0,0/3,5)	0,841
Platelets	332,5 (303,0/353,2)	316,0 (300,0/364,5)	0,928
Leukocytes(/µl)	13,6 (11,6/13,0)	11,6 (10,1/14,1)	0,904
Lymphocytes	37,0 (20,5/44,5)	37,0 (28,2/40,0)	0,976
Monocytes	3,5 (1,0/5,0)	3,5 (2,0/5,5)	0,888
TPP (g/dL)	6,6 (6,4/6,8)	6,5 (6,3/7,0)	0,509
Segmented	59,5 (49,0/76,7)	57,5 (48,7/69,0)	0,928

[1]P: probability by the Mann-Whitney test (P>0.05).

The circulating percentage of T-helper suppressor lymphocytes (CD4) did not differ (P>0.05) between treatments (Figure 1).

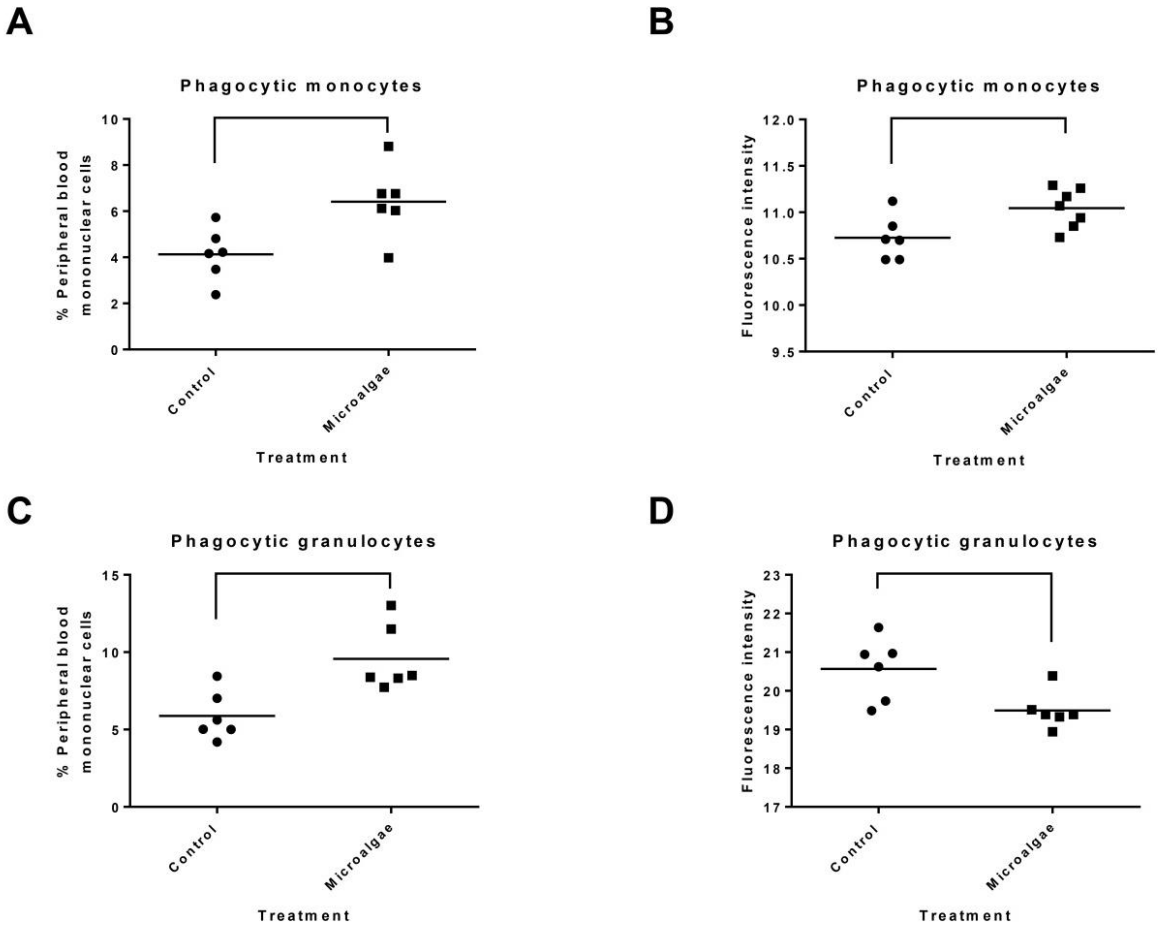
FIGURE 1 – CIRCULATING PERCENTAGE OF SUPPRESSOR HELPER T LYMPHOCYTES IN DOGS FED CONTROL DIET (0%) OR CONTAINING 0.4% OF MICROALGAE *Schizochytrium* sp. (DHA).



The vertical axis shows the percentage of suppressor lymphocytes in relation to peripheral blood leukocytes. Each point indicates an animal, and the center bar shows the median (P>0.05).

The numbers of phagocytic monocytes and granulocytes were greater (P<0.05) in animals fed 0.4% microalgae *Schizochytrium* sp. (Figure 2 A, C). In addition to being present in greater amounts in the blood, monocytes from DHA-fed dogs also phagocytosed more particles (P<0.05) (Figure 2B). However, phagocytic granulocytes in the blood were less active (P<0.05) in dogs fed microalgae (Figure 2D).

FIGURE 2 – NUMBER OF PHAGOCYTIC CELLS IN BLOOD AND THE PHAGOCYTOSIS INTENSITY OF MONOCYTES AND GRANULOCYTES IN DOGS FED A CONTROL DIET (0%) OR CONTAINING 0.4% OF MICROALGAE *Schizochytrium* sp. (DHA).



A) Percentage of phagocytic monocytes relative to total blood leukocytes; B) Intensity of monocyte phagocytosis; C) Percentage of phagocytic granulocytes in relation to total leukocytes in the blood; D) Intensity of granulocyte phagocytosis. Each point indicates an animal and the center bar shows the median. The line connecting the groups indicates significant difference by the Mann-Whitney test ($P<0.05$).

3.1.3 Gingival index

There was no change in the gingivitis score ($P> 0.05$). There was a reduction ($P<0.05$) in area affected by gingivitis (day 30 - day 0) in animals supplemented with 0.4% microalgae *Schizochytrium* sp. (Table 5).

TABLE 5 – AVERAGE (1ST AND 3RD QUARTILES) OF THE SCORE AND MEANS OF THE GINGIVITIS AREA OF DOGS FED DIETS CONTAINING 0 AND 0.4% OF MICROALGAE *Schizochytrium* sp. ON DAYS 0 (INITIAL) AND 30 (FINAL) AND THEIR DIFFERENCE OVER TIME (DAY 30 - 0).

	Score*			Area (cm²)‡		
Diets	Day 0	Day 30	Day 30 - 0	Day 0	Day 30	Day 30 – 0
0% microalgae	2.0(2.0/2.25)	1.0(1.0/1.0)	1.0(1.25/1.0)	0.069	0.038	0.031
0.4% microalgae	3.0(2.0/3.0)	1.5(1.0/2.0)	1.0(2.0/1.0)	0.252	0.042	0.210
SEM†	-	-	-	-	-	0.032
P	-	-	1.000	-	-	<0.010

*Gingivitis score: 0 = no inflammation; 1 = mild inflammation (slight change in color and texture, no bleeding at probing); 2 = Moderate inflammation (redness, edema and hypertrophy, bleeding at probing); 3 = Severe inflammation (marked redness and hypertrophy, spontaneous bleeding, ulceration); Mann-Whitney test (P<0.05); ‡Student t test (P<0.05); †SEM: standard error of the mean.

3.2 EXPERIMENT II: PALATABILITY

Dogs consumed as a first choice the diet containing 0.4% microalgae (p<0.05). The same occurred in relation to the intake ratio (p<0.05), in which a greater amount of diet was consumed with addition of the microalgae (Table 6).

TABLE 6 – FIRST CHOICE AND INTAKE RATIO OF DOGS FED DIETS WITH 0% OR 0.4% MICROALGAE *Schizochytrium* sp.

Item	0% microalgae	0.4% microalgae	P
First choice	7	25	<0.001
Intake ratio	0.34	0.66	0.003

First choice by Chi-square test (P<0.05) and intake ratio by t-Student test (P<0.05)

3.3 EXPERIMENT III: OXIDATIVE STABILITY

There was greater oxidative stability for the diet containing microalgae *Schizochytrium* sp. in comparison to the sample with anchovy oil. Time to oxidation was 214 and 178 days, respectively, as the pressure and temperature increased.

4 DISCUSSION

4.1 EXPERIMENT I: DIGESTIBILITY, BLOOD PARAMETERS AND GINGIVITIS

4.1.1 Digestibility and faecal characteristics

There are few papers in the literature that involve diets for dogs containing microalgae *Schizochytrium* sp. However Nile tilapia were found to have increased amino acid (arginine, leucine, histidine, and tryptophan) digestibility when diets were supplemented with *Schizochytrium* sp. (SARKER et al., 2016).

There are biochemical differences in algal cell walls, although these structures are complex and poorly understood (POPPER and TUOHY, 2010). Most of the microalgae generally contain complex cell wall with cellulose, gums, and pectins, presenting lower digestibility (ANDERSON et al., 1984). The cell wall of *Schizochytrium* sp. is simpler, mainly consisting of proteins and galactose (JAIN et al., 2005). This may in part justify the higher digestibility of diet components containing this microalgae.

Dietary lipid sources rich in PUFA may be highly absorbable, since they are more soluble and have high affinity for the cytosolic fatty acid binding protein (FABPc) present in enterocytes (NGUYEN et al., 2008). However, in the present study there was no increase in the digestibility of EEAH with dietary DHA supplementation, probably due to the low inclusion level and the natural high digestibility of this nutrient in dogs (FÉLIX, 2009).

Considering that most of the immune system is associated with the gastrointestinal system via the lymphatic tissue it is possible that dietary supplementation of DHA directly regulates inflammatory processes in the gastrointestinal tract (CAMPOS et al., 2002) thus contributing to intestinal health and the processes of digestion and absorption of nutrients.

Studies in humans and rats demonstrate that the symptoms of both Crohn's disease and colitis are reduced with the consumption of diets rich in ω-3 PUFA. Affirming that they promote gut health. In addition, lower inflammation due to higher levels of eicosanoids produced from ω-3 fatty acids such as the reduction in proinflammatory leukotrienes produced in the colon mucosa (CAMPOS et al., 2002, GUINE and HENRIQUE, 2011, PATTERSON et al., 2012). According to these same

authors, treatment with ω-3 PUFA has had favorable results in inflammatory bowel diseases, reducing symptoms and promoting histologic improvement in the colon.

Research conducted by Campos et al. (2002) with Wistar rats subjected to a laparotomy procedure, observed lower inflammatory changes in animals that received dietary ω-3 PUFA. It was suggested that these compounds reduce the consequences and intensity of the inflammatory bowel process. Colomé et al. (2009) concluded that the use of ω-3 PUFA as a post-operative supplementation had a therapeutic advantage in the intestinal healing process. In this study no inherent changes were observed in the addition of microalgae *Schizochytrium* sp. on the faecal characteristics of dogs. The faecal DM, score, sialic acid, ammonia, and faecal pH were within the normal levels for dogs (FÉLIX, 2009). However, there was a tendency toward lower faecal production in dogs fed with the diet containing microalgae, that can be explained by the higher digestibility presented by the diet.

The results obtained here allow us to infer that the use of the microalgae *Schizochytrium* sp. may be an important tool in dog nutrition as a source of DHA.

4.1.2 Blood parameters

Supplementation with the microalgae *Schizochytrium* sp. for 30 days did not alter the biochemical profile, erythrogram and leukogram of the dogs. This result corroborates those found by Le Blanc et al. (2005), in which supplementation with fish oil (7 g) in healthy dogs had no effect on blood parameters. Similar results were observed by Hammond et al. (2001a) in studies with rats evaluating diets with microalgae *Schizochytrium* sp. and fish oil. The authors did not observe changes in haematological parameters related to the supply of up to 4000 mg / kg / day, except for cholesterol, which was reduced in both treatments. The researchers report that these changes are more likely because the PUFA present in these sources increase hepatic fatty acid oxidation and reduce lipogenesis. Reduced serum levels of triglycerides and cholesterol esters have also been observed previously in rats fed diets with DHA (GRONN et al., 1992, DEMOZ et al., 1994). However, in the present study, these changes were not observed, which may be related to the time and amount supplied.

Blood alterations were also found in a study with cats supplemented with 1.2% microalgae *Schizochytrium* sp. (0.16% DHA in the diet) (SCHEBEL, 2016). However,

the animals had undergone a castration surgical procedure, leading to changes in blood parameters. The author reported beneficial effects of DHA on the clinical inflammatory response. In the present study, the animals were healthy, without any type of challenge.

Regarding immunity, DHA supplementation did not induce differences in the circulating percentage of suppressor T lymphocytes. These cells exert negative regulation on other lymphocytes and are defined by the expression of the CD4+ (helper lymphocyte) and FoxP3 (KIM, 2009) markers. The analysis of these cells is widely used in the study of DHA functions, since DHA is believed to have an anti-inflammatory action (CHAPKIN et al., 2009). In mice, it has been shown that DHA is able to reduce signs of inflammatory diseases by increasing the amount of suppressor T lymphocytes (FoxP3 +) (HAN et al., 2015). This was confirmed in another study, which demonstrated that the use of ω-3 increased the amount of CD4 + FoxP3 + lymphocytes in the liver of mice by stimulating the proliferation of these cells. In addition, these lymphocytes produce more anti-inflammatory cytokines, such as interleukin-10 (IL-10) and beta-transforming growth factor (TGF-β) (LIAN et al., 2015). Contrastingly, another study has shown that although the amount of FoxP3 is increased in DHA-treated suppressor lymphocytes, the function of the suppressor cell itself is inhibited by this treatment (YESSOUFOU et al., 2009).

The amount and activity of phagocytic cells were more sensitive to treatment with supplementation of the microalgae *Schizochytrium* sp., source of DHA. There are two types of phagocytes in peripheral blood, monocytes and granulocytes. The amount of both types was increased in the circulation of the animals supplemented with the algae (DHA). This result may seem to contradict the immunosuppressive function that is expected from DHA. However, phagocytosis is crucial in the resolution phases of inflammation, for the removal of dead cell debris, for example. In this period of the immune response, phagocytosis is performed by cells that are activated to a "suppressor" profile (M2 macrophages/monocytes), which assists in the completion of inflammation and repair of tissue damage (GEISSMANN et al., 2010). Thus, DHA reduces inflammatory markers while inducing phagocytosis by means of M2 macrophages/monocytes (HJORTH et al., 2013).

Although the number of phagocytic granulocytes increased in blood, the activity of these cells was reduced by the use of DHA from algae supplementation. The role of DHA on the granulocyte phagocytosis intensity is controversial. Positive and

negative effects of DHA on granulocyte phagocytic activity have been described (KEW et al., 2003; PISANI et al., 2009; PASCHOAL, 2011). The DHA are precursors of molecules called resolvins and protectins, which reduce the infiltration of granulocytes at sites of inflammation. This process triggers the end of the inflammatory phase of immunity (SERHAN and SAVILL, 2005) and it seems reasonable to expect granulocytes at this stage to be less active.

As with monocytes/macrophages, there are two subtypes of granulocytes, N1 and N2, of which N2 granulocytes are present in the resolution of inflammation. However, while M2 monocytes resolve inflammation through increased phagocytic activity, the same does not occur with N2 cells. In fact, one of the characteristics of the resolution phases of inflammation is that M2 monocytes/macrophages phagocyte and remove N2 granulocytes (CUARTERO et al., 2013, DE OLIVEIRA et al., 2016). Thus, the results found in the present study in relation to phagocytic activity may be consistent with the expected characteristics of DHA in the resolution of inflammation.

4.1.3 Gingival index

Studies have reported that there is similarity between the etiology, pathology and progression of periodontal disease in dogs and humans (HULL and DAVIES, 1972). This has made the dog to be used as an experimental model also for the human species, thus expanding the scope of this study.

Grove (1998) defines gingivitis as inflammation of the gingiva, which is characterized by swelling, redness, tenderness, and bleeding. Its cause is associated with the presence of plaque (GORREL et al., 2007) and dental calculus (SETE and FIGUEREDO, 2013). It is presented as one of the most frequent periodontal diseases of dogs (LUND et al., 1999), due to the chewing behavior, being propitious for bacterial accumulation that results in an inflammatory reaction. Animals with periodontal disease have the connective tissue with the greatest amount of inflammation, characterized by a reduced number of collagen fibers and an increase in inflammatory cells (HAMP and LINDBERG, 1997).

In the present study, there was a reduction in the gingivitis area of dogs fed a diet containing microalgae *Schizochytrium* sp. According to Eberhard et al. (2000) the level of inflammatory derivatives of arachidonic acid (AA) can be controlled through diet. Levels of eicosanoids, including prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and

lipoxins derived from the enzymatic oxidation of AA, clearly increase in conditions and duration of gingival and periodontal inflammation response. Thus, the incorporation of ω-3 fatty acids (EPA and DHA) via diet leads to a reduction of the substrate for the synthesis of eicosanoids from AA (CICEK et al., 2003). In addition, it gives rise to mediators with less inflammatory potential, modulating inflammation. This is because EPA and DHA use the same metabolic pathways and enzymes that metabolize AA because of their ability to bind to the same receptors of the metabolites derived from that fatty acid, acting less harmful (OTT et al., 2011).

According to Kesavalu et al. (2007), a diet rich in ω-3 provides lower expression of genes responsible for the secretion of inflammatory cytokines and an increase in antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase). The antioxidant action of ω-3 is expressed with positive regulation of antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidant factors, as well as the production of metabolites (such as protectins and resolvins) that have the capacity to reduce oxidative stress, inhibit neutrophil infiltration, and reduce the expression of cytokines in cells (RAFFAELLI et al., 2008).

Studies have shown that ω-3 PUFA reduces gingival inflammation in humans and some animals (VARDAR et al., 2004, HAMAZAKI et al., 2006, BENDYK et al., 2009). Neqvi et al. (2010) reported that adult humans who consumed medium or high amounts of fish with a high concentration of ω-3 became less likely to develop gingivitis. These same authors report that DHA is associated with lower periodontal disease. In addition, the DHA + EPA integration reduced periodontal disease, since the increase in dietary intake of DHA is able to modulate the immune system and consequently reduce inflammatory processes (SERHAN et al., 2008).

Another hypothesis for the reduction of inflammation with dietary DHA supplementation would be the newly discovered class of bioactive products from the transformation of ω-3, the resolvins. Its association with the reduction of inflammation is characterized by the paralysis of neutrophil infiltration and by directing neutrophils to apoptosis, attracting nonphlogistic monocytes, which differentiate within the macrophages of resolution. Resolving macrophages present increased phagocytosis of apoptotic neutrophils and increased removal of bacteria from mucosal surfaces, promoting healing of the wound and return of homeostasis (SCHWAB et al., 2007). The rapid resolution of acute resolvin induced inflammation is, at least in part, based on the beneficial actions of EPA and DHA-rich diet (VAN DYKE, 2011). In this way,

DHA helps in the control of inflammatory processes in the body, and may be a therapeutic approach to assist inflammatory processes in the gingiva.

4.2 EXPERIMENT II: PALATABILITY TRIAL

In dog and cat nutrition acceptance of a new ingredient is of great relevance. The inclusion of 0.4% microalgae *Schizochytrium* sp. in the diet positively influenced the intake ratio and was also the first choice by the dogs, indicating that it is a palatable ingredient.

Palatability results may have been influenced by several factors, especially by the organoleptic characteristics, such as the taste and odor conferred on the food by the contribution of the microalgae *Schizochytrium* sp.

4.3 EXPERIMENT III: OXIDATIVE STABILITY

Oxidative stability is an important characteristic in the evaluation of the quality of oils and fats. The oxidative stability method considers the period of induction to oxidation as a parameter. This period is defined as the time required for the oils to reach the level of detectable rancidity or surprising change in oxidation rate (LAUBLI and BRUTTEL 1986, ROSALES, 1989, FRANKEL, 1993, HILL, 1994).

According to Ackman and Lamothe (1989) there are some characteristics of fish oil that makes it unique compared to other commercially available oils. Their high degree of unsaturation and number of carbon atoms of the constituent fatty acids. They have high content of long chain PUFA ω-3 and large number and variety of fatty acids present in triacylglycerols. Thus, PUFA-rich lipids are very susceptible to oxidative processes, which compromise the integrity of the double bonds, the concentration and the functionality of EPA and DHA fatty acids (SHAHIDI, 1998). According to Boran et al. (2006) the rate of oxidation of fish oil is significantly higher than that of other oils.

Some studies have shown that DHA esters (6 double bonds) showed a higher rate of oxidation reaction. This fact is because the oxidation rate of polyunsaturated compounds and methylene compounds is much higher than of compounds having only one double bond. Since this methylene group is activated by the two adjacent double bonds, thus increasing the rate of oxidation reaction (ROVELLINI et al., 1997).

Although the microalgae studied also have a high content of PUFA, these fatty

acids are possibly more protected from the action of free radicals and oxidation catalysts than fish oil. This is due to the natural encapsulation of the biomass of microalgae cells, which confers protection to their fatty acids against oxidizing agents (GANUZA et al., 2008), thus causing a longer product life (AHN et al., 2008).

In addition, the oxidative stability of samples containing algae can also be attributed to structural components of algae with antioxidant activity. For Fujimoto and Kaneda (1980) the fact that some algae are stored for a long period without the danger of oxidative deterioration, even though they present more than 30% of their total fatty acids in the form of polyunsaturated chains, it is related to the present antioxidant mechanism in these algae. Antioxidants can act through various mechanisms, such as capturing or regenerating free radicals, breaking down peroxides, extinguishing O_2, inhibiting enzymes involved in the process of free radical formation, inhibiting the reaction cascade of free radicals, among others.

According to Spolaore et al. (2006) microalgae are rich in carotenoids and pigments. Junwei et al. (2015) reported in a study with oil of the microalgae *Schizochytrium aggregatum* the presence of high concentration of beta carotene in its composition. The authors also claimed that the oil showed high amounts of vitamin E, sterols, phenolics and flavonoids, demonstrating that these compounds not only enrich the oil but also improve its oxidative stability due to the free radical scavenging capacity and the antioxidant abilities of these substances. Similar results were found by Gong et al. (2013) using this same microalgae and by Zang (2013) in studies with oil of the microalgae *Schizochytrium limacinum.*

Thus, the higher oxidative stability for the microalgae *Schizochytrium* sp. when compared to fish oil, may be associated with structural protection conferred to DHA, which made it less permeable to oxygen during temperature elevation in the oxidative assay, in addition to its components with antioxidant activity. This greater stability to lipid oxidation brings great practical advantages to the industry, ensuring even greater food safety.

5 CONCLUSIONS

The addition of 0.4% of microalgae *Schizochytium* sp. in the diet as a source of DHA increases the digestibility of nutrients and ME, and it palatable for dogs. In addition, it increases phagocytic cells and the phagocytosis intensity of monocytes in the blood, reduces the area of gingivitis and exhibits superior oxidative stability to anchovy oil. However, it does not alter the faecal characteristics, the biochemical profile and the blood hemogram of the dogs.

REFERENCES

AAFCO - Association of Quemical Feed Control Officise. Official Publication 2000. **Association of American feed control officialS**, 2000.

ABRIL, R., GARRET, J., ZELLER, S.G., SANDER, W.J., MAST, R.W., 2003. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. Part V: target animal safety/toxicity study in growing swine. Regul. Toxicol. Pharmacol. 37, 73–82.

ACKMAN, R.G.; LAMOTHE, F. Marine mammals in Marine Biogenic Lipids, fats and oils. Ed., CRC Press, Boca raton, v. 2, p.179-382, 1989.

ADARME-VEGA, T.C.; LIM, D.K.Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P.M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factories**. v.11, p.96, 2012.

AHN, J.H.; KIM, Y.P.; SEO, E.; CHOI, Y.K.; KIM, H.S. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high-oleic sunflower oil. **Journal of Food Engineering**, v.84, p.327-334, 2008.

AJMONE-CAT, M.A.; SALVATORI, M.L; SIMONE, R.; MANCINI, M.; BIAGIONI, S.; BERNARDO, A.; CACCI, E.; MINGHETTI, L. Docosahexaenoic acid modulates inflammatory and antineurogenic functions of activated microglial cells. **J. Neurosci. Res**. v.90, p.575-587, 2012.

AKI, T.K.; HACHIDA, M.; YOSHINAGA, Y.; KATAI, T.; YAMASAKI, S.; KAWAMOTO, T.; KAKIZONO, T.; MAOKA, S.; SHIGETA, O.; SUZUKI, K.; ONO. Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. **J. Am. Oil Chem. Soc**. v.80, p.789-794, 2003.

AL-HARTHI, M.A.; EL-DEEK, A.A. Effect of different dietary concentrations of brown marine algae (Sargassum dentifebium) prepared by different methods on plasma and yolk lipid profiles, yolk total carotene and lutein plus zeaxanthin of laying hens. **Ital. J. Anim. Sci**. v.11, e.64, 2012.

ANDERSON, J.; JACKSON, A.J.; MATTY, A.J.; CAPPER, B.S. Effects of dietary carbohydrate and fibre on the tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.). **Aquaculture**. v.37, p.303–314, 1984.

ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imu- nidade. **Rev Mn-Metabólica**. v.8(3), p.135-43, 2006.

ANGULO-GUERRERO, O.; OLIART, R.R. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on adenylate cyclase, 5'nucleotidase and Na+K(+)-ATPase activities in rat brain-plasma membrane. **Arch Latinoam Nutr**, v.48(4), p.293-8, 1998.

ANISUZZAMAN, M. da; FENG, J.; JONG, K.; CHOIC, U.C.J.; KANGE, S.J. Effects of Marine Microalgae (*Schizochytrium* sp.) in Prepared Feeds on Growth and Survival Rate of Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japoncus.* **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences** (ASRJETS), v.30, n.1, p.325-337, 2017.

ANONYMOUS. Functions of unsaturated fatty acids in Unsaturated fatty acids: Nutrition and Physiological significance. **The Report of the British Nutrition Foundation's Task Force**. London; Chapman & Hall, 1992a, p.48-62

AOAC. Association of the Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Washington, DC, USA, 1995.

APPOLINÁRIO, P.P., DEROGIS, P.B.M.C.; YAMAGUTI, T.H.; MIYAMOTO, S. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas. **Quim. Nova**. v.34, p.1409-1416, 2011.

ARAUJO, M.M.G.; SANTOS, T.H.Y.; LOURENÇO, M.L.G.; TAKAHIRA, R.K.; MACHADO, L.H.A.; CARVALHO, L.R. Avaliação de colesterol e triglicerídeos séricos em cães saudáveis suplementados com n- n-3. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.64, n.6, p.1491-1496, 2012.

BAILEY, R.B.; DIMASI, D.; HANSEN, J.M.; MIRRASOUL, P.J.; RUECKER, C.M, et al. Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acids by high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. US Patent, No. v.7, p.732,170, 2010.

BARCLAY, W.; WEAVER, C.; METZ, J. Development of a docosahexaenoic acid production technology using *Schizochytrium*: a historical perspective. In: Ratledge C, Cohen Z editors. Single Cell Oils. Champaign: **AOCS Press**, p.36–52, 2005.

BARCLAY, W.R.; ZELLER, S. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and artemia nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. **Journal World Aquaculture Society**, v.27, n.3, p.314– 322, 1996.

BARRETT, K. E.; BIGBY, T. D. New roles for eicosanoids as regulators of epithelial function and growth. **News in Physiological Science**. v.10, p.153–159, 1995.

BATISTA, A.P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N.M.; FRANCO, J.M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalga biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Res**. v.2, p.164–173, 2013.

BAUER, J.E. Responses of dogs to dietary omega-3 fatty acids. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.231, p.1657-1661, 2007.

BAUER, J.E.; HEINEMANN, K.M.; LEES, G.E.; WALDRON, M.K. Docosahexaenoic acid accumulates in plasma of canine puppies raised on milk from dams fed alpha-linolenic acid-rich diet but not after weaning. **J Nutr**, v.136, p.2087S–2089S, 2006.

BAYNE, A. C. V., BOLTZ, D., OWEN, C., BETZ, Y., MAIA, G., AZADI, P., LIPPMEIER, J. C. Vaccination against influenza with recombinant hemagglutinin expressed by Schizochytrium sp. confers protective immunity. **PloS one**, *8*(4), e61790, 2013.

BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnol. Adv**. v.25, p.207–210, 2007.

BECKER, E.W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgae Culture**. Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, Oxford, 2004.

BEIRÃO, B.C.B.; FÁVARO, Jr. C.; NAKAO, L.S.; CARON, L.F.; ZANATA, S.M.; MERCADANTE, A.F. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 145:32–41, 2012.

BENDYK, A.; MARINO, V.; ZILM, P.S.; HOWE, P.; BARTOLD, P.M. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. **J Periodontal Res**., v.44(2), p.211-6, 2009.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.26, p.9-20, 2008.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. **J. Biochem. Physiol**. v.37, p.911-917, 1959.

BORAN, G.; KARAÇAM, H.; BORAN, M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. **Food Chemistry**. v.98, p.693–698, 2006.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable Sustainable Energy Rev.** v.14, p.557–577, 2010.

BROUGHTON, K.S.; WADE, J.W. Total fat and (n-3):(n-6) Fat ratios influence eicosanoid production in mice. **J Nutr**., v.32, p.88-94, 2002.

BURR, G.O.; BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **The Journal of Biological Chemistry**, v.82, p.345-367, 1929.

BYRNE, M.E.; BARLEY, R.; CURTIS, M.; ARROYO, J.M.; DUNHAM, M.; HUDSON, A.; MARTIENSSEN, R.A. ASYMMETRIC LEAVES1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. **Nature,** v.408, p.967–971, 1979.

CALDER, P.; NEWSHOLME, E. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. **Clin Sci** v.82, p.695–700, 1992.

CALDER, P. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids.** v.77(5-6), p.327-35, 2007.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. **Biochimie,** v.91, p.791-5, 2009.

CALDER, P.C.; ALBERS, R.; ANTOINE, J.M.; BLUM. S.; BOURDET- SICARD, R.; FERNS, G.A.; et al. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. **Br J Nutr.** v.101(S1), p.S1-S45, 2009.

CALDER, P.C. Fatty acids long-chain fatty acids and inflammation. **Proc. Nutr. Soc.** v.71, p.284-289, 2012.

CALVIELLO, G.; Su, H.; WEYLANDT, K.H; FASANO, E.; SERINI, S.; CITTADINI, A. Experimental evidence of ω-3 polyunsaturated fatty acid modulation of inflammatory cytokines and bioactive lipid mediators: their potential role in inflammatory, neurodegenerative, and neoplastic diseases. **Biomed Res.** Int. 2013.

CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D.L.; LOGULO, A.F.; TORRINHAS, R.S.; TEIXEIRA, W.G.J.; HABRGAMA; A. Immunonutrition in Experimental Colitis: Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.39, p.48-54, 2002.

CARCIOFI, A.C.; BAZOLLI, R.S.; PRADA, F. Ácidos graxos poliinsaturados ômega 6 e ômega 3 na alimentação de cães e gatos. **Rev Contin Educ J CRMV-SP**. v.5, p.268–27, 2002.

CARCIOFI, A.C.; DE-OLIVEIRA, L.D.; VALÉRIO, A.G.; BORGES, L.L.; DE CARVALHO, F.M.; BRUNETTO, M.A.; VASCONCELLOS, R.S. Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal feed science and technology**. v.151, p.251-260, 2009.

CASAÑAS-SÁNCHEZ, V. ; PÉREZ, J.A.; FABELO, N.; QUINTO-ALEMANY, D.; DÍAZ, M.L. Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx4) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells. **Front. Physiol**. 6, 2015.

CASANOVA, M., MEDEIROS, F. Recentes evidências sobre os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 na doença cardiovascular. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, 10(3), 2011.

CASPARI, M. Algae: A Sustainable Feed Alternative. Disponível:<feedconferences.com/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/caspari.pdf>. Acesso em: 4 abril de 2017.

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem. Phys. Lipids**. v.157, p.1-11, 2009.

CHANG, G.; LUO, Z.; GU, S.; WUB, Q.; CHANG, M.; WANG, X. Fatty acid shifts and metabolic activity changes of *Schizochytrium* sp. S31 cultured on glycerol. **Bioresour. Technol**. v.142, p.255-260, 2013.

CHAPKIN, R.; KIM, W.; LUPTON, J.R.; MCMURRAY, D.N. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v.2(3), p.187–191, 2009.

CHEW, K.W.; YAP, J.Y.; SHOW, P.L.; SUAN, N.H.; JUAN, J.C.; LING, T.C.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresour. Technol**. v.229, p.53–62, 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p.294-306, 2007.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v.3,

n.1, p.21-34, 2004.

CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P.; BONOS, E. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. **Int. J. Food Sci. Nutr.** v.62, p.794–799, 2011.

ÇIÇEK, Y.; ÖZMEN, I.; ÇANAKÇI, V.; SAHIN, F. Content and composition of fatty acids in normal and inflamed gingival tissues. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v.72, p.147-151, 2005.

COLOMÉ, L.M.; PIPPI, N.L.; CONTESINI, E.A.; GUTERRES, S.S.; GOMES, C.; CALOMÉ, L.M.; GUIMARÃES, K.M.; FOERSNTNOW, L.P.; JORNADA, D.S. Effect of the use of microparticulate omega-3 polyunsaturated fatty acids on the healing of experimental enteroanastomosis in rats: preliminary results. **Veterinária em Foco**. v.7, p.69-78, 2009.

CONNOR, W.E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **Am J Clin Nutr,** 7(suppl), p.171-175, 2000.

CUARTERO, M.I.; BALLESTEROS, I.; MORAGA, A.; NOMBELA, F.; VIVANCOS, J.; HAMILTON, J.A.; CORBÍ, Á.L.; LIZASOAIN, I., MORO, M.A. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke. **Stroke**. v.44, p.3498–3508, 2013.

DASSEY, A.J.; THEEGALA, C.S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresour. Technol**. v.128, p.241–245, 2013.

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E.E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology**. v.16, p.378–391, 2016.

DE RIVERA, C.; BOUTET, I.; ZICKER, C.S.; MILGRAM, N.W. A novel method for assessing contrast sensitivity in the beagle dog is sensitive to age and an antioxidant enriched food, Prog. Neuro-Psychopharmacol. **Biol. Psychiatry**, v.29, p.379–387, 2005.

DELTON-VANDENBROUCKE, I.; MAUDE, M.B.; CHEN, H. et al. Effect of diet on the fatty acid and molecular species composition of dog retina phospholipids. **Lipids**, n.33, p.1187-1193, 1998.

DEMOZ, A.; ASIEDU, D.K.; LIE, O.; BERGE, R.K. Modulation of plasma and hepatic oxidative status and changes in plasma lipid progile by n-3 (EPA and DHA), n-6 (com oil) and a 3-thia fatty acid in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1199, p.238-244, 1994.

DYERBERG, J.; BANG, H.O.; HJORNE, N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.28, p.958- 966, 1975.

EBERHARD, J.; JEPSEN, S.; ALBERS, H.K.; ACIL, Y. Quantification of arachidonic acids metabolites in inflamed gingival tissues. **Analytical Biochemistry***,* v.280, p.258–263, 2000.

EL-DEEK, A.A.; AL-HARTHI, M.A.; ABDALLA, A.A.; ELBANOBY, M.M. The use of brown algae meal in finisher broiler diets. Egypt. **Poult. Sci. J.,** v.31, p.767–781, 2001.

FEDIAF. The European Pet Food Industry Federation. v.2, p.100, 2016,

FELIX, A.P. Evaluation of additives on the characteristics of dog faeces. (Tese de mestrado) Curitiba (PR): Federal University of Paraná, 2009.

FÉLIX, A.P.; ZANATTA, C.P.; BRITO, C.B.M.; SÁ FORTES, C.M.L.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Digestibility and metabolizable energy of raw soya manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. **J. Anim. Sci**. v.91, p.2794-2801, 2013.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, v.4, p.220-225, 1993.

FREMANN, L.M. Free Radicals and the Main Dietary Antioxidants. **Clinical Techniques in Small Animmal Practice**, v.13, p.232-237, 1998.

FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Screening test for antioxigenic compounds from marine algae and fraction from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifid*. **Bull Japan Soc Sci Fisheries**, v.46, p.1125-1130, 1980.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**. v.294, p.1871-1875, 2001.

FURBEYRE, H.; MILGEN, J.; MENER, T.; GLOAGUEN, M.; LABUSSIÈRE, E. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. **Animal**. v.11, p.183–192, 2017.

GANUZA, E.; BENITEZ-SANTANA, T.; ATALAH, E.; VEGA-ORELLANA, O.; GANGA, R.; IZQUIERDO, M.S. Crypthecodinium cohnii and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries derived oils from seabream (Sparus aurata) microdiets. **Aquaculture**, v.277, p.109-116, 2008.

GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic GMP inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells**. J Clin Invest**., v.83, p.1774-7, 1990.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A.S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Rev Nutr.** v.19(5), p. 611-21, 2016.

GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M.H.; MERAD; M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**. v.327, p.656-661, 2010.

GIL-CAMPOS, M.; CRESPO, P.S. Omega 3 fatty acids and inborn errors of metabolism. Br. **J. Nutr.**, v.107, p.129-136, 2012.

GONG, D.P.; HAN, X.J.; CHEN, G.P. Oxidative stability of DHA oil during the refining

process. **Food Sci. Eng.** v.34, p.85–88, 2013.

GORREL, C.; GRACIS, M.; HENNET, P.; VERHAERT, L. Periodontal disease in dog. **Focus**. v.17(2):0000–0000, 2007.

GRIMM, H.; MAYER, K.; MAYSER, P.; EIGENBRODT, E. Regulatory potential of n3 fatty acids in immunological and infl ammatory processes. **Br J Nutr.,** v.87(suppl1), p.S59-S67, 2002.

GRINSTEAD, G.S.; TOKACH, M.D.; DRITZ, S.S.; GOODBAND, R.D.; NELSSEN, J.L. Effects of Spirulina platensis on growth performance of weanling pigs. **Anim. Feed Sci. Tech**. v.83, p.237–247, 2000.

GRONN, M.; CHRISTENSEN, E.; HAGVE, T.A.; CHRISTOPHERSEN; B.O.O. Effects of dietary purified eicosapentaenoic acid (20:5 (n-3)) and docosahexaenoic acid (22:6(n-3))) on fatty acid desaturation and oxidation in isolated rat liver cells. **Biochum. Biophys. Acta**. 1125:35-43, 1992.

GROVE, T.K. Periodontal disease. In: SLATTER, D. Manual of small animal surgery. 2. ed. São Paulo: Manole, 2:2752-2760, 1998.

GUINÉ, R.P.F.; HENRIQUES, F. The Role of Fatty Acids in Human Nutrition and Development on How They Influence Health. **Millenium**. v.40, p.7-21, 2011.

GUO, D.S.; JUNJI, X.; JINGREN, L.; LULI, G.; MANSU, X.; QUANCHEN, K.; GAO, S.; HUANG, H. Development of a scale-up strategy for fermentative production of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. **Chemical Engineering Science**. v.176, p.600-608, 2018.

HADLEY, K.B.; BAUER, J.; MILGRAM, N.W. The oil-rich alga *Schizochytrium* sp. as a dietary source of docosahexaenoic acid improves shape discrimination learning associated with visual processing in a canine model of senescence. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v.118, p.10–18, 2017.

HALL, J.A.; TOOLEY, K. A.; GRADI, I.L.J.L.; JEWEL, D.E.; WANDER, R.C. Effects of dietary n-6 and n-3 fatty acids and vitamin E on the immune response of healthy geriatric dogs. **Am. J.** 2003.

HAMAZAKI, K.; ITOMURA, M.; SAWAZAKI, S.; HAMAZAKI, T. Fish oil reduces tooth loss mainly through its anti-inflammatory effects?. **Med Hypotheses**. v.67(4), p.868-70, 2006.

HAMMOND, B.G.; MAYHEW, D.A.; NAYLOR, M.W.; RUECKER, F.A.; MAST, R.W.; SANDER, W.J. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. I. Subchronic rat feeding study. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v.33:000–000, 2001a.

HAMP, S.V.; LINDBERG, R. Histopathology of spontaneous periodontitis in dogs. **J Periodont Res**. v.6, p.266–77,1971.

HAN, S.C.; KOO, D.H.; KANG, N.J.; YOON, W.J.; KANG, G.J.; KANG, H.K.; YOO, E.S. Docosahexaenoic acid alleviates atopic dermatitis by generating Tregs and IL-10/TGF-β-modified macrophages via a TGF-β-dependent mechanism. **Journal of**

Investigative Dermatology, v.135, p.1556–1564, 2015.

HAWTHORNE, A.B.; FILIPOWIXZ, B.; EDWARDS, T. High dose purified eicosapentaenoic acid (EPA): Effects on leukotriene synthesis and plasma lipids. **Br J Pharmacol,** v.97, p.431, 1989.

HEAD, E.; ROFINA, J.; ZICKER, S. Oxidative stress, aging, and central nervous system disease in the canine model of human brain aging, **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract**. v.38, p.167–178, 2008.

HEINEMANN, K.M.; WALDRON, M.K.; BIGLEY, K.E.; LEES, G.E.; BAUER, J. E. Lon-g-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more effcient than alpha-linolenic acid in improving ectroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning. **J Nutr**. v.135 (8), p.1960, 2005.

HILL, S.E. A comparison of modern instruments for the analysis of the oxidation stability of fats, oils and foods. **Inform**.v.5, p.104-109, 1994.

HJORTH, E.; ZHU, M.; TORO, V.C.; VEDIN, I.; PALMBLAD, J.; CEDERHOLM, T.; FREUND, L.Y.; FAXEN-IRVING, G.; WAHLUND, L.O.; BASUN, H. Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease-related amyloid-β42 by human microglia and decrease inflammatory markers. **Journal of Alzheimer's Disease**. v.35, p.697–713, 2013.

HOESTENBERGHE, S.V.; FRANSMAN, C.; LUYTEN, T.; VERMEULEN, D.; ROELANTS, I.; BUYSENS, S.; GODDEERIS, B.M. *Schizochytrium* as a replacement for fish oil in a fishmeal free diet for jade perch, Scortum barcoo (McCulloch & Waite). **Aquaculture Research**, p.1–14, 2014.

HOLMAN, R.T. The slow discovery of the importance of ω-3 essential fatty acids in human health. **J. Nutr**., v.128, p.427- 433, 1998.

HONG, W.K.; RAIRAKHWADA, D.; SEO, P.S.; PARK, S.Y.; HUR, B.K.; KIM, C.H.; SEO, J.W. Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. **Appl. Biochem. Biotechnol**. v.164, p.1468–1480, 2011.

HORROCKS, L.A.; YEO, Y.K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological Research**, v.40, p.211-225, 1999.

HU, F.B.; MANSON, J.E.; WILLET, W.C. Types of dietary fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review**. J Am Coll Nutr.,** v. 20(1), p.5-19, 2001.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J.** v.54, p.621–63, 2008.

HULL, P.S.; DAVIES, R.M. The effect of chlorhexidine gel on tooth deposits in beagle dogs. **J. Small Anim. Pract**. 13:207-212,1972.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANi, A.; NAGAI, S.; YOSHIMURA, M. A highly CO_2-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched

from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fish. Sci.** v.66, p.655-659, 2000.

JAIN, R.; RAGHUKUMAR, S.; THARANATHAN, R.; BHOSLE, N.B. Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists. **Mar. Biotechnol**. v.7, p.184–192, 2005.

JOURDIAN, G.; DEAN, L.; ROSEMAN, S. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free siálico acids and their glycosides. **The Journal of Biological Chemistry**. v.246, p.430-435, 1971.

JUNWEI, L.; XIANQING, Y.; HAIXIA, M.; XIAO, H.; YA, W.; WANJUN, Z.; LAIHAO, L. The oxidative stability of microalgae oil (*Schizochytrium* aggregatum) and its antioxidant activity after simulated gastrointestinal digestion: Relationship with constituents. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**. v. 117:0000–0000, 2015.

KELLEY, D.S. Modulation of Human Immune and Infl ammatory Responses by Dietary Fatty Acids. **Nutrition**, v.17, p.669-673, 2001.

KESAVALU, L.; SATHISHKUMAR, S.; BAKTHAVATCHALU, V.; et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. **Infect Immun**.v.75, p.1704–1712, 2007.

KEW, S.; GIBBONS, E.S.; THIES, F.; MCNEILL, G.P.; QUINLAN, P.T.; CALDER, P.C. The effect of feeding structured triacylglycerols enriched in eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids on murine splenocyte fatty acid composition and leucocyte phagocytosis. **British Journal of Nutrition**. v.90, p.1071–1080, 2003.

KIM, C.H. FOXP3 and its role in the immune system, in: Forkhead Transcription Factors. Springer, New York, NY. Advances in Experimental Medicine and Biology. v.665, p.17–29, 2009.

KIM, H.Y.; SALEM, N.Jr., Phospholipid molecular species analysis by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry, **Anal. Chem.** v.58, p.9–14, 1986.

KÖNIG, D.; BERG, A.C.; WEINSTOCK, C.; KEUL, J.; NORTHOFF, H. Essential Fatty Acids, Immune Function and Exercise. **Exerc Immunol Rev**, v.3, p.1-31, 1997.

KOUSOULAKI, K., MØRKØRE, T., NENGAS, I., BERGE, R.K., SWEETMAN, J. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar L*.). **Aquaculture**, v.451, p.47-57, 2016.

KUS, M.M.M.; MANCINI-FILHO, J. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) fatty acids. Recognized real functions of nutrientes In: Série de Publicações ILSI Brasil. v.17, p.9-40, 2010a.

KUS, M.M.M.; MANCINI-FILHO, J. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes ácidos graxos: eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA). Força-tarefa alimentos fortificados e suplementos. ILSI Brasil: International Life Sciences Institute do Brasil, v.17, p.1-20, 2010.

LÄUBLI, M.W.; BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat

method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign. v.63, p.792-795, 1986.

LAURITZEN, L.; HANSEN, H.S.; JORGENSEN, M.H.; MICHAELSEN, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina, **Prog. Lipid Res**., v.40, p.1–94, 2001.

LE BLANC, C.J.; BAUER, J.E.; HOOSGOOD, G.; MAULDIN, G.E. Effect of dietary fish oil and vitamin E supplementation on hematologic and serum biochemical analytes and oxidative status in young dogs. **Vet. Ther**. v.6, p.325-340, 2005.
LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica.** 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995, p.269-96.

LEIPE, D.O.; WAINRIGHT, P.O; GUNDERSON, H.; PORTER, D.; ALOIS, P.V.; HIMMERICH, S.; SOGIN, M.L. The *stramenopiles* from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and Cafeteria roenbergensis. **Phycologia**, v.33, n.5, p.369-377, 1994.

LENIHAN-GEELS, G.; BISHOP, K.S.; FERGUSON, L.R. Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? **Nutrients**. v.5(4), p.1301-15, 2013.

LI, H.B.; CHENG, K.W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, **Food Chem**. v.102, p.771–776, 2007.

LI, M.H.; ROBINSON, E.H.; TUCKER, C.S.; MANNING,B.B.; KHOO, L. Effects of dried algae *Schizochytrium* sp., a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of channel catfish Ictalurus punctatus. **Journal Aquaculture**, p.232–236, 2009.

LIAN, M.; LUO, W.; SUI, Y.; LI, Z.; HUA, J. Dietary n-3 PUFA protects mice from Con A induced liver injury by modulating regulatory T cells and PPAR-γ expression. **PloS one**. v.10(7), p.1-16, 2015.

LIMA JÚNIOR, D.M.; MONTEIRO, P.B.S.; RANGEL, A.H.N.; URBANO, S.A.; MACIEL, M.V. Alimentos funcionais de origem animal. **Revista Verde**, v.6, n.2, p.30–40, 2011.

LLOYD, D.H. Essential Fatty Acids and Skin Disease. **J.Small An. Pract.** v.30, p.207-212,1989.

LOE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. **Acta Odontol Scand**. v.21, p.533–540, 1963.

LOPES, P.A.; BANDARRA, N.M.; MARTINS, S.V.; MARTINHO, J.; ALFAIA, C.M.; MADEIRA, M.S.; CARDOSO, C.; AFONSO, C.; PAULO, M.C.; PINTO, R.M.A.; GUIL-GUERRERO, J.L.; PRATES, J.A.M. Markers of neuroprotection of combined EPA and DHA provided by fish oil are higher than those of EPA (*Nannochloropsis*) and DHA (*Schizochytrium*) from microalgae oils in Wistar rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 14, p.62, 2017.

LUKIW, W.J.; BAZAN, N.G. Docosahexaenoic acid and the aging brain, **J. Nutr**. v.138,

p.2510–2514, 2008.

LUND, E.M.; ARMSTRONG, J.; KIRK, C.; KOLAR, L.M.; KLAUSNER, J.S. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc**. v.214, p.1336-1341, 1999.

MADSEN, L.; FRØYLAND, L.; DYRØY, E.; HELLAND, K.; BERGE, R.K. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are differently metabolized in rat liver during mitochondria and peroxisome proliferation. **J. Lipid Res**. v.39, p.583-593, 1998.

MANCUSO, P.; WHELAN, J.; DEMICHELE, S.J. Effects of eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid on lung permeability and alveolar macrophage eicosanoid synthesis in endotoxic rats. **Crit Care Med.,** v.25, p.523– 532, 1997.

MAS, E.; WOODMAN, R.J.; BURKE, V.; PUDDEY, I.B.; BEILIN, L.J.; DURAND, T.; MORI, T.A. The omega-3 fatty acids EPA and DHA decrease plasma F(2)-isoprostanes: results from two placebo-controlled interventions, **Free Radic. Res**. v.44, p.983–990, 2010.

MEYDANI, M.; NATIELLO, F.; GOLDIN, B.; et al: Effect of long- term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. **J Nutr** v.121, p.484–491, 1991.

MILLER, M.R.; NICHOLS, P.D.; CARTER, C.G. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar L*) diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p.382–392, 2007.

MILLER, T.A.; JACOBSON, E.D. Gastrointestinal cytoprotection by prostaglandins. p.75, 1979.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.4, p. 1245-1251, 2008.

NAQVI, A.Z.; BUETTNER, C.; PHILLIPS, R.S.; DAVIS, R.D.; MUKAMAL, K.J. Omega 3 fatty acids and periodontitis in U.S. adults. **J. am. dietetic assoc**. Chicago, v.110(11), p.1669–1675, 2010.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; LE BLOC'H, J.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver lipid metabolism. **Journal of animal physiology and Animal Nutrition**. Berlin. v.92, p.272-283, 2008.

NRC. Nutrient Requirements of Dogs and Cats. National Academy Press: Washington, DC, USA.426, 2006.

OGILVIE, G. K.; ROBINSON, N. G. Terapia complementar/alternativa do câncer-fato ou ficção? **Tratado de medicina interna veterinária-doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, p. 384-393, 2004.

OH, S.T.; ZHENG, L.; KWON, H.J.; CHOO, Y.K.; LEE, K.W.; KANG, C.W.; AN, B.K. Effects of dietary fermented Chlorella vulgaris (CBT®) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks. Asian Australas. **J. Anim. Sci**. v.28, p.95–101, 2015.

OLLER, do N.C.M.; OYAMA, L.M. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids for Brain Growth and Development. **Nutrition**, v.19, p.66-9, 2003.

OTT, J.; HIESGEN, C.; MAYER, K. Lipids in critical care medicine. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v.85(5), p.267-273, 2011.

PARKER, C.W. Leukotrienes and prostaglandins in the immune system. **Adv Prost Trom Leukot Res**, v.16, p.113-34, 1986.

PARKER, C.W. Lipid mediators produced through the lipoxygenase pathway. Am **Rev Immunol**, v.5, p.65- 84, 1987.

PASCHOAL, V.A. Comparative study of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) on neutrophil function. Tese de mestrado. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 2011.

PATTERSON, E.; WALL, R.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Nutrition and Metabolism.** p.1-16, 2012.

PERES, W.; TAVARES, do C.M.G. Efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados nas doenças inflamatórias in- testinais. **Rev Bras Nutr Clin.,** v.13 (1), p.53-60, 1998.

PERINI, J.A.L; STEVANATO, F.B; SARGI, S.C; VISENTAINER, J.E.L; DALALIO, M.M.O; MATSHUSITA, M.; SOUZA, N.E; VISENTAINER, J.V. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response. **Rev. Nutr**., v.23(6), p.1075-1086, 2010.

PISANI, L.F.; LECCHI, C.; INVERNIZZI, G.; SARTORELLI, P.; SAVOINI, G.; CECILIANI, F. In vitro modulatory effect of ω-3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**: v.131, p. 79–85, 2009.

POMPÉIA, C.; LOPES, L.R.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Braz J Med Biol Res**. v.33(11), p.1255-68, 2000.

POPPER, Z.A.; TUOHY, M.G. Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls (invited update). **Plant Physiol**., v.153, p.373–383, 2010.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae -a review. **J. Algal Biomass Util**. v.3, p.89–100, 2012.

RADMANN, E. M.; COSTA, J.A.V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO_2, SO_2 e NO. **Quim. Nova**. v.31, p.1609-1612, 2008.

RAFFAELLI, L.; SERINI, S.; PICCIONI, E.; MANICONE, P.F.; BERARDI, D.; PERFETTI, G.; CALVIELLO, G. N-3 polyunsaturated fatty acid effect in periodontal disease: State of art and possible mechanisms involved. Int J Immunopathol Pharmacol. v.21(2), p.261-266, 2008.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v.86, p.807–815, 2004.

RAWAT, I.; KUMAR, R.R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Appl. Energy**, v.88, p.3411–3424, 2011.

REES, C.A.; BAUER, J.E.; BURKHOLDER, W.J. et al. Effects of dietary flaxseed and sunflower seed supplementation on normal canine serum unsaturated fatty acids and skin and hair coat condition scores. **Veterinary Dermatology**, v.12, p.111-117, 2001.

REINHART, G.A. Review of Omega-3 Fatty Acids and Dietary Influences on Tissue Concentrations. In: Recent advances in canine and feline nutritional research. **Iams International Nutrition Symposium**, p.235-242, 1996.

ROSALES, G. Determination of the oxidative stability of virgin olive oil: comparison between the active oxygen method (A.O.M.) and the Rancimat method. **Grasas y Aceites**.v.40, p.1-5, 1989.

ROVELLINI, P.; CORTESI, N.; FEDELI, E. Ossidazione dei lipid. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v.74, p.181-189, 1997.
SADEGHI, S.; WALLACE, F.; CALDER, P. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolyssacharide in mice. **Immunology**. v.96, p.404–410, 1999.

SALDANHA, E.S.P.B.; GONZALES, E. Enriquecimento de ácidos graxos na alimentação de poedeiras. **Pesquisa & Tecnologia**, v.9, n.1, 2012.

SALEM Jr., N. Omega-3 fatty acids: molecular and biochemical aspects. In: Spiller, G.A., Scala, J. (Eds.), **New Protective Roles for Selected Nutrients**. Alan R. Liss, Inc., New York, p.109–228, 1989.

SALEM, Jr.N.; LITMAN, B.; KIM, H.Y.; GAWRISCH, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system, **Lipids,** v.36, p.945–95, 2001.

SAMUELSEN, T.A.; OTERHALS, Å.; KOUSOULAKI, K. High lipid microalgae (*Schizochytrium* sp.) inclusion as a sustainable source of n-3 long-chain PUFA in fish feed: Effects on the extrusion process and physical pellet quality. **Animal Feed Science and Technology**. 2017.

SANTOS, S.K.A. dos. Microalga *Schizochytrium* sp. em dietas para tilápia do Nilo e tambacu. Dissertação *(*Mestrado em Zootecnia*)* Universidade Federal Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

SARDESAI, V. Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids. **J. Nutr. Biochem**. v.3, p.562-579, 1992.

SARDI, L.; MARTELLI, G.; LAMBERTINI, L.; PARISINI, P.; MORDENTI, A. Effects of a dietary supplement of DHA-rich marine algae on Italian heavy pig production parameters. **Livest. Sci.** v.103, p.95–103, 2006.

SARKER, P.K.; GAMBLE, M.M.; KELSON, S.; KAPUSCINSKI, A.R. Nile tilapia (Oreochromis niloticus) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine

Schizochytrium sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. **Aquaculture Nutrition**. v.22:109-119, 2016.

SCHEIBEL, S.; MÉDICE, A.L.; HÖRÜGEL, J.S.; AYER, I.M.; GRANDE, P.A.; OLIVEIRA, C.A.L.; VASCONCELLOS, R.S. Inflammatory and oxidative profile of dogs fed diets supplemented with docosahexaenoic acid (DHA). Poster session presented at: XIV CBNA. Brazilian College of Animal Nutrition, March 25-26; Ribeirão Preto, São Paulo, 2015.

SCHWAB, J.M.; CHIANG, N.; ARITA, M.; SERHAN, CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**. v.447(7146), p. 869-74.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature immunology**. v.6, p.1191–119, 2005.

SERHAN, C.N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. **Annu Rev Pathol**. v.3, p.279-312, 2008.

SERHAN, C.N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. **Annu Rev Pathol**. v.3, p.279-312, 2008a.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Rev Immunol**, v.8, p.349-361, 2008.

SETE, M.R.C.; FIGUEREDO, C.MS. Periodontitis and omega-3: the role of fatty acids in the inflammatory process. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. 12: 58-65, 2013.

SHAHIDI, F. Functional lipids and fish proteins] In: MAZZA, G. Alimentos funcionales. Zaragoza: Editorial Acribia. 381-40, 1998.

SHEIBEL, S. Propriedades funcionais do ácido docosahexaenoico (DHA) para gatos. Dissertação *(*Mestrado em Zootecnia*)* Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, 2016.

SHIELDS, R.J.; LUPATSCH, I. Algae for Aquaculture and Animal Feeds. 2012. Disponível em:< http ://www.itas.fzk.de/tatup/121/shlu12a.pdf>. Acesso em: 24 março. 2017.

SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, M.; OLIVARES, M.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J.; XAUS, J. La expresión de IL-10 interviene em la regulación de la respuesta inflamatória por los ácidos grasos omega 3. **Nutr Hosp**. v.19(6), p.376-82, 2004.

SIJBEN, J.W.C.; CALDER, P.C. Differential immunomo- dulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. **Proceed Nutr Soc**. v.66, p.237-59, 2007.

SIJTSMA, L.; SWAAF, M. de. Biotechnological production and application of the x-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. **App Microbiol Biotechnol**, v.64, p.146–53, 2004.

SILVA-NETO, J.F.; NUNES, A.J.P.; SABRY-NETO, H.; SÁ, M.V.C. Spirulina meal has

acted as a strong feeding attractant for Litopenaeus vannamei at a very low dietary inclusion level. **Aquaculture Research**, v.43, n.2, p.430–43, 2012.

SIMOPOULOS, A.P. Ômega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases**. Food Rev Int**, v.20 p.36-54, 2004.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **J. Biosci. Bioeng**. v.101, p.87-96, 2006.

STEHR, S.N.; HELLER, A.R. Omega-3 fatty acid effects on biochemical indices following cancer surgery. **Clin.Chim.Acta**, v.373, n.1, p.1–8, 2006.

STOECKEL, K.; NIELSEN, L.H.; FUHRMANN, H.; BACHMANN, L. Fatty acid patterns of dog erythrocyte membranes after feeding of a fish-oil based DHA-rich supplement with a base diet low in n-3 fatty acids versus a diet containing added n-3 fatty acids. **Acta Vet. Scand**. v.24, p.53-57, 2011.

STOLL, B.A. Breast cancer and the western diet: role of fatty acids and antioxidant vitamins. **Eur J Cancer**, 1998.

SUBHADRA, B.; GEORGE, G. Algal biorefinery-based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world. **J. Sci. Food Agric**. v.91, p.2–13, 2011.

SUN, L.; REN, L.; ZHUANG, X.; JI, X.; YAN, J.; HUANG, H. Differential effects of nutrient limitations on biochemical constituents and docosahexaenoic acid production of *Schizochytrium* sp. **Bioresour. Technol**. v.159, p.199-206, 2014.

TACON, A.G.J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v.285, p.146-158, 2008.

TOBOREK, M.; LEE, Y.W.; GARRIDO, R.; KAISER, S.; HENNING, B. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cell. **Am J Clin Nutr.,** v.75, p.119-25, 2002.

TREVIZAN, L.; KESSLER, A.M. Lipídeos na nutrição de cães e gatos: metabolismo, fontes e uso em dietas práticas e terapêuticas. **R. Bras. Zootec,** v.38, p.15-25, 2009.

VAN DEN, H.C.; MANN; D.G.; JAHNS, H.M. Chlorophyta: class 2. Chlorophyceae. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press; 1995, p.349–382.

VAN DYKE, T.E. Proresolving lipid mediators: potential for prevention and treatment of periodontitis. **J. Clin. Periodontol**. v.11, p.119-25, 2011.

VARDAR, S.; BUDUNELI, E.; TÜRKOĞLU, O.; BERDELI, A.H.; BAYLAS, H.; BAŞKESEN, A.; ATILLA, G. Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. **J Periodontol**. v.75, p.1640-1646, 2004.

VESSBY, B. Dietary fat, fatty acid composition in plas- ma and the metabolic syndrome. **Curr Opin Lipidol,** v.14 (1), p.15-19, 2003.

VOSSEN, E.; RAES, K.; MULLEM, D.V.; DE SMET, S. Production of docosahexaenoic acid (DHA) enriched loin and dry cured ham from pigs fed algae: Nutritional and sensory quality. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**. v.118, 2016.

WAKSHLAG, J.J.; COOPER, B.J.; WAKSHLAG, R.R.; Biochemical evaluation of mito-chondrial respiratory chain enzymes in canine skeletal muscle. **Am J Vet Res**., v.65, p.480–4, 2004.

WALL, R.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F; STANTON, C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutr. Rev**. v.68, p.280-289, 2010.

WALLACE, F.A.; MILES, E.A.; CALDER; P.C. Comparison of the eff ects of linseed oil and diff erent doses of fi sh oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. **Br J Nutr**, v.89(5), p.679-89, 2003.

WANDER, R.C.; HALL, J.A; GRANDIN, J.L.; DU, S.H.; JEWELL, D.E. The ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. **J. Nutr**. v.127, p.1198-1205, 1997.

WATANABE, T.; MORIMOTO, A.; SAKATA, Y.; LONG, N.C.; MURAMAKI, N. Prostaglandin E2 is involved in adrenocorti- cotrophic hormone release during swimming exercise in rats**. J Physiol,** v.433, p.719-25, 1991.

WATTERS, C.A.; ROSNER, L.S.; ADRIAN, A.F.; DOMINY, W.G.; KLINGER- BOWEN, R.; TAMARU, C.S. Nutritional Enhancement of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids in Tilapia (*Oreochromis honorum*). **The Israeli Journal of Aquaculture**, 7 pages, 2013.

WEN, Z.Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of ecosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v.21, p.273 – 294, 2003.

WERTZ, P.W.; DOWNING, D.T. Glycolipids in mammalian epidermis: structure and function in the water barrier. **Science** (New York, N.Y.), v.217, p.1261-2, 1982.

WRIGHT-RODGERS, S.; WALDRON, M.K.; BIGLEY, K.E.; LEES; G.E.; BAUER, E.J. Dietary Fatty Acids Alter Plasma Lipids and Lipoprotein Distributions in Dogs during Gestation, Lactation, and the Perinatal Period. **J. Nutr.** v.135, p.2230-2235, 2005.

WU, S.T.; YU, S.T.; LIN, L.P. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3103–3108, 2005.

YAN, L.; KIM, I.H. Effects of dietary ω-3 fatty acid-enriched microalgae supplementation on growth performance, blood profiles, meat quality, and fatty acid composition of meat in broilers. **J. Appl. Anim. Res**. v.4, p.392–397, 2013.

YESSOUFOU, A.; PLÉ, A.; MOUTAIROU, K.; HICHAMI, A.; KHAN, N.A. Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4 CD25 regulatory T-cells. **Journal of lipid research**. v.50, p.2377–2388, 2009.

YIN, H.; LIU, W.; GOLENIEWSKA, K.; PORTER, N.A; MORROW, J.D.; PEEBLES

Jr.R.S. Dietary supplementation of omega-3 fatty acid-containing fish oil suppresses F2-isoprostanes but enhances inflammatory cytokine response in a mouse model of ovalbumin-induced allergic lung inflammation, **Free Radic. Biol. Med**. v.47, p. 622–628, 2009.

YOKOYAMA, R.; HONDA, D. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (*Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes*): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. **The Mycological Society of Japan and Springer: Mycoscience**, v.48, p.199–211, 2007.

YOUDIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential Fatty Acids and the Brain: possible health implications. **Int J Devl Neuroscience**, v.18, p.383-99, 2000.

ZHANG, G.Y. Oxidative Stability and Purification of Single-Cell Oil From *Schizochytrium* limacinum. Tese de mestrado. Jiangsu (CN): Jiangnan University, 2013.

ZICKER, S.T.; JEWELL, E.D.; YAMKA, R.M.; MILGRAM, N.W. Evaluation of cognitive learning, memory, psychomotor, immunologic, and retinal functions in healthy puppies fed foods fortified with docosahexaenoic acid–rich fish oil from 8 to 52 weeks of age. **JAVMA**, v.241, n.5, 2012.