



**IVA CARLA DE BARROS AYRES**

**FARINHA DE INSETO FERMENTADA E PROBIÓTICO  
COMO ESTRATÉGIA NUTRICIONAL PARA FRANGOS DE  
CORTE**

**LAVRAS - MG  
2025**

**IVA CARLA DE BARROS AYRES**

**FARINHA DE INSETO FERMENTADA E PROBIÓTICO COMO ESTRATÉGIA  
NUTRICIONAL PARA FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Luciana de Paula Naves  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração  
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com  
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

de Barros Ayres, Iva Carla.

Farinha de inseto fermentada e probiótico como estratégia nutricional para  
frangos de corte / Iva Carla de Barros Ayres. - 2025.  
130 p. : il.

Orientadora: Luciana de Paula Naves

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.  
Bibliografia.

1. Mosca soldado-negra. 2. Bacillus velezensis . 3. Fermentação. 4. Clostridium  
perfringens . 5. Avicultura . I. de Paula Naves, Luciana . II. Universidade Federal de  
Lavras. III. Título.

**IVA CARLA DE BARROS AYRES**

**FARINHA DE INSETO FERMENTADA E PROBIÓTICO COMO ESTRATÉGIA  
NUTRICIONAL PARA FRANGOS DE CORTE**

**FERMENTED INSECT MEAL AND PROBIOTIC AS A NUTRITIONAL STRATEGY  
FOR BROILER CHICKENS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 25 de abril de 2025.

Profa. Dra. Ana Paula Peconick UFLA

Profa. Dra. Michele de Oliveira Mendonça IFSUDESTE MG

Prof. Dr. Sérgio Turra Sobrane Filho UFJ

Profa. Dra. Vanessa Avelar Silva UFLA

---

Profa. Dra. Luciana de Paula Naves

**LAVRAS - MG  
2025**

*Aos meus pais, Ivanilda Barros e Carlos Francisco Ayres, pelo  
apoio e amor incondicional. Mesmo sob o sol intenso, me  
conduziram até aqui, proporcionando sombra e água fresca ao  
longo do caminho.  
Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora por estarem ao meu lado durante todo o meu trajeto, por estarem comigo nos momentos de alegria, por me ampararem nos momentos de tristeza e por me darem forças para continuar.

Aos meus pais, Ivanilda Barros e Carlos Francisco Ayres, os melhores pais que Deus poderia ter me dado. À minha mãe, por ser meu exemplo de força e coragem, estando sempre ao meu lado em todas as aventuras dessa vida, sorrindo e chorando comigo. Ao meu pai, por ser meu exemplo de acolhimento e amor, sempre presente, mesmo à distância, sendo meu amigo e porto seguro. A vocês, todo meu amor e gratidão. Não há palavras que expressem o quanto amo vocês.

Aos familiares, minha avó Maria Socorro (*in memoriam*), meu avô Osires, meu tio Adriano (*in memoriam*), minhas primas Maria Giovanna e Gabriele, a minha comadre e prima de coração Thayná Nunes, e minha afilhada Maria Gabriele. De maneira especial, à minha avó, que sempre me incentivou a lutar pelos meus objetivos e admirava minha coragem. Minha gratidão por tudo!

À minha madrinha, Etelvina Oliveira, um anjo enviado de Deus para minha vida. Agradeço por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos. A você, todo meu amor e gratidão.

À minha orientadora, Luciana Naves, por todo acolhimento desde a minha aprovação até a finalização deste trabalho, por todo carinho, paciência e amor em ensinar. Agradeço imensamente por todo aprendizado nesse período, pelas longas reuniões em sua sala, que muitas vezes duravam horas, fosse para debater cada detalhe do projeto ou simplesmente para jogar conversa fora. Esses momentos foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

À professora Ana Paula Peconik, um exemplo de amor pela profissão e um ser humano incrível. Seu amor e entusiasmo pela imunologia encanta a cada aluno que passa em suas mãos. Agradeço pelo acolhimento que recebi em tantas conversas, pelo carinho e pelas palavras de sabedoria. Muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em especial ao prof. Dr. Vinicius Cantarelli, prof. Dr. Márvio Lobão, profa. Dra. Vanessa Avelar e ao prof. Dr. Paulo Borges, bem como aos membros da banca profa. Dra. Michele Mendonça e prof. Dr. Sérgio Sobrane, pelas valiosas contribuições neste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa Animal (LPA), Stefânia Souza, Antônio Pádua e Flávio Vieira, por todo apoio no período em que estive no laboratório.

À empresa BSF Nutrição e Biotecnologia Ltda (CYNS®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) pelo fornecimento da farinha de inseto utilizada neste trabalho.

Aos pesquisadores colaboradores: Prof. Dr. Júnio Cota Silva (UFMG), pela coordenação da etapa de tratamento biotecnológico da farinha de inseto; Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca (UFU), pela coordenação da etapa de seleção da cepa probiótica de *Bacillus velezensis*; e ao Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (UFMG), pela coordenação da etapa de produção do probiótico e a Prof. Dra. Angélica Terezinha Barth Wouters e a sua equipe do Laboratório de Patologia Veterinária, pela coordenação da etapa de avaliações macroscópicas e histopatológicas.

Ao Grupo de Estudos em Nutrição e Produção de Aves de Corte (GENPAC), que foi essencial para condução deste trabalho e para o meu aprendizado. Agradeço por todo apoio, conversas, risadas e vivências ao longo dessa caminhada, em especial a Luiz Eduardo, Beatriz Aguiar, João Pedro Guimarães, Jerlis Pardinho e Miyuki Oshima.

Aos meus amigos de longa data, Gilberto Lucas, Alany Felix, Liliane Santana, Marcos Augusto, Mirael Pimentel e Luiz Arthur, por toda amizade e apoio.

Aos amigos que tive o privilégio de conhecer na Pós-Graduação, em especial Ygor de Paula, Lucas Daniel, Mateus Coelho, Maria Alice Junqueira, Joana Barreto e Gabryelle Almeida. Juntos, passamos por diversos momentos, sendo muitas vezes apoio e acolhimento uns dos outros. Levarei vocês sempre em meu coração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudo.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro (Processo APQ-00952-21, Edital Nº 001/2021 - DEMANDA UNIVERSAL).

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo suporte institucional e pela oportunidade de desenvolvimento acadêmico e profissional ao longo desta trajetória.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram com uma palavra amiga, apoio, energia positiva ou torcida ao longo dessa trajetória, o meu mais sincero muito obrigada!

**OBRIGADO!**

## RESUMO

A farinha da mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*) tem se destacado como um ingrediente promissor na nutrição animal, devido à sua composição nutricional e à presença de compostos bioativos com potencial imunomodulador. A fermentação controlada dessa farinha pode intensificar a liberação de peptídeos bioativos, e sua associação ao probiótico *Bacillus velezensis* pode ter efeitos positivos sobre a saúde intestinal. Considerando esses benefícios, torna-se relevante avaliar sua utilização em condições de desafio sanitário, como a enterite necrótica, uma importante enfermidade entérica na avicultura que se agrava com as restrições ao uso de antibióticos, o que reforça a necessidade de alternativas eficazes. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da farinha da mosca-soldado negra, previamente fermentada ou não, sobre o seu potencial como aditivo funcional associada *Bacillus velezensis* BV01 em frangos de corte desafiados com enterite necrótica subclínica. Foram utilizados 360 frangos Cobb-500, distribuídos em três tratamentos, avaliados em dez repetições de 12 frangos cada, sendo: T1- dieta basal (DB), sem adição de antibiótico e anticoccidiano; T2- dieta basal suplementada farinha da larva de mosca-soldado negra convencional associada *Bacillus velezensis* BV01; T3- dieta basal suplementada com farinha da larva de mosca-soldado negra previamente fermentada associada *Bacillus velezensis* BV01. A enterite necrótica foi induzida por meio da ração, com administração de *Eimeria maxima* aos 14 dias e *Clostridium perfringens* nos dias 18, 19 e 20 de idade. Foram avaliados o consumo de ração (CR), o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA) nas fases de 1 a 7, 1 a 14, 1 a 21, 1 a 35 e 1 a 42 dias de idade dos frangos. Aos 14, 21 e 42 dias foram avaliados o escore de lesão, avaliação macroscópica, histopatologia, histomorfometria e citocinas. O rendimento de carcaça e cortes foram avaliados aos 42 dias. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal foram analisados por ANOVA com teste SNK a 5%, os dados com distribuição não normal, pelo teste de Kruskal-Wallis. Os frangos suplementados com a farinha da mosca soldado-negra, fermentada ou não, associada *B. velezensis* BV01 exibiram melhor conversão alimentar ( $P<0,05$ ) nas fases de 1 a 7, 1 a 14 e 1 a 21 dias, sendo esta última correspondente ao período de desafio sanitário. Na fase de 1 a 21 dias, as aves alimentadas com dieta basal apresentaram pior conversão alimentar ( $P<0,05$ ). Além disso, houve uma redução significativa ( $P<0,05$ ) nas concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-10 nas aves suplementadas com as farinhas, ambas associadas *B. velezensis* BV01. Para IL-6, aos 42 dias houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) nos frangos alimentados dieta basal suplementada com farinha da mosca-soldado negra + *B. velezensis* BV01. Conclui-se que, o uso da farinha da mosca soldado-negra, fermentada ou não, ambas associadas *Bacillus velezensis* BV01, modulou a resposta imune de frangos de corte desafiados com enterite necrótica subclínica, melhorando o desempenho produtivo, e indicando o potencial dessas combinações como aditivos funcionais para frangos de corte.

**Palavras-chave:** Mosca - soldado negra; *Bacillus velezensis*; Fermentação; *Clostridium perfringens*; Avicultura.

## ABSTRACT

The black soldier fly (*Hermetia illucens*) meal has emerged as a promising ingredient in animal nutrition due to its nutritional composition and the presence of bioactive compounds with immunomodulatory potential. Controlled fermentation of this meal may enhance the release of bioactive peptides, and its association with the probiotic *Bacillus velezensis* may have positive effects on intestinal health. Considering these benefits, it becomes relevant to evaluate its use under sanitary challenge conditions, such as necrotic enteritis, a major enteric disease in poultry farming that worsens with restrictions on antibiotic use, thereby reinforcing the need for effective alternatives. In this context, this study aimed to evaluate the effects of black soldier fly meal, whether previously fermented or not, on its potential as a functional additive associated with *Bacillus velezensis* BV01 in broiler chickens challenged with subclinical necrotic enteritis. A total of 360 Cobb-500 broilers were used, distributed across three treatments, evaluated in ten replicates of 12 birds each, as follows: T1 – basal diet (BD) without antibiotic or anticoccidial additives; T2 – basal diet supplemented with conventional black soldier fly larvae meal associated with *Bacillus velezensis* BV01; T3 – basal diet supplemented with previously fermented black soldier fly larvae meal associated with *Bacillus velezensis* BV01. Necrotic enteritis was induced via feed, with administration of *Eimeria maxima* at 14 days and *Clostridium perfringens* on days 18, 19, and 20 of age. Feed intake (FI), weight gain (WG), and feed conversion ratio (FCR) were evaluated during the periods of 1–7, 1–14, 1–21, 1–35, and 1–42 days of age. At 14, 21, and 42 days, lesion scores, macroscopic evaluation, histopathology, histomorphometry, and cytokine levels were assessed. Carcass yield and cuts were evaluated at 42 days. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Data with a normal distribution were analyzed using ANOVA with the SNK test at a 5% significance level, while non-normally distributed data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Broilers supplemented with black soldier fly meal, whether fermented or not, and associated with *B. velezensis* BV01, showed improved feed conversion ( $P<0.05$ ) during the periods of 1–7, 1–14, and 1–21 days, with the latter corresponding to the sanitary challenge period. During the 1–21 day period, birds fed the basal diet showed poorer feed conversion ( $P<0.05$ ). Furthermore, there was a significant reduction ( $P<0.05$ ) in TNF- $\alpha$  and IL-10 concentrations in birds supplemented with the meals, both associated with *B. velezensis* BV01. For IL-6, at 42 days, a significant difference ( $P<0.05$ ) was observed in broilers fed the basal diet supplemented with black soldier fly meal + *B. velezensis* BV01. It is concluded that the use of black soldier fly meal, whether fermented or not, both associated with *Bacillus velezensis* BV01, modulated the immune response of broiler chickens challenged with subclinical necrotic enteritis, improving productive performance and indicating the potential of these combinations as functional additives for broiler production.

**Keywords:** Black soldier fly; *Bacillus velezensis*; Fermentation; *Clostridium perfringens*; Poultry

## IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

A farinha de insetos comestíveis, especialmente da mosca-soldado negra (*Hermetia illucens*), tem se destacado como uma alternativa promissora na alimentação de frangos de corte, devido à sua composição nutricional rica em proteína, ácidos graxos de cadeia média como o ácido láurico e compostos bioativos com potencial antimicrobiano e imunomodulador. Além de sustentável, sua produção apresenta elevada eficiência biológica, atendendo às demandas atuais por soluções produtivas com menor impacto ambiental. O processamento por fermentação microbiana controlada surge como uma estratégia biotecnológica adicional, capaz de intensificar a liberação de peptídeos bioativos, potencializando seus efeitos funcionais sobre a saúde intestinal das aves. Associado a essa abordagem, o uso do probiótico *Bacillus velezensis* oferece benefícios complementares, como a modulação da microbiota, a melhora no desempenho produtivo e a inibição do crescimento de patógenos. Essa combinação pode ser estratégica especialmente em cenários de desafio sanitário, como a enterite necrótica, uma das doenças entéricas mais relevantes na avicultura. Assim, este trabalho contribui para o desenvolvimento de soluções nutricionais inovadoras, propondo o uso de ingredientes funcionais sustentáveis como alternativa ao uso de antibióticos promotores de crescimento na avicultura. Essa estratégia representa um avanço tecnológico relevante, ao oferecer uma alternativa sustentável na prevenção de doenças entéricas e na redução do uso de antimicrobianos. Os impactos potenciais dessa pesquisa incluem a redução de perdas econômicas associadas à enterite necrótica, o fortalecimento da segurança alimentar, ao propor soluções nutricionais inovadoras e sustentáveis, alinhando-se às demandas sociais, ambientais e econômicas atuais.

## **SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS**

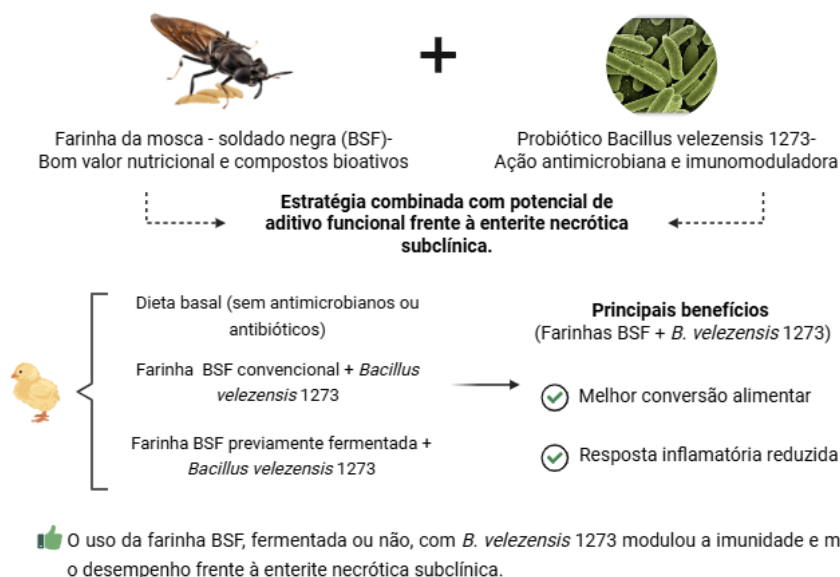
The use of edible insect meal, especially from the black soldier fly (*Hermetia illucens*), has emerged as a promising alternative in broiler chicken nutrition due to its nutritional composition, rich in protein, medium-chain fatty acids such as lauric acid, and bioactive compounds with antimicrobial and immunomodulatory potential. In addition to being sustainable, its production shows high biological efficiency, meeting current demands for productive solutions with lower environmental impact. Controlled microbial fermentation processing has emerged as an additional biotechnological strategy, capable of enhancing the release of bioactive peptides and boosting its functional effects on poultry intestinal health. Combined with this approach, the use of the probiotic *Bacillus velezensis* offers complementary benefits, such as modulation of the microbiota, improvement in productive performance, and inhibition of pathogen growth. This combination may be strategic, especially under sanitary challenge scenarios such as necrotic enteritis, one of the most relevant enteric diseases in poultry farming. Thus, this work contributes to the development of innovative nutritional solutions, proposing the use of sustainable functional ingredients as an alternative to antibiotic growth promoters in poultry production. This strategy represents a relevant technological advancement by offering a sustainable alternative for preventing enteric diseases and reducing antimicrobial use. The potential impacts of this research include the reduction of economic losses associated with necrotic enteritis and the strengthening of food security by proposing innovative and sustainable nutritional solutions aligned with current social, environmental, and economic demands.

## RESUMO INTERPRETATIVO

Elaborado por **Iva Carla de Barros Ayres** e orientado pela **Profa. Dra. Luciana de Paula Naves**

A farinha de larvas da mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*) tem se destacado como uma alternativa promissora na nutrição de frangos de corte, devido à sua composição nutricional e presença de compostos bioativos que podem contribuir para a saúde intestinal das aves. A fermentação controlada dessa farinha representa uma estratégia biotecnológica capaz de potencializar a liberação de peptídeos antimicrobianos. Paralelamente, o probiótico *Bacillus velezensis* tem se mostrado eficaz na promoção da saúde intestinal, na melhora do desempenho das aves e na inibição de cepas patogênicas. Diante desse potencial funcional de ambos, torna-se relevante investigar seus efeitos sob condições de desafio entérico. A enterite necrótica é uma das principais doenças entéricas na avicultura, comprometendo o desempenho e a rentabilidade da produção. Considerando as restrições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento, a busca por alternativas sustentáveis e seguras tem ganhado destaque. Neste estudo, avaliaram-se os efeitos da farinha da mosca-soldado negra, previamente fermentada ou não, associada ao *Bacillus velezensis* BV01 como aditivo alimentar em frangos de corte desafiados com enterite necrótica subclínica. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, a utilização da farinha da mosca soldado-negra, fermentada ou não, associada *Bacillus velezensis* BV01, modulou a resposta imune de frangos de corte desafiados com enterite necrótica subclínica, favorecendo o desempenho produtivo e demonstrando o seu potencial como aditivo funcional.

### LISTA DE TABELAS



## PRIMEIRA PARTE:

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição química da farinha e das larvas da mosca-soldado negra ( <i>Hermetia illucens</i> )..... | 20 |
| <b>Tabela 2.</b> Peptídeos antimicrobianos presentes na mosca-soldado negra ( <i>Hermetia illucens</i> ).<br>.....   | 25 |
| <b>Tabela 3.</b> Efeitos da utilização da farinha de larvas da mosca-soldado negra na dieta de frangos de corte..... | 35 |
| <b>Tabela 4.</b> Classificação toxintipo de <i>Clostridium perfringens</i> com base nas toxinas secretadas.<br>..... | 45 |
| <b>Tabela 5.</b> Propriedades e classificação das toxinas do o <i>Clostridium perfringens</i> .....                  | 46 |

## ARTIGO:

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 1.</b> Ingredients and nutritional composition of the diets provided to broiler chickens during different rearing periods.....                                                                                                                                             | 112 |
| <b>Table 2.</b> Chemical composition and gross energy of the black soldier fly larvae meals evaluated in the experiment (g/100g, as-fed basis) <sup>1</sup> .....                                                                                                                   | 114 |
| <b>Table 3.</b> Amino acid profile of the black soldier fly larvae meals evaluated in the experiment (g/100g, as-fed basis) <sup>1</sup> .....                                                                                                                                      | 115 |
| <b>Table 4.</b> Fatty acid profile and organic acid contents (lactic, propionic, and acetic acids) of the black soldier fly larvae meals evaluated in the experiment (g/100g, as-fed basis) <sup>1</sup> .....                                                                      | 116 |
| <b>Table 5.</b> Performance, carcass and parts yield of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with <i>Bacillus velezensis</i> BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis..... | 118 |
| <b>Table 6.</b> Mortality of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with <i>Bacillus velezensis</i> BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.....                            | 120 |
| <b>Table 7.</b> Macroscopic intestinal evaluation of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with <i>Bacillus velezensis</i> BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis*.....   | 121 |

**Table 8.** Mean jejunal lesion score\* of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.....123

**Table 9.** Frequency of intestinal lesions in the jejunum of broilers at 21 days of age fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis\*.....124

**Table 10.** Frequency of intestinal lesions in the jejunum of broilers at 42 days of age fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis\*.....126

**Table 11.** Jejunal histomorphometry of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.....127

## SUMÁRIO

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>PRIMEIRA PARTE.....</b>                                                        | <b>15</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                  | <b>15</b> |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                               | <b>17</b> |
| <b>2.1 INSETOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL: O PAPEL DA MOSCA-SOLDADO NEGRA. 17</b>      |           |
| <b>2.1.1 HERMETIA ILLUCENS: BIOLOGIA E CICLO DE VIDA .....</b>                    | <b>17</b> |
| <b>2.1.2 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA-SOLDADO</b>          |           |
| <b>NEGRA .....</b>                                                                | <b>19</b> |
| <b>2.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA- SOLDADO</b>        |           |
| <b>NEGRA: UMA FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS .....</b>                            | <b>23</b> |
| <b>2.3 FERMENTAÇÃO DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA-SOLDADO NEGRA: UMA</b>            |           |
| <b>ABORDAGEM BIOTECNOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS....</b>          | <b>27</b> |
| <b>2.4 USO DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA SOLDADO NEGRA EM FRANGOS DE</b>           |           |
| <b>CORTE.....</b>                                                                 | <b>33</b> |
| <b>2.5 POTENCIAL PROBIÓTICO DO <i>BACILLUS VELEZENSIS</i> NA AVICULTURA.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>2.6 ETIOLOGIA E FATORES PREDISPOONENTES DA ENTERITE NECRÓTICA .....</b>        | <b>42</b> |
| <b>CONSIDERAÇÃO FINAL.....</b>                                                    | <b>53</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                          | <b>54</b> |
| <b>SEGUNDA PARTE- ARTIGO .....</b>                                                | <b>73</b> |
| <b>CONVENTIONAL AND FERMENTED BLACK SOLDIER FLY LARVAE MEAL</b>                   |           |
| <b>ASSOCIATED WITH <i>BACILLUS VELEZENSIS</i> BV01 AS FUNCTIONAL ADDITIVE FOR</b> |           |
| <b>BROILERS UNDER SUBCLINICAL NECROTIC ENTERITIS CHALLENGE.....</b>               | <b>73</b> |

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca por ingredientes funcionais que promovam a saúde intestinal e o desempenho produtivo de frangos de corte tem impulsionado o interesse pelo uso de insetos comestíveis na nutrição animal. Neste contexto, a farinha da larva da mosca-soldado negra (FBSF) vem se destacando por apresentar não apenas por suas boas características nutricionais, mas também por seus compostos bioativos com potenciais efeitos funcionais na saúde intestinal das aves (KHAN et al., 2024).

Esse potencial funcional pode ser atribuído à presença de compostos bioativos, como a quitina, ácidos graxos de cadeia média e peptídeos antimicrobianos, que auxiliam no equilíbrio da microbiota e na resposta imunológica intestinal contribuindo para o controle de patógenos (VOGEL et al., 2018).

A quitosana, o produto da N- desacetilação da quitina, tem sido estudada como um aditivo alimentar na dieta de frangos, Nuengjamnong e Angkanaporn (2017) observaram que a adição de 2 g/kg de quitosana na ração fornecida para frangos de corte melhorou a conversão alimentar, histomorfometria intestinal e aumentou a população de *Bacillus sp.* e reduziu a população de *Escherichia coli*. Uma revisão robusta realizada por Elnesr et al. (2022), resumem os efeitos da quitosana nas aves. Considerando-se os ácidos graxos destaca-se o ácido láurico, que é convertido em monolaurina, um composto com propriedades antivirais, antibacterianas e antiprotozoárias (YUAN; AJUWON; ADEOLA, 2025).

Quanto aos peptídeos antimicrobianos, a mosca-soldado negra se destaca como uma das principais fontes entre os insetos, sendo já identificados 57 peptídeos antimicrobianos de várias classes, como defensinas, cecropinas, atacinas, sarcotoxinas e estomoxina (PIMCHAN et al., 2024). É importante ressaltar que, ao contrário dos antibióticos convencionais, até o momento, os peptídeos antimicrobianos derivados de insetos não aumentam as taxas de mutação bacteriana, sendo esta uma característica relevante diante da necessidade do setor avícola por alternativas com baixo potencial para o desenvolvimento de resistência bacteriana (XIA; GE; YAO, 2021).

Conhecendo a importância dos peptídeos antimicrobianos e considerando que a farinha de certos insetos tem alto teor proteico, pesquisadores se propuseram a avaliar os processos de obtenção de peptídeos destas farinhas, visando estabelecer procedimentos que potencializem a produção de peptídeos bioativos com diversas propriedades

funcionais. Estudos envolvendo a hidrólise enzimática das larvas de *Schistocerca gregária*, *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis*, *Schistocerca gregária* e *Bombus terrestris* demonstram atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (VERCRUYSSSE et al., 2005; VERCROYSSSE et al., 2009). De forma semelhante, Cruz, Oliveira e Castro (2023), demonstraram que o processo fermentativo conduzido por *Aspergillus tubingensis* LBA02, pode aumentar as propriedades antioxidantes. Entretanto, os estudos nesta área ainda são incipientes e precisam ser melhor explorados pela comunidade científica.

Por sua vez, os probióticos também vem sendo avaliados como aditivos em rações fornecidas para frangos de corte (SHINI et al., 2020; KEERQIN et al., 2021). Estudos demonstram que *Bacillus velezensis* melhora o desempenho produtivo, reduzindo a inflamação intestinal e atividade de inibição contra *Campylobacter jejuni* e *Clostridium perfringens* (SONI et al., 2021; PARK; SUN, 2022; LI et al., 2023; CUI et al., 2024; ZHU LA et al., 2024). A associação entre *Bacillus velezensis* e a FBSF pode representar uma abordagem integrada para o controle de doenças entéricas.

A enterite necrótica, causada por *Clostridium perfringens*, é uma das doenças mais relevantes na avicultura, resultando em custos associados ao controle e às perdas na produção mundial superiores a mais de 6 bilhões de dólares por ano (KEERQIN et al., 2021; ZHANG et al., 2025). Sua incidência tem aumentado significativamente nas últimas décadas, especialmente devido às restrições no uso de promotores de crescimento antimicrobianos (AGPs) nas rações. A crescente demanda dos consumidores por alimentos livres de antibióticos também tem pressionado a indústria avícola, intensificando a busca por alimentos eficazes ao uso de AGPs (EMAMI et al., 2021; BUENO et al., 2023; HUANG et al., 2025).

Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliam o *B. velezensis* e a FBSF como aditivos na ração para frangos desafiados com enterite necrótica e, até o momento, não foi encontrado nenhum trabalho avaliando o uso concomitante destes dois aditivos em frangos desafiados. Portanto, este trabalho foi conduzido para avaliar os efeitos de um processo de fermentação controlada da FBSF sobre o seu potencial funcional consorciado ao uso de *B. velezensis* em ração fornecida para frangos em condição de enterite necrótica.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 INSETOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL: O PAPEL DA MOSCA-SOLDADO NEGRA

Nos últimos anos, a crescente preocupação em sustentabilidade e segurança alimentar tem sido amplamente discutida em nível internacional. Estima-se que, até 2050, a população mundial atinja 10 bilhões de pessoas, o que resultará em um aumento de aproximadamente 35% a 56% na demanda global de alimentos (VAN DIJK et al., 2021).

Atualmente, os produtos de origem animal representam quase 70% do consumo mundial de alimentos, e essa participação tende a crescer com um aumento da demanda por proteínas de origem animal. A carne de frango, que atualmente representa 59% da produção global total de carne, deve atingir 62% até 2032, impulsionada principalmente pelo crescimento do consumo (MOTTET; TEMPIO, 2017; OCDE- FAO, 2023).

Para suprir essa crescente demanda, será necessário expandir significativamente a produção de grãos utilizados na formulação de rações. No entanto, essa expansão pode gerar impactos ambientais consideráveis, exigindo do mercado a adoção de práticas mais sustentáveis e econômicas (BELHADJ SLIMEN et al., 2023).

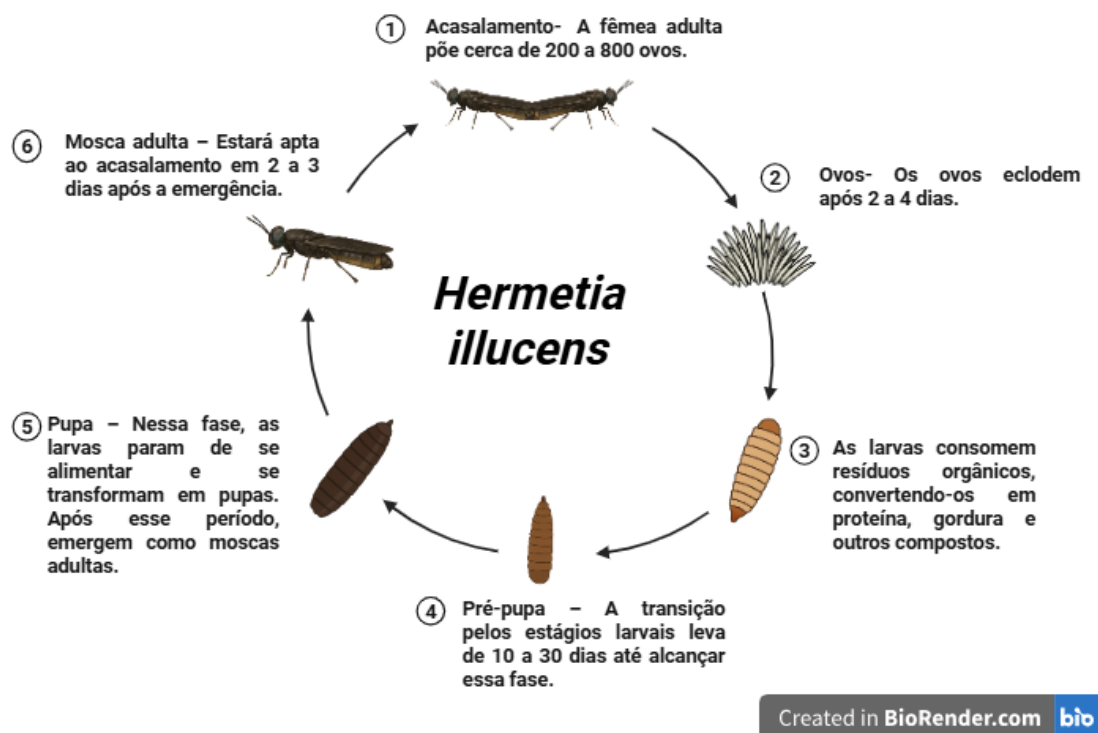
Neste cenário, a utilização de insetos na alimentação animal surge como uma alternativa promissora (GUINÉ et al., 2021). Além de apresentarem alto valor nutricional, os insetos podem ser produzidos de forma controladas e segura, utilizando substratos provenientes de resíduos orgânicos, contribuindo para a redução de descarte ambiental (FOWLES; NANSEN, 2020).

Entre as espécies de insetos mais utilizadas na alimentação animal, a larva da mosca-soldado negra (*Hermetia illucens*), conhecida como *black soldier fly* (BSF), tem se destacado. O mercado global de BSF tem apresentado um crescimento acelerado e deve atingir US\$ 2,57 bilhões até 2030, com uma taxa de crescimento anual de 33,3% entre os anos de 2019 e 2030 (METICULOUS RESEARCH®, 2020).

#### 2.1.1 HERMETIA ILLUCENS: BIOLOGIA E CICLO DE VIDA

A mosca-soldado negra (*Hermetia illucens*), pertencente à família *Stratiomyidae* e à ordem *Diptera*, é originária da savana sul-americana e está amplamente distribuída em regiões temperadas, subtropicais e tropicais. Sua faixa de temperatura ideal varia entre 25°C a 30°C, no entanto, apresenta baixa tolerância ao frio, não suportando temperaturas abaixo de 5°C (WANG; SHELOMI, 2017; SHUMO et al., 2019).

Seu ciclo de vida é holometábolo, ou seja, compreende quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). O período larval é o mais longo e representa a fase de maior importância nutricional. Fatores ambientais, como temperatura, umidade, intensidade de luz, disponibilidade e qualidade de alimentos influenciam diretamente a duração do ciclo de vida e o desempenho biológico da espécie (SILVA; LEHNEN; MARCATO, 2024).



**Figura 1.** Ciclo de vida da mosca-soldado negra (*Hermetia illucens*). **Fonte:** Adaptado de Salahuddin et al. (2024).

As fêmeas depositam entre 200 e 800 ovos em substratos ricos em matéria orgânica e morrem logo após a oviposição. A eclosão ocorre em dois a quatro dias, e as larvas recém-nascidas, sensíveis à luz, se enterram no substrato para iniciar a alimentação. O crescimento larval ocorre em seis estágios, chamados instares, e, ao final do quinto, a larva atinge a fase de pré-pupa. Durante essa transição, ocorre a substituição das peças bucais por uma estrutura semelhante a um gancho, além da mudança na coloração para um tom marrom-escuro. Esse estágio dura entre 10 a 30 dias, dependendo da disponibilidade de alimento, temperatura e umidade (SINGH; KUMARI, 2019; SCALA et al., 2020).

A temperatura é um fator crucial no desenvolvimento larval da *Hermetia illucens*, com a faixa ideal variando entre 25°C e 30 °C, enquanto a umidade relativa ótima situa-se entre 60% e 65%. Além das condições ambientais, o sexo também influencia a duração do estágio larval. As fêmeas, por apresentarem maior peso em comparação aos machos, tendem a ter um período de desenvolvimento mais longo. Esse maior peso permite o acúmulo de reservas energéticas essenciais para a produção de ovos (TOMBERLIN; SHEPPARD; JOYCE, 2002; TOMBERLIN; ADLER; MYERS, 2009; SILVA; HESSELBERG, 2020).

Na fase pré-pupa, as larvas utilizam o gancho bucal para se afastar da fonte de alimento, migrando em busca de um ambiente seco e sombreado. Ao encontrarem um local adequado, tornam-se imóveis e desenvolvem uma rigidez característica. A pupação, que dura entre 5 e 10 dias, culmina com a emergência do inseto adulto de seu invólucro pupal. Para que esse processo ocorra com sucesso, são necessárias condições ambientais quentes, secas e sombreadas para ser bem-sucedido (SILVA; HESSELBERG, 2020).

Os adultos recém-emergidos iniciam rituais de acasalamento poucos dias após saírem de seus invólucros pupais. Com a capacidade de se reproduzir sem necessidade de alimentação na fase adulta, sua vida útil é curta, variando entre cinco e oito dias, dependendo da população e das condições ambientais (MAKKAR et al., 2014).

A intensidade da luz desempenha um papel essencial na regulação do período de acasalamento, enquanto a postura dos ovos é influenciada pela temperatura e umidade. Períodos prolongados de luz estimulam o comportamento reprodutivo, e temperaturas superiores a 26°C favorecem a ovoposição (PARK et al., 2010). Além disso, níveis de umidade relativa próximos a 70% garantem uma postura bem-sucedida e aumentam a longevidade das moscas adultas (HOLMES; VANLAERHOVEN; TOMBERLIN 2012).

Além de sua eficiência reprodutiva e adaptabilidade ambiental, a *Hermetia illucens* se destaca pelo seu elevado valor nutricional. Suas larvas apresentam uma composição rica em proteínas, lipídios e minerais, tornando-se uma alternativa promissora na alimentação animal.

### **2.1.2 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA-SOLDADO NEGRA**

A composição das larvas de BSF pode ser influenciada por diversos fatores, como o tipo e a qualidade do substrato consumido, a fase de crescimento e as condições ambientais às quais são expostas. De modo geral, sua composição nutricional apresenta

um teor de proteína variando entre 32% a 53%, enquanto os níveis de gordura podem oscilar de 18% a 33% (SALAHUDDIN et al., 2024).

A farinha de BSF pode ser classificada em três tipos, de acordo com sua composição química e o método de processamento: farinha altamente desengordurada (<10% de extrato etéreo), farinha parcialmente desengordurada (11% a 20% de extrato etéreo) e farinha integral (>21% de extrato etéreo). A extração de óleo aumenta o teor bruto de proteína na farinha de BSF, reduz o risco de rancidez e possibilita maior inclusão da farinha nas dietas das aves (CHU et al., 2020).

A composição química da farinha de BSF e das larvas pode ser observada na tabela 1.

**Tabela 1.** Composição química da farinha e das larvas da mosca-soldado negra (*Hermetia illucens*).

|                         | Farinha de BSF | Larvas de BSF |
|-------------------------|----------------|---------------|
| Proteína bruta (%)      | 49,80          | 42,70         |
| Extrato etéreo (%)      | 22,10          | 27,70         |
| Fibra bruta (%)         | 11,20          | 5,84          |
| Cinzas (%)              | 9,60           | 8,76          |
| Cálcio (%)              | 2,61           | 2,08          |
| Fósforo (%)             | 0,98           | 0,93          |
| Energia bruta (Kcal/kg) | 5646           | 5866          |

Fonte: Silva, Lehnen e Marcato, 2024.

De acordo com Silva, Lehnen e Marcato (2024), o teor de proteína bruta da farinha integral foi menor (43,1%) em comparação com as farinhas parcialmente desengorduradas (54,4%) e altamente desengordurada (60,9%). Como esperado, o teor de extrato etéreo na farinha integral (33,9%) foi maior do que nas farinhas parcialmente (13,9%) e altamente desengorduradas (7,18%). Além disso, os níveis de extrato etéreo nas farinhas de BSF foram superiores ao do farelo de soja 46% (2,85%) e da farinha de peixe 54% (8,06%) (ROSTAGNO et al., 2017).

Em relação a fibra bruta, a farinha da BSF apresenta um teor médio de 9,78%, podendo variar entre 4,1% e 21,3%. Essa variação pode está associada aos estágios de desenvolvimento, sendo que as larvas em estágios mais próximos do adulto tendem a

apresentar maiores teores de fibra (SPRANGHERS et al., 2017; WANG; SHELOMI, 2017; ONSONGO et al., 2018).

Além das fibras digeríveis, a farinha de BSF também contém quitina, que é o principal tipo de fibra presente nos exoesqueletos dos insetos. Composta principalmente por N-acetil-D-glicosídicas, a quitina é indigestível pelas aves devido à sua insolubilidade (IÑAKI et al., 2022). Embora não seja digerida, a quitina tem sido associada à melhoria da função imunológica das aves, o que pode agregar valor nutricional à farinha de BSF quando considerada para dietas funcionais (SWIATKIEWICZ et al., 2015; LEE et al., 2018; VILELA et al., 2021).

Além da presença de fibras e compostos funcionais, a farinha da BSF destaca-se pelo seu rico perfil de aminoácidos, tornando-se uma fonte proteica alternativa valiosa. Entre os aminoácidos essenciais, os de menor teor são a metionina (1,03%) e triptofano (0,71%), cujos os níveis são compatíveis com os encontrados no farelo de soja. Já entre os aminoácidos essenciais mais abundantes, destacam-se a lisina (3,51%), leucina (3,42%) e valina (3,42%), apresentando valores superiores aos do farelo de soja (LU et al., 2022; SILVA; LEHNEN; MARCATO, 2024).

As larvas de BSF apresentaram concentrações mais elevadas de aminoácidos essenciais em comparação com a farinha de BSF, com exceção da metionina, metionina + cisteína e valina. Em contrapartida, a farinha de BSF contém maiores teores de aminoácidos não essenciais, exceto para a tirosina. Essas diferenças ocorrem devido às transformações químicas e físicas teores durante o processamento e armazenamento da farinha (SILVA; LEHNEN; MARCATO, 2024).

O processamento das larvas de BSF para a produção de farinha envolve diversas etapas, como aquecimento, secagem e moagem, que podem impactar a estabilidade dos aminoácidos essenciais. O calor e outros fatores podem degradar ou modificar esses nutrientes, reduzindo suas concentrações finais na farinha (LAROCHE et al., 2019; LENI; CALIGIANE; SFORZA, 2019).

Além do impacto do processamento, as condições de armazenamento também influenciam o perfil nutricional da farinha de BSF. Fatores como exposição à luz, contato com o ar ou condições inadequadas de armazenamento podem acelerar a degradação de aminoácidos (SAUCIER et al., 2022).

Considerando o alto teor proteico da farinha de BSF, é essencial avaliar sua digestibilidade para determinar seu real aproveitamento pelas aves. Traksele et al. (2021) relatam que a digestibilidade proteica das larvas secas é de 48%. No entanto, a

digestibilidade das larvas desengorduradas alcançou 75%, demonstrando o impacto do teor de gordura na disponibilidade da proteína.

Ao avaliar o nível de inclusão e a digestibilidade dos nutrientes utilizando farinha BSF integral, Chu et al. (2020) observaram que a inclusão de 3% na dieta aumentou significativamente a digestibilidade da proteína bruta. Isso sugere que a absorção desses nutrientes melhora, mesmo em baixos níveis de inclusão.

A farinha da BSF apresenta coeficientes de digestibilidade para frangos de corte de 63,7% da matéria seca (MS), 71,2% da PB e 66,7% da energia bruta (EB). A energia metabolizável aparente (EMA) e energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn) foram de 3791 e 3498 kcal/kg, respectivamente (SILVA; LEHNEN; MARCATO, 2024).

As diferenças nos métodos de processamento também afetam a digestibilidade dos nutrientes. A farinha altamente desengordurada apresentou maior digestibilidade, com 80,4% para MS, 74,2% para PB e 92,2% para EB. Já a farinha integral teve coeficientes de 67,2% para MS, 72,6% para PB e 88% para EB. A farinha parcialmente desengordurada, por sua vez, teve 63,7% para MS, 46,3% para PB e 83,1% para EB (SILVA; LEHNEN; MARCATO, 2024).

Além de sua digestibilidade e valor energético, a farinha de BSF também se destaca como uma excelente fonte de minerais. A farinha apresenta elevados teores de cálcio, que podem atingir 9%, e fósforo variando entre 0,7% a 1,5%. O alto teor de cálcio pode ser atribuído à presença de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) na cutícula da BSF, que é secretado e depositado por elas. Essa forma de cálcio é mais solúvel e biodisponível, o que pode melhorar a absorção do mineral (SCHIAVONE et al., 2019; SEYEDALMOOSAVI et al., 2022).

Além do cálcio, a BSF pode fornecer uma fonte mais sustentável e eficiente de fósforo para aves, uma vez que contém principalmente fósforo não-fitato, altamente digerível e biodisponível. Também são encontrados outros minerais essenciais, como magnésio, potássio, sódio, ferro, zinco, cobre, manganês e selênio, cujas concentrações variam conforme o substrato e o método de processamento (SCHIAVONE et al., 2017; ZULKIFLI et al., 2022; SEYEDALMOOSAVI et al., 2022).

Outro diferencial das larvas de BSF é seu perfil lipídico, caracterizado por um alto teor de ácidos graxos saturados, como ácido láurico e mirístico. Esses compostos podem contribuir para a saúde intestinal e imunológica em frangos de corte, além de reduzir a

necessidade do uso de antimicrobianos (DÖRPER; VELDKAMP; DICKE, 2021; BEAN-HODGINS; KIARIE, 2021).

Além de sua composição nutricional, a BSF tem despertado interesse por seu potencial bioativo, especialmente pela presença de peptídeos antimicrobianos. A diversidade desses compostos pode estar relacionada aos hábitos alimentares das larvas, que se desenvolvem em substratos orgânicos em decomposição, frequentemente ricos em microrganismos. Esse ambiente estimula a produção de moléculas com propriedades antimicrobianas, que podem desempenhar um papel importante na saúde intestinal das aves e na redução do uso de antibióticos na produção animal (MÜLLER; WOLF; GUTZEIT, 2017; VOGEL et al., 2018).

## **2.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA-SOLDADO NEGRA: UMA FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Os insetos representam aproximadamente 90% de todas as espécies animais na Terra. No entanto, os pepitídeos antimicrobianos (PAMs) derivados de insetos correspondem a apenas cerca de 10% dos mais de 2.830 PAMs catalogados no Antimicrobial Peptide Database. Esse dado sugere um vasto potencial para a descoberta de novos PAMs funcionais em diferentes espécies dos insetos (YI et al., 2014; LI et al., 2017).

Os primeiros PAMs com atividade antibacteriana foram descobertos na hemolinfa das pupas da mariposa gigante da seda (*Samia Cynthia*) em 1974. Posteriormente, em 1980, foi purificado um peptídeo antimicrobiano do tipo cecropina da hemolinfa de pupas da mariposa *Hyalophora cecropia* após imunização experimental. Desde então, mais de 150 PAMs de insetos foram extraídos, purificados e identificados, ampliando o conhecimento sobre suas funções e aplicações (BOMAN et al., 1974; HULTMARK et al., 1980; YI et al., 2014).

Nos insetos, os PAMs são as principais moléculas efetoras do seu sistema imunológico inato. Eles podem ser produzidos localmente em diferentes epitélios de superfície ou secretados sistemicamente por hemócitos e pelo tecido adiposo na hemolinfa. Sua produção é induzida pelo reconhecimento de patógenos, funcionando como uma defesa essencial contra infecções (MORETTA et al., 2020; BUONOCORE et al., 2021; VAN MOLL et al., 2022).

Os PAMs da mesma classe podem apresentar propriedades biológicas distintas em diferentes espécies de insetos. Por exemplo, a cecropina A de *Anopheles gambiae*

(mosquito transmissor da malária) atua contra bactérias e fungos, enquanto sua versão em *Bombyx mori* (Bicho da seda) apresenta apenas atividade antibacteriana. Essas variações refletem diferenças estruturais e de tamanho, que influenciam a eficácia contra diferentes microrganismos (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

Os PAMs apresentam estruturas e mecanismos de ação distintos, permitindo sua classificação em quatro categorias principais, com base na sequência de aminoácidos e nas características estruturais: 1. Peptídeos com estrutura  $\alpha$ -helicoidal (como moricina e cecropina); 2. Peptídeos ricos em glicina (como gloverina e atacina); 3. Peptídeos ricos em prolina-arginina (como apidaecina, metchnikowin e drosocina) e 4. Peptídeos ricos em cisteína (como drosomicina e defensina). A maioria dos PAMs ativos contém entre 20 a 50 resíduos de aminoácidos e é gerada por meio da proteólise de proteínas precursoras inativas (YI et al., 2014).

Dentre os insetos estudados, *Hermetia illucens* se destacou na pesquisa de peptídeos antimicrobianos, cerca de cinquenta genes relacionados à codificação de peptídeos antimicrobianos já foram caracterizados no genoma da espécie, com perspectivas da existência de outros genes e compostos bioativos ainda não identificados (Tabela 2) (ZHAN et al., 2020). A similaridade estrutural e as sequências únicas das defensinas e cecropinas permitiram estudos mais aprofundados dos peptídeos antimicrobianos, em comparação com outros tipos encontrados na espécie. As defensinas, que possuem seis cisteínas conservadas, são os PAMs mais comuns em insetos (ČEŘOVSKÝ; BÉM, 2014).

**Tabela 2.** Peptídeos antimicrobianos presentes na mosca-soldado negra (*Hermetia illucens*).

| Peptídeo                                                             | Cepas induzidas pelo sistema imunológico |                                                 | Referência                             |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Defensinas                                                           |                                          |                                                 |                                        |
| Peptídeo semelhante a defensina 1 (DLP1)                             | 1                                        | <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881         | Park; Kim; Yoe, 2015                   |
| Peptídeo semelhante a defensina 2 (DLP2)                             | 2                                        | <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881         | Park; Kim; Yoe, 2015                   |
| Peptídeo semelhante a defensina 3 (DLP3)                             | 3                                        | <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881         | Park; Kim; Yoe, 2015; Park; Yoe, 2017a |
| Peptídeo semelhante a defensina 4 (DLP4)                             | 4                                        | <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881         | Park; Kim; Yoe, 2015                   |
| Peptídeos semelhantes a defensina (Jg7197.t1, Jg7902.t1 e Jg7904.t1) |                                          | <i>Salmonella. Typhimurium</i> SL1344           | Fahmy et al., 2024                     |
| Defensina 1 (HiDef1)                                                 |                                          | <i>Lactobacillus casei</i>                      | Lee; Yun; Goo, 2020                    |
| Cecropinas                                                           |                                          |                                                 |                                        |
| CecropinaZ1                                                          |                                          | <i>Escherichia coli e Staphylococcus aureus</i> | Elhag et al., 2017                     |
| Cecropina 1 (Hicec1)                                                 |                                          | <i>Lactobacillus casei</i>                      | Lee; Yun; Goo, 2020                    |
| Peptídeos semelhantes a cecropina 1 (CLP1)                           | 1                                        | <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881         | Park; Yoe, 2017a                       |
| Peptídeos semelhantes a cecropina 2 (CLP2)                           | 2                                        | <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881         | Park; Yoe, 2017a                       |
| Peptídeos semelhantes a cecropina 3 (CLP3)                           | 3                                        | <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881         | Park; Yoe, 2017a                       |
| Atacina                                                              |                                          |                                                 |                                        |
| <i>Hermetia illucens</i> -atacina                                    |                                          | <i>Escherichia coli</i> KCCM 11234              | Shin; Park, 2019                       |
| Sarcotoxina                                                          |                                          |                                                 |                                        |
| Sarcotoxina 1                                                        |                                          | <i>Escherichia coli e Staphylococcus aureus</i> | Elhad et al., 2017                     |
| Sarcotoxina (2a)                                                     |                                          | <i>Escherichia coli e Staphylococcus aureus</i> | Elhad et al., 2017                     |
| Sarcotoxina (2b)                                                     |                                          | <i>Escherichia coli e Staphylococcus aureus</i> | Elhad et al., 2017                     |
| Sarcotoxina 3                                                        |                                          | <i>Escherichia coli e Staphylococcus aureus</i> | Elhad et al., 2017                     |
| Estomoxina                                                           |                                          |                                                 |                                        |
| EstomoxynZH1                                                         |                                          | <i>Escherichia coli e Staphylococcus aureus</i> | Elhag et al., 2017                     |

As defensinas de insetos geralmente apresentam uma estrutura "loop-hélice-folha" ou "alfa-beta estabilizada por cisteína (CS $\alpha\beta$ )", caracterizada por um loop N-terminal, uma folha  $\beta$  antiparalela e uma hélice  $\alpha$  (CORNET et al., 1995). Um estudo realizado por Li et al. (2017) demonstrou que as defensinas DLP2 e DLP4 de *Hermetia illucens* formam uma típica estrutura CS $\alpha\beta$ , exibindo efeitos antibacterianos significativos contra *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), além de aumentar a taxa de sobrevivência de camundongos infectados.

De maneira semelhante, Park; Yoe (2017b) investigaram a família de cecropinas de *Hermetia illucens* e identificaram que o peptídeo CLP1, estruturalmente semelhante à cecropina e contendo uma hélice N-terminal, foi 50 vezes mais eficaz na inibição de *Escherichia coli* do que a ampicilina.

Embora as estruturas dos peptídeos antimicrobianos sejam diversas, seu mecanismo de ação está amplamente relacionado à destruição da membrana celular bacteriana. A maioria desses peptídeos possui uma estrutura catiônica, que se liga a componentes da parede celular, como lipopolissacarídeos (LPS), aos ácidos teicóicos e lipoteicóicos. Essa interação compromete a integridade da membrana bacteriana, levando à formação de canais iônicos ou poros transmembranares, resultando no vazamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, na morte da bactéria (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

Os mecanismos de lise da membrana podem ser classificados em quatro modelos principais: 1. Poro toroidal; 2. Tipo tapete; 3. Tipo barril; e 4. Poro de anel não estruturado. Os componentes lipídicos da superfície da membrana são os principais alvos dos PAMs. No mecanismo de poro toroidal, os PAMs se ligam aos componentes lipídicos da membrana e formam poros, resultando na ruptura da membrana bacteriana. Já no mecanismo tipo tapete, os PAMs cobrem a superfície da membrana de maneira semelhante a um tapete. Esse modelo requer alta concentração de PAMs para que ocorra a lise celular. Um exemplo de peptídeo que atua por esse mecanismo é a cecropina (JOZEFIK; ENGBERG, 2017).

No mecanismo tipo barril, os peptídeos se incorporam ao envelope celular e penetram no núcleo hidrofóbico da bicamada fosfolipídica, causando o vazamento de substâncias intracelulares e a redução do potencial de membrana. Entre os PAMs que utilizam esse mecanismo, destacam-se a ceratotoxina e anfotericina B. O quarto mecanismo envolve a formação desses "poros de anel não estruturado", nos quais os PAMs se alinham em uma estrutura semelhante a um anel e podem se fixar à membrana

em diferentes ângulos (DUCLOHIER, 2002; BESSIN et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2019).

Além de causar danos à membrana, alguns PAMs podem atravessá-la e interagir com moléculas intracelulares, interrompendo processos metabólicos essenciais. Dentro da célula, PAMs como a drosocina e a pirrocoricina interagem principalmente com a chaperona bacteriana DnaK, inibindo o dobramento de proteínas e provocando distúrbios metabólicos. Além disso, o DNA também pode ser um alvo. A região N-terminal do peptídeo antimicrobiano lactoferricina se liga a domínios específicos do DNA, onde pode regular a transcrição (NICOLAS, 2009; JOZEFIK; ENGBERG, 2017; CYTRYŃSKA et al., 2020).

Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos derivados de insetos surgem como uma alternativa promissora no combate a infecções, especialmente diante do crescente problema da resistência bacteriana. Além de sua ação direta contra patógenos, seu potencial pode ser ampliado por meio de estratégias biotecnológicas, como a fermentação controlada, permitindo o aumento da produção e eficácia desses compostos bioativos (CASTRO; SATO, 2016; OLIVEIRA; SOUZA; CASTRO, 2019).

### **2.3 FERMENTAÇÃO DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA-SOLDADO NEGRA: UMA ABORDAGEM BIOTECNOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS**

Alguns insetos são uma fonte alimentar sustentável e nutritiva, destacando-se pelo elevado teor de proteínas e aminoácidos essenciais. A mosca-soldado-negra (BSF) possui grande eficiência na conversão de resíduos orgânicos em biomassa. Suas larvas apresentam um teor proteico entre 35% e 57%, com uma composição equilibrada de aminoácidos, além de serem ricas em cálcio, fósforo e ácido láurico, conferindo-lhes propriedades funcionais (LIU et al., 2024a).

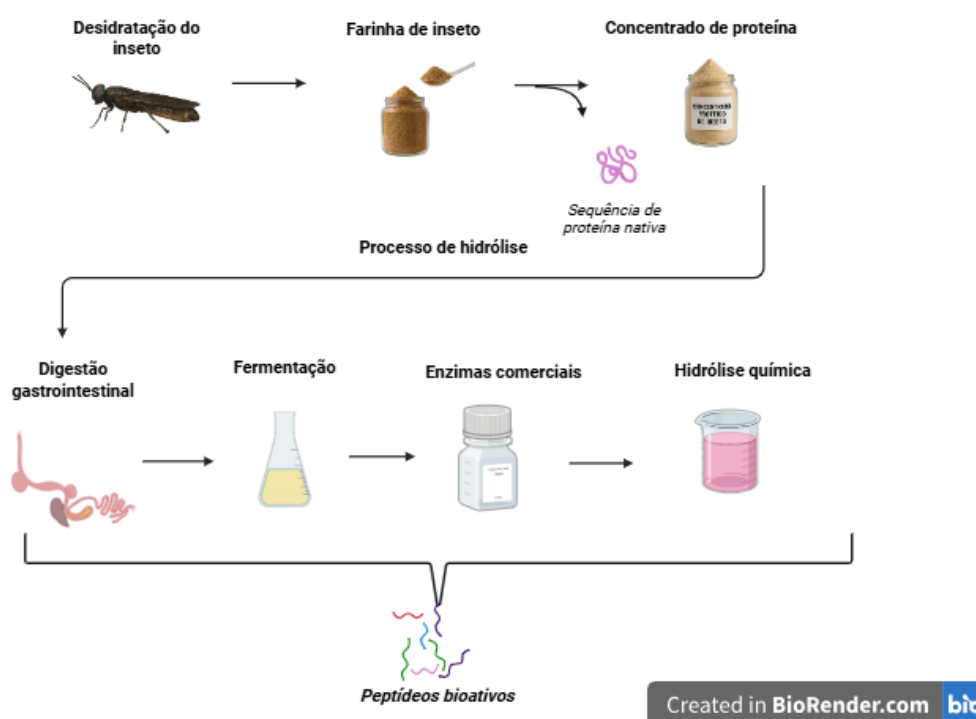
Além de seu valor nutricional, as proteínas dos insetos podem ser utilizadas como substrato em processos fermentativos com alta atividade proteolítica, resultando na liberação de peptídeos bioativos. Esses fragmentos proteicos de baixos pesos moleculares podem ser obtidos por diferentes métodos e apresentam propriedades anti-hipertensivas, antioxidantes, hipocolesterolêmicas, antimicrobianas e imunomoduladoras (MANZOOR; SINGH; GANI, 2022; CRUZ; OLIVEIRA; CASTRO, 2023).

A bioatividade desses peptídeos está diretamente relacionada ao seu tamanho, à composição de aminoácidos e à sua sequência na estrutura proteica. Fatores como

hidrofobicidade e carga dos aminoácidos desempenham um papel crucial na sua funcionalidade (GARZÓN et al., 2022).

Devido à sua ampla gama de funções biológicas, alta biodisponibilidade, efeitos tóxicos mínimos ou inexistentes e eficácia mesmo em baixas concentrações, os peptídeos têm despertado crescente interesse científico. Embora alguns sejam encontrados naturalmente em sua forma livre, a maioria precisa ser liberada a partir das proteínas por meio de hidrólise. Nos últimos anos, diversos peptídeos bioativos têm sido isolados de uma ampla variedade de fontes proteicas, incluindo insetos, o que reforça seu potencial como ingredientes funcionais na alimentação animal (MATOS; RASERA; CASTRO, 2024).

Dessa forma, a liberação desses compostos bioativos depende da aplicação de métodos específicos, como hidrólise enzimática, fermentação, uso de enzimas ou hidrólise química, que permitem a conversão das proteínas dos insetos em peptídeos funcionalmente ativos (Figura 2) (MATOS; RASERA; CASTRO, 2024).



**Figura 2.** Fluxograma dos processos aplicados à geração de peptídeos bioativos a partir de proteínas de insetos. Fonte: Adaptado de Matos; Rasera; Castro, 2024.

A digestão gastrointestinal é um dos processos naturais que levam à liberação de peptídeos bioativos a partir das proteínas ingeridas. No estômago, a pepsina inicia a hidrólise proteica, que continua no intestino delgado sob a ação de enzimas pancreáticas, como tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase. Além disso, enzimas da membrana da borda em escova contribuem para esse processo. A degradação das proteínas da dieta resulta na liberação de peptídeos e aminoácidos, alguns dos quais podem apresentar propriedades bioativas, exercendo efeitos locais no trato digestivo ou efeitos sistêmicos ao alcançarem órgãos e tecidos-alvo (DUPONT, 2017; FERNÁNDEZ-TOMÉ; HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2020).

Embora a digestão gastrointestinal *in vivo* permita a obtenção de peptídeos bioativos, essa abordagem é pouco utilizada, pois requer a remoção do conteúdo intestinal de organismos alimentados com dietas proteicas. Como alternativa, modelos de digestão *in vitro* têm sido amplamente empregados para simular as condições do trato gastrointestinal, replicando variáveis como pH, temperatura, presença de enzimas digestivas e sais biliares. Essa metodologia apresenta vantagens como menor custo, rapidez na obtenção dos resultados, quando comparada a ensaios clínicos (MATOS; RASERA; CASTRO, 2024).

A fermentação microbiana é amplamente utilizada para a produção de enzimas, mas também pode melhorar as propriedades biológicas e funcionais de matrizes alimentares. No contexto da obtenção de peptídeos bioativos, esse processo promove a hidrólise das proteínas do substrato por meio de enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos (MANFREDINI et al., 2021).

Entre as vantagens desse método, destacam-se a diversidade de microrganismos produtores de proteases, a geração de uma ampla gama de peptídeos bioativos e metabólitos secundários, a modificação simultânea de atributos sensoriais e tecnológicos. Além disso, a fermentação pode contribuir para o aumento da vida útil dos produtos fermentados. No entanto, esse processo apresenta desafios. O risco de contaminação indesejada, os custos mais elevados em comparação à hidrólise enzimática e o tempo prolongado de processamento podem exigir investimentos adicionais (RIZWAN et al., 2023; MATOS; RASERA; CASTRO, 2024).

Os dois principais sistemas de fermentação utilizados para a obtenção de peptídeos bioativos são a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido. Em ambos os casos, os microrganismos podem estar naturalmente presentes no substrato ou

ser introduzidos como cultura inicial (CASTRO; SATO, 2015a; MATOS; RASERA; CASTRO, 2024).

A fermentação submersa é mais adequada para microrganismos que se desenvolvem em ambientes líquidos ricos em nutrientes, como as bactérias. Esse método ocorre em meio líquido, o que facilita a purificação dos peptídeos gerados e permite um melhor controle dos parâmetros do processo. Por outro lado, a fermentação em estado sólido é mais apropriada para o cultivo de fungos e microrganismos que requerem menor disponibilidade de água. Essa técnica apresenta vantagens como menor risco de contaminação, maior produtividade, processamento simplificado, menor consumo de energia e menor geração de águas residuais (CASTRO; SATO, 2015a; MATOS; RASERA; CASTRO, 2024).

Entre os microrganismos utilizados na obtenção de peptídeos bioativos, destacam-se as bactérias ácido-láticas (BAL) pela sua eficiência. Muitas cepas são classificadas como “geralmente reconhecidas como seguras” (*generally recognized as safe*-GRAS) e possuem um sistema proteolítico bem desenvolvido, composto por proteinases associadas à membrana celular e peptidases intracelulares. Diversas espécies têm sido amplamente relatadas como eficazes na hidrólise de proteínas e liberação de peptídeos bioativos, incluindo *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactococcus lactis ssp. diacetylactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (CASTRO; SATO, 2015b).

Além das bactérias, fungos e leveduras, como *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces marxianus*, também são empregados na obtenção de peptídeos bioativos. Embora seus sistemas proteolíticos sejam menos elaborados que os das bactérias ácido-láticas, eles ainda são capazes de hidrolisar proteínas e gerar peptídeos bioativos por meio de hidrólise limitada (CRUZ-CASAS et al., 2021).

Um exemplo notável é *Aspergillus tubingensis*, um fungo filamentoso da seção *Nigri* de *Aspergillus*, reconhecido como GRAS pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. Seus metabólitos têm aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos e têxteis. Além disso, compostos como as nafto-gama-pironas (N $\gamma$ Ps) apresentam propriedades antioxidantes, podendo contribuir para o potencial antioxidante de extratos fermentados (CRUZ; OLIVEIRA; CASTRO, 2023).

Peptídeos bioativos também podem ser liberados por meio da ação de proteases comerciais, sendo essa uma das técnicas mais utilizadas. Isso se deve à alta especificidade das enzimas, às condições brandas de pH e temperatura requeridas, além da ausência de

solventes orgânicos e da não formação de resíduos tóxicos durante as reações. A especificidade das proteases está relacionada à sua afinidade pela sequência de aminoácidos à ligação peptídica a ser clivada (CASTRO; SATO, 2015a; ULUG; JAHANDIDEH; WU, 2021).

Embora proteases possam ser extraídas de fontes animais e vegetais, essas alternativas apresentam limitações, especialmente quanto à eficiência de extração. Por isso, as enzimas de origem microbiana, obtidas por fermentação, são as mais comumente empregadas. A hidrólise enzimática pode ser realizada com o uso de enzimas livres ou imobilizadas, ou ainda com o auxílio de membranas de ultrafiltração. Durante o processo, a clivagem das ligações peptídicas aumenta a densidade de carga e reduz a massa molecular das proteínas, o que eleva a solubilidade dos produtos formados. Após a hidrólise, a centrifugação permite separar o precipitado (proteínas não hidrolisadas) do sobrenadante, que contém os peptídeos solúveis (MATOS; CASTRO, 2021; CRUZ-CASAS et al., 2021).

As propriedades antioxidantes dos peptídeos bioativos estão associadas à sua capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio, quelatar metais de transição pró-oxidativos e reduzir hidroperóxidos. As espécies reativas de oxigênio são geradas como subprodutos do metabolismo celular e desempenham funções essenciais na defesa contra patógenos e na regulação de vias de sinalização intercelular. No entanto, seu acúmulo excessivo pode levar ao estresse oxidativo (TADESSE; EMIRE, 2020; ROCHA; ANDRADE; OLIVEIRA, 2021).

Em animais de rápido crescimento, como frangos de corte, o metabolismo acelerado e a elevada produção de calor corporal podem torná-los ainda mais suscetíveis ao estresse oxidativo, especialmente em condições de altas temperaturas (RIBEIRO et al., 2023). Esse cenário reforça a importância de compostos antioxidantes, como peptídeos bioativos, tanto para melhorar a resposta fisiológica dos animais quanto para aplicações industriais, como inibidores da peroxidação lipídica em alimentos (TADESSE; EMIRE, 2020).

Os peptídeos de baixo peso molecular (<3 kDa) e aqueles ricos em aminoácidos hidrofóbicos apresentam maior capacidade antioxidante. Isso ocorre porque os grupos laterais desses aminoácidos ficam mais expostos para interagir com radicais livres, além de poderem doar elétrons com maior eficiência para neutralização dessas moléculas instáveis (MATOS; NOVELLI; CASTRO, 2021).

Um estudo de Firmansyah; Abduh (2019), investigaram o potencial bioativo do hidrolisado proteico de larvas de mosca-soldado negra (BSFL), obtido por hidrólise enzimática com bromelaína. O hidrolisado apresentou uma composição rica em aminoácidos essenciais hidrofóbicos, como lisina (8,0%), leucina (7,7%) e valina (7,3%), características que favorecem sua bioatividade. Além disso, demonstrou expressiva capacidade antioxidante, eliminando até 77% dos radicais livres 2,2-difenil-2-picril hidrazila (DPPH), reforçando seu potencial como ingrediente funcional para aplicações na saúde e na indústria de alimentos.

Peptídeos bioativos com efeito anti-hipertensivo atuam inibindo a enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II, um vasoconstritor. Além disso, a ECA degrada a bradicinina, um peptídeo vasodilatador. Sua inibição reduz a pressão arterial, tornando esses peptídeos potenciais agentes no controle da hipertensão (BHAT; KUMAR; BHAT, 2017; DURAK; NESLIHAN, 2020).

No controle da glicemia, peptídeos bioativos podem inibir enzimas digestivas, como  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, reduzindo a conversão de carboidratos em açúcares absorvíveis. Além disso, podem impedir a degradação do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) pela dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), favorecendo a secreção de insulina e o controle da glicose sanguínea (KEHINDE; SHARMA, 2020).

As propriedades anti-inflamatórias desses peptídeos ainda são pouco exploradas, mas alguns estudos sugerem que podem inibir enzimas como lipoxigenase (LOX) e ciclooxygenase-2 (COX-2). Sua eficácia parece depender do tipo de hidrólise realizada, sendo que peptídeos de baixo peso molecular são mais facilmente absorvidos pelo intestino. Peptídeos mais longos, como a lunasina, também apresentam atividade anti-inflamatória, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado (CASTRO; SATO, 2015b).

Os peptídeos bioativos apresentam uma ampla gama de propriedades funcionais, sendo as atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antidiabética e anti-inflamatória as mais estudadas em hidrolisados de proteínas de insetos (MATOS; RASERA; CASTRO, 2024). No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam a aplicação desse processo biotecnológico na nutrição de frangos de corte. Considerando o potencial desses compostos para modular a resposta imunológica, reduzir o estresse oxidativo e promover a saúde intestinal, sua inclusão em dietas avícolas pode representar uma alternativa

promissora ao uso de aditivos convencionais, especialmente em sistemas que buscam reduzir a dependência de antibióticos.

#### **2.4 USO DA FARINHA DA LARVA DA MOSCA SOLDADO NEGRA EM FRANGOS DE CORTE**

A produção de insetos para alimentação animal tem avançado significativamente, impulsionada pela necessidade de aumentar a autossuficiência proteica e melhorar o bem-estar animal por meio do enriquecimento ambiental, além de serem uma fonte natural na dieta das aves. Entre as espécies exploradas, as larvas da mosca-soldado negra (*Hermetia illucens*, BSF) destacam-se por sua facilidade de criação e capacidade de reciclar uma ampla variedade de subprodutos e resíduos agroindustriais. Além de seu alto valor nutricional, as larvas de BSF contêm compostos bioativos, como quitina, ácido láurico, antioxidantes e peptídeos antimicrobianos, que contribuem para a modulação da microbiota intestinal e a saúde animal (BELHADJ SLIMEN et al., 2023).

Diante desses atributos, a farinha e o óleo de BSF têm sido estudados como ingredientes alternativos em dietas de frangos de corte, visando substituir fontes convencionais de proteína e de óleo. Estudos indicam que a inclusão de 5% a 15% de farinha desengordurada de BSF ou até 20% de farinha integral pode melhorar o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte (DABBOU et al., 2018; SOUZA et al., 2021; SCHIAVONE et al., 2018).

Além disso, a substituição total do óleo de soja por gordura de BSF em dietas para frangos de corte ou a substituição de até 15% de farinha desengordurada para frangos de corte e codornas não alterou os parâmetros de qualidade da carne de peito e perna, embora tenha aumentado o teor de ácidos graxos saturados (SCHIAVONE et al., 2017; CULLERE et al., 2019; SHIAVONE et al., 2019). No entanto, alguns estudos relatam efeitos sobre características da carne, como redução do pH e coloração mais clara, especialmente com a inclusão de 5% de farinha parcialmente desengordurada ou integral (POPOVA; PETKOV; IGNATOVA, 2020).

A substituição parcial e total do óleo de soja por gordura de larvas de BSF não afetou negativamente o desempenho, o microbioma cecal ou a saúde metabólica dos frangos de corte (SCHÄFER et al., 2023). Em galinhas poedeiras, a substituição parcial do farelo de soja por larvas de BSF integrais, assim como a substituição total do óleo de soja por óleo de BSF, também não comprometeu o desempenho produtivo nem a qualidade dos ovos (PATTERSON et al., 2021).

Dessa forma, a utilização da BSF na alimentação de frangos de corte se apresenta como uma alternativa promissora, minimizando o uso de ingredientes convencionais e promovendo maior sustentabilidade na produção avícola. A Tabela 3 apresenta um resumo dos estudos que avaliaram a utilização da farinha de BSF em dietas para frangos de corte, destacando os principais níveis de inclusão e seus principais resultados.

**Tabela 3.** Efeitos da utilização da farinha de larvas da mosca-soldado negra na dieta de frangos de corte.

| Uso de Farinha                   | Estudo                                                                            | Resultados                                                                                                                                                                               | Referência              |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| FBSF <sup>1</sup> desengordurada | Inclusão de 5%, 10% e 15%                                                         | Aumento do peso vivo, ganho médio diário e consumo de ração para o nível 10%; Diminuição relação vilo/ cripta para 15% de inclusão.                                                      | Dabbou et al., 2018     |
| FBSF integral                    | Substituição parcial (13,8%, 27,4% e 42%) do farelo de soja e da farinha de peixe | Não houve efeito para os parâmetros de desempenho ou qualidade da carne.                                                                                                                 | Onsongo et al., 2018    |
| FBSF integral                    | Substituição parcial (50% e 75%) ou total (100%) ao farelo de soja                | Redução do peso vivo; Diminuição do ganho de peso, consumo de ração; Redução do peso de carcaça e aumento de gordura abdominal, carcaça e vísceras.                                      | Murawska et al., 2021   |
| FBSF desengordurada              | Substituição 4%, 8% e 12% da farinha de peixe                                     | A substituição de 4% apresentou o melhor desempenho; Não houve alteração nos parâmetros sanguíneos                                                                                       | Mat et al., 2022        |
| FBSF parcialmente desengordurada | Substituição parcial (12,5%, 25%, 50% e 100%)                                     | Redução do desempenho com os altos níveis de BSF; os menores níveis de inclusão tiveram efeito benéfico no desempenho na fase inicial.                                                   | Facey et al., 2023      |
| FBSF parcialmente desengordurada | Substituição parcial (12,5%, 25%, 50% e 100%)                                     | Os maiores níveis de substituição tiveram uma redução no desempenho; 12,5% apresentou o melhor desempenho ; O metaboloma das excretas com 100% BSF exibiu maiores níveis de aminoácidos. | Fruci et al., 2023      |
| FBSF                             | Substituição 5% e 10% do farelo de soja                                           | A substituição de 5% apresentou melhor desempenho e maior peso vivo final ao abate.                                                                                                      | Heita et al., 2023      |
| FBSF                             | Substituição ao farelo de soja (0%, 6% e 12%)                                     | A inclusão de 12% de farinha de BSF como substituto do farelo de soja não afetou o desempenho, a utilização de nutrientes, as características de carcaça nem a qualidade da carne.       | Baderuddin et al., 2024 |

<sup>1</sup>FBSF- Farinha da mosca-soldado negra

Além de seu potencial nutricional, a farinha da BSF também apresenta propriedades antioxidantes. Dabbou et al. (2018) relataram que a suplementação dietética de 5%, 10% e 15% da farinha de BSF desengordurada não teve efeito sobre as concentrações de eritrócitos, aspartato aminotransferase (AST), creatinina, triglicerídeos, colesterol, proporção de heterófilos para linfócitos (H/L), leucócitos e ácido úrico. No entanto, houve um aumento nos níveis de glutathione peroxidase (GPx) e o estado antioxidante total (TAS), sugerindo um efeito positivo na defesa contra o estresse oxidativo.

Além disso, a inclusão da BSF na dieta pode influenciar positivamente a saúde intestinal. Biasato et al. (2020) observaram que a inclusão de 5% da farinha da BSF aumentou a produção de mucina nas vilosidades intestinais, reforçando a barreira de muco e contribuindo para uma possível melhora na microbiota intestinal. No entanto, níveis mais altos de BSF (10% e 15%) reduziram a intensidade da coloração da mucina, indicando uma possível diminuição na produção ou aumento da degradação.

No âmbito da imunológico, Lee et al. (2018) demonstraram que a inclusão de BSF na dieta de frangos de corte aumentou a frequência de linfócitos T CD4+, estimulou a atividade da lisozima sérica e promoveram a proliferação de linfócitos no baço. O aumento linfócitos T CD3+CD4+ foi marcante nos grupos alimentados com BSF, o que sugere uma potencial melhora na resposta imunológica. Esse aumento na atividade da lisozima sérica sugere uma maior capacidade dos fagócitos em destruir patógenos. Além disso, a inclusão de 3% de BSF na dieta resultou em uma melhor taxa de sobrevivência contra infecções por *Salmonella gallinarum*.

Souza et al. (2021), avaliaram a inclusão de larvas de BSF integrais em dietas para frangos de corte e observaram uma redução nos linfócitos do sangue periférico e na porcentagem de células T citotóxicas intraepiteliais (CD3+CD8+), responsáveis pela eliminação de células infectadas por vírus. Os linfócitos T auxiliares intraepiteliais (CD3+CD4+), que regulam a resposta imune adaptativa, também foram afetados. Esse efeito foi atribuído ao perfil de ácidos graxos da BSFL, que pode ter influenciado os linfócitos intraepiteliais. A redução dessas células pode ter contribuído para a melhora do desempenho das aves, uma vez que menos energia foi direcionada para a resposta imune, ficando disponível para o crescimento.

A influência da BSF na microbiota intestinal também tem sido estudada. Ndotono et al. (2022) relataram que dietas contendo 75% de BSF aumentou significativamente a população de bactérias lácticas benéficas e promoveram maior diversidade da microbiota.

Por outro lado, Biasato et al. (2020) mostraram que, enquanto a inclusão de 5% de BSF estimulou o crescimento de gêneros bacterianos benéficos, níveis mais elevados (15%) reduziram a complexidade microbiana e aumentaram bactérias mucolíticas, o que pode comprometer a integridade intestinal. Vilela et al. (2023) relataram que dietas com até 20% de BSFL reduziram a abundância de *Enterococcus* e *Christensenellaceae*, enquanto promoveram o aumento de bactérias produtoras de butirato, como *Roseburia* e *Dehalobacterium*, potencialmente benéficas para a saúde intestinal.

Além dos efeitos imunomoduladores e do impacto na microbiota intestinal, estudos recentes têm investigado o potencial da BSF no controle de infecções entéricas em aves. Um estudo realizado por Yuan, Ajuwon e Adeola (2025) avaliando a suplementação de farinha de larvas de mosca soldado negra parcialmente desengordurada em frangos de corte infectados por coccídeos, utilizando três níveis de inclusão (0%, 6% e 12%). Os resultados indicaram que a inclusão de 6% de BSF pode beneficiar o crescimento e o bem-estar de aves saudáveis. No entanto, em frangos submetidos ao desafio com coccídios, níveis antes considerados seguros ou benéficos também apresentaram efeitos adversos. Em especial, a inclusão de 12% afetou negativamente o desempenho, a morfologia ileal e a produção de acetato cecal, além de reduzir a expressão de citocinas essenciais na resposta à infecção.

Apesar desses achados, estudos *in vitro* de Sedano et al. (2025) demonstram que extratos proteicos e lipídicos de larvas de BSF possuem atividade anticoccidiana. A inibição da invasão dos coccídeos foi eliminada após a esterilização dos extratos por filtração, enquanto a inibição do desenvolvimento ainda foi observada, embora com menor eficiência. Isso sugere que diferentes compostos ativos da BSF estão envolvidos na atividade anticoccidiana. Tanto os extratos proteicos quanto os lipídicos exibiram essa atividade, reforçando o potencial da BSF como agente funcional na prevenção da coccidiose. No entanto, os autores relatam que são necessárias para identificar e isolar os compostos responsáveis por esses efeitos e validar seus benefícios sob condições *in vivo*.

Além dos efeitos nutricionais e imunológicos, a BSF também se destaca como um ingrediente funcional devido à presença de quitina em seu exoesqueleto. Produtos derivados da degradação da quitina, como a quitosana e quito-oligossacarídeos, demonstram diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antibacteriana, antifúngica e antiviral (CHIRKOV, 2002; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2008; LIU et al., 2010; CALIGIANI et al., 2018; LIAQAT; ELTEM, 2018).

Esses compostos podem modular a microbiota intestinal e fortalecer a imunidade das aves, tornando a BSF um ingrediente promissor tanto como fonte de nutrientes quanto como aditivo funcional na nutrição animal. Além disso, estratégias complementares, como a associação com probióticos, especialmente cepas de *Bacillus*, vêm sendo estudadas para potencializar a saúde intestinal e o desempenho das aves.

## **2.5 POTENCIAL PROBIÓTICO DO *BACILLUS VELEZENSIS* NA AVICULTURA**

Na produção animal, a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento, além do uso profilático, é responsável por cerca de 73% do consumo global desses medicamentos (RODRIGUES et al., 2024). O uso contínuo desses compostos em doses subterapêuticas e a presença de resíduos nos alimentos favorecem a seleção de bactérias resistentes, representando um risco à saúde pública. Como resposta a essa preocupação, alguns países da União Europeia proibiram o uso de antimicrobianos na pecuária, impulsionando a busca por alternativas naturais que mantenham a eficiência produtiva sem comprometer a viabilidade econômica do setor (TALAT et al., 2023).

Diante desse cenário, os probióticos têm se destacado como uma alternativa promissora na produção animal, auxiliando na redução de problemas de saúde pública e promovendo práticas livres de antimicrobianos (LU et al., 2020). Na avicultura, seu uso favorece o equilíbrio da microbiota intestinal, contribuindo para o desenvolvimento de um ambiente intestinal saudável. Como resultado, há um aumento no comprimento das vilosidades intestinais, o que potencializa a absorção de nutrientes e melhora o desempenho produtivo das aves (GHIMIRE et al., 2024).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) definem os probióticos como organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2002; YADAV; JHA, 2019). Esses benefícios estão diretamente relacionados aos seus mecanismos de ação, que envolvem a interação com a microbiota intestinal e o sistema imunológico do hospedeiro.

Entre os principais mecanismos de ação dos probióticos, destacam-se a exclusão competitiva e a modulação do sistema imunológico. A exclusão competitiva ocorre por diferentes estratégias, como a produção de compostos antimicrobianos, a prevenção da adesão de patógenos à mucosa intestinal e a competição por nutrientes. Já a modulação do sistema imunológico envolve o fortalecimento da resposta imune do hospedeiro,

contribuindo para a prevenção de infecções e a manutenção do equilíbrio da microbiota (HOSSAIN et al., 2012; YADAV; JHA, 2019; HERNANDEZ-PATLAN et al., 2019).

Ao chegarem ao intestino, as bactérias probióticas colonizam a mucosa intestinal ao se aderirem às proteínas de ligação à mucina, competindo com patógenos entéricos por nichos intestinais e nutrientes. Esse processo, conhecido como exclusão competitiva, impede a adesão de bactérias patogênicas aos sítios de ligação epitelial intestinal, reforçando a barreira contra infecções (MONTEAGUDO-MERA et al., 2019).

A adesão à mucosa intestinal é um dos principais critérios para a seleção de cepas probióticas eficientes, pois, além de favorecer a colonização, ativa a imunidade da mucosa e estimula a produção de mucinas e defensinas, que fortalecem a barreira epitelial. As mucinas são glicoproteínas altamente glicosiladas produzidas pelas células epiteliais intestinais, responsáveis por proteger e lubrificar as superfícies das células epiteliais. Essas moléculas compõem a matriz do muco intestinal e desempenham um papel essencial na inibição da adesão e colonização de bactérias patogênicas (HALDER et al., 2024).

O muco intestinal, formado principalmente pelas mucinas MUC1 e MUC2, é secretado pelas células caliciformes e constitui um componente fundamental da barreira intestinal. Além de atuar como primeira linha de defesa, ele serve como local de adesão e colonização tanto para bactérias benéficas quanto para patógenos, como *C. perfringens*. Estudos demonstram que os probióticos estimulam a produção de mucina, promovendo sua própria fixação à mucosa e, ao mesmo tempo, dificultando a adesão e invasão de microrganismos patogênicos, contribuindo para a manutenção da saúde intestinal (ALIAKBARPOUR et al., 2012; MARTENS; NEUMANN; DESAI, 2018; VIECO-SAIZ et al., 2024; ELBAZ et al., 2025).

A integridade epitelial intestinal é mantida por diversos fatores, entre os quais as proteínas das junções (TJP), como claudina e ocludina, e a produção de muco desempenham um papel essencial na prevenção da entrada de patógenos pela barreira intestinal. No entanto, patógenos produtores de toxinas, como *C. perfringens*, podem comprometer essa barreira ao interromper a expressão de TJPs, resultando em danos à mucosa intestinal (CHELAKKOT; GHIM; RYU., 2018).

Estudos indicam que algumas espécies probióticas são capazes de aumentar a expressão de TJPs, auxiliando na manutenção da integridade da mucosa em aves saudáveis e na reparação de lesões induzidas por doenças entéricas, incluindo a enterite necrótica (FATHOLAH et al., 2021). Além disso, os probióticos exercem efeitos

imunomoduladores por meio da interação com receptores celulares, como os receptores Toll-like (TLR), estimulando a produção de citocinas, quimiocinas e imunoglobulina A (IgA) na mucosa. Esses mecanismos contribuem para a regulação da inflamação intestinal e a manutenção da homeostase (YOUSEFI et al., 2019; NINGSIH et al., 2023).

Além da modulação do sistema imune, os probióticos desempenham um papel essencial na inibição de patógenos por meio da produção de compostos antimicrobianos. Entre esses compostos, destacam-se os peptídeos antimicrobianos, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, que reduzem a invasão de microrganismos indesejáveis (LIAO; NYACHOTI, 2017; KHALID et al., 2022).

As bacteriocinas, sintetizadas por ribossomos, apresentam ação específica contra cepas bacterianas patogênicas, podendo ser classificadas com base em seu tamanho, estrutura e modificações pós-traducionais. Além disso, possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro, eliminando patógenos de maneira seletiva, sem comprometer as bactérias benéficas da microbiota intestinal. Seus mecanismos de ação incluem a lise direta de patógenos, sinalização célula-célula e facilitação da colonização de microrganismos comensais (DOBSON et al., 2012; COTTER; ROSS; HILL, 2013; KHALID et al., 2022).

Os ácidos orgânicos também desempenham um papel fundamental na inibição bacteriana, atuando diretamente sobre a membrana citoplasmática e a parede celular, comprometendo suas funções metabólicas essenciais. Seu mecanismo de ação envolve a redução do pH intracelular e a interrupção do fluxo de prótons, levando ao esgotamento da energia celular e, conseqüentemente, à inibição do crescimento bacteriano (NAIR; AMALARADJOU; VENKITANARAYANAN, 2017; ZHITNITSKY; ROSE; LEWINSON, 2017).

Além desses compostos, os probióticos também secretam substâncias como ácido láctico e ácido butírico, que fortalecem sua capacidade antimicrobiana e beneficiam a saúde do hospedeiro. O ácido láctico pode ser convertido em butirato por bactérias produtoras desse ácido, promovendo um ambiente intestinal mais equilibrado (KULKARNI et al., 2022).

Entre os microrganismos com potencial probiótico, o *Bacillus spp.* se destaca devido à sua capacidade de formar esporos, conferindo resistência a variações de temperatura e pH, permitindo sua sobrevivência durante o processamento e armazenamento da ração. Além disso, exerce funções essenciais no trato intestinal das aves (JADHAV et al., 2015; CIURESCU et al., 2020).

Dentre as espécies do gênero, destaca-se o *Bacillus velezensis*, uma bactéria gram-positiva inicialmente isolada na Espanha, com ampla distribuição em ambientes como solo, raízes de plantas, folhas, água do mar e trato gastrointestinal de animais. Essa espécie vem se destacando por sua capacidade de produzir enzimas digestivas (amilase, celulase, protease e lipase) e metabólitos bioativos, como bacteriocinas, lipopeptídeos e policetídeos, que conferem propriedades antimicrobianas (LIU et al., 2024b).

Além dessas características, *B. velezensis* possui ampla aplicabilidade nas áreas agrícola, biotecnológica e ambiental, atuando na promoção do desenvolvimento vegetal, no controle de patógenos de plantas, além de exercer efeitos probióticos em dietas animais. Adicionalmente, essa espécie tem sido explorada na produção de biopolímeros, compostos antimicrobianos, agentes com potencial anticancerígeno, biossurfactantes e na degradação de resíduos da agroindústria (SOUSA et al., 2025)

Na avicultura, sua eficácia como aditivo alimentar tem sido evidenciada em diferentes estudos. A cepa ZBG17, isolada de amostras de solo, melhorou a eficiência alimentar e estimular a resposta imune humoral em frangos de corte. Além disso, apresentou atividade antibacteriana de amplo espectro, inibindo tanto patógenos gram-positivos (*Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens*) quanto gram-negativos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella sonnei*). Essa capacidade antimicrobiana está associada ao fato de que aproximadamente 19,2% de seu genoma é composto por genes codificadores de metabólitos antimicrobianos (SONI et al., 2021).

Outras cepas também têm mostrado efeitos promissores. A cepa LB-Y-1, obtida do trato digestivo de animais silvestres, favoreceu o desempenho produtivo de frangos de corte, a mineralização óssea devido a maior ativação do metabolismo e a utilização do fósforo, além de modular positivamente a microbiota (LI et al., 2023). De forma semelhante, linhagens isoladas de esterco suíno promoveram melhorias na produção e qualidade dos ovos de galinhas poedeiras, bem como nos parâmetros bioquímicos plasmáticos (YE et al., 2020).

O sobrenadante livre de células da cepa *B. velezensis* BV01 apresentou atividade antibacteriana e antibiofilme expressiva contra *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas resistentes à meticilina (MRSA), por meio da inibição do crescimento bacteriano, da formação de biofilmes e da redução da viabilidade de biofilmes já estabelecidos. Esse efeito está associado à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e à presença de

compostos antimicrobianos codificados em seu genoma, sendo observada uma redução de até 60% na viabilidade de células de *S. aureus* e 45% de MRSA (PERINI et al., 2024).

De forma complementar, a cepa *B. velezensis* CAU277 apresentou potente atividade inibitória contra *Campylobacter jejuni*, tanto em ensaios in vitro quanto in vivo, sugerindo que sua ação antimicrobiana está relacionada à produção de metabólitos bioativos. Além disso, a suplementação dessa cepa na dieta mostrou-se eficaz na redução da colonização por *C. jejuni* no trato intestinal, provavelmente por modular a microbiota intestinal (CUI et al., 2024).

Esses estudos reforçam o potencial de *B. velezensis* como probiótico promissor para a avicultura, contribuindo tanto para o desempenho quanto para a saúde intestinal das aves. No entanto, ainda são escassas as investigações sobre sua eficácia em condições sanitárias desafiadoras, como a enterite necrótica, e, especialmente, sobre sua associação com ingredientes funcionais, como a farinha da mosca-soldado-negra. A combinação desses aditivos pode representar uma estratégia nutricional inovadora, sendo particularmente relevante frente às limitações do uso de antibióticos na produção avícola.

## 2.6 ETIOLOGIA E FATORES PREDISPOANTES DA ENTERITE NECRÓTICA

A enterite necrótica (EN) é uma doença entérica de grande relevância na avicultura, impactando diretamente a rentabilidade da indústria (ABD EL-HACK et al., 2022). Para desenvolver estratégias eficazes no controle da EN, é fundamental compreender a patogênese, os fatores predisponentes e a virulência de *Clostridium perfringens*. Além disso, essa bactéria não se restringe à EN, sendo também responsável por diversas doenças gastrointestinais em humano e animais (MOORE, 2024).

Geralmente, a EN afeta aves em boas condições corporais entre 2 e 6 semanas de idade, pois os anticorpos maternos fornecem proteção por aproximadamente três semanas. Após esse período, a redução dos anticorpos maternos (IgY) torna as aves mais suscetíveis à infecção. Dessa forma, a manifestação da EN pode ocorrer de duas formas: clínica e subclínica (EMAMI; DALLOUL, 2021).

A forma clínica é caracterizada pelo aumento da mortalidade, penas eriçadas, diarreia, amontoamento e depressão das aves. Patologicamente, está associada à necrose extensa, observada principalmente no intestino delgado, podendo causar escurecimento do fígado. Em algumas situações, o aumento súbito da taxa de mortalidade é o primeiro

e único sinal, sem outros sintomas premonitórios (HOFACRE; SMITH; MATHIS, 2018; SANDVANG et al., 2021).

Por outro lado, a forma subclínica, embora não apresente sintomas visuais aparentes, representa maior prejuízo econômico na avicultura industrial do que a forma clínica. Isso se justifica pelo fato de que a infecção é caracterizada por causar danos à mucosa intestinal, ocasionando um aumento demasiado da camada de muco no intestino delgado comprometendo a eficiência da digestão e absorção dos nutrientes. Considerando que os custos com ração variam entre 65 e 75% dos custos de produção de frangos de corte, menor eficiência digestiva e/ou absorptiva da ave pode resultar em menor lucratividade (SHINI et al., 2020; MORA et al., 2020).

O aumento da camada de muco está diretamente relacionado ao processo de patogênese de *Clostridium perfringens*, que pode ser dividido em seis fases principais: 1. Colonização do local de predileção; 2. Multiplicação; 3. Aquisição de nutrientes; 4. Resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro; 5. Lesões aos tecidos e 6. Transmissão. No caso de patógenos de crescimento rápido como *C. perfringens*, essas fases são dinâmicas, ocorrem quase que simultaneamente e podem se tornar indistintas (PRESCOTT et al., 2016a).

Um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra a colonização bacteriana é a secreção de mucinas pelas células epiteliais intestinais, criando uma barreira física contra patógenos. A colonização e a degradação dessa camada de muco são essenciais para que *C. perfringens* se estabeleça e desenvolva a EN. Os oligossacarídeos na região glicosilada central das glicoproteínas de mucina oferecem potenciais locais de ligação para adesinas bacterianas. Além disso, *C. perfringens* secreta bacteriocinas, como perfrinas, que podem deslocar espécies comensais de *Clostridium* que colonizam a mucosa intestinal (TIMBERMONT et al., 2014).

Para se proliferar, *C. perfringens* utiliza de diferentes mecanismos enzimáticos. Suas hidrolases de glicosídeos são capazes de metabolizar os açúcares dos oligossacarídeos como fonte de energia. O muco degradado se torna, então, uma fonte nutricional para o *C. perfringens*, permitindo a formação de microcolônias na mucosa (FUJITA et al., 2011; FICKO-BLEAN et al., 2012; PRESCOTT et al., 2016b; LOW et al., 2021).

A comunicação entre *C. perfringens* ocorre por quorum sensing, um mecanismo em que moléculas sinalizadoras ativam a expressão de genes de virulência conforme a densidade bacteriana aumenta. Esse processo regula o sistema VirR-VirS, essencial para

a produção de fatores de virulência e enzimas proteolíticas e colagenolíticas. Essas substâncias degradam a camada de muco, comprometem o domínio basal dos epitélios e avançam pelas as junções intracelulares, levando à necrose e descamação do intestinal, agravando o quadro da EN (OHTANI; SHIMIZU, 2015; YU et al., 2017; FATHIMA et al., 2022).

O impacto da EN ocasiona danos estruturais significativos no intestinal delgado principalmente no jejuno e íleo, mas também podem ser observadas no duodeno e ceco. O intestino delgado costuma apresentar-se fino, friável e distendido com gás. A presença de uma pseudomembrana de coloração laranja-amarelada confere ao intestino a característica aparência de "Dirty Turkish Towel" típica da enterite necrótica. A formação de pseudomembrana ou membrana diftérica é frequentemente notada no jejuno e, em menor grau, no duodeno, íleo e ceco (ABD EL-HACK et al., 2022).

Além das lesões intestinais, a EN pode levar a complicações hepáticas, estando associada à hepatite ou colangiohepatite, bem como à distensão da vesícula biliar. Os ácidos biliares favorecem a esporulação e a produção de enterotoxina por *C. perfringens*, o que contribui para o aparecimento de lesões necróticas na parte superior do intestino delgado, como o duodeno e o jejuno (PARK; RAFFI, 2018).

O agente etiológico da EN, *C. perfringens*, é uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos e anaeróbica. Uma característica marcante dessa bactéria é a baixa presença de genes relacionados à biossíntese de aminoácidos em seu genoma, o que limita sua capacidade de se desenvolver em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes (SHIMIZU et al., 2002; MYERS et al., 2006; TO et al., 2017).

A fim de contornar sua limitação, *C. perfringens* possui fatores de virulência que contribuem para degradação dos tecidos do hospedeiro, permitindo-lhe obter nutrientes essenciais para a sua sobrevivência. Os isolados de *C. perfringens* apresentam variação na produção de toxinas, o que levou à criação do sistema de classificação toxinotipo, dividindo a bactéria em sete grupos, com base na sua capacidade de produzir toxinas (Tabela 4) (ROOD et al., 2018).

**Tabela 4.** Classificação toxinotipo de *Clostridium perfringens* com base nas toxinas secretadas.

| Toxinotipo | Alfa ( $\alpha$ ) | Beta ( $\beta$ ) | Épsilon ( $\epsilon$ ) | Iota ( $\iota$ ) | Enterotoxina | NetB |
|------------|-------------------|------------------|------------------------|------------------|--------------|------|
| A          | +                 | -                | -                      | -                | -            | -    |
| B          | +                 | +                | +                      | -                | -            | -    |
| C          | +                 | +                | -                      | -                | +/-          | -    |
| D          | +                 | -                | +                      | -                | +/-          | -    |
| E          | +                 | -                | -                      | +                | +/-          | -    |
| F          | +                 | -                | -                      | -                | +            | -    |
| G          | +                 | -                | -                      | -                | -            | +    |

+: presença da toxina; -: ausência da toxina.

**Fonte:** Adaptado de Rood et al., 2018.

Além desses seis genes utilizados para tipagem de toxinas, *C. perfringens* produz mais de 16 toxinas e enzimas, incluindo sialidases (NanI, NanJ e NanK), hialuronidases (NagH, NagI, NagJ e NagK), proteína de adesão ao colágeno, toxina beta2 e toxina tpeL. Essas toxinas podem ser agrupadas em quatro categorias dependendo da sua atividade: 1. Enzimas que danificam a membrana; 2. Toxinas formadoras de poros; 3. Toxinas intracelulares e 4. Enzimas hidrolíticas (Tabela 5) (LACEY et al., 2019; LEE; LILLEHOJ, 2021).

**Tabela 5.** Propriedades e classificação das toxinas do o *Clostridium perfringens*.

| Grupo                            | Nome                                                       | Gene                 | Atividade                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Enzimas que danificam a membrana | Toxina $\alpha$                                            | cpa, plc             | Hidrolisar os fosfolipídios da membrana celular.                                                                                                                                         |
| Toxinas formadoras de poros      | Perfringolisina O                                          | pfoA                 | Formação de poros por meio da ligação à membrana celular contendo colesterol.                                                                                                            |
|                                  | Toxina semelhante à enterite necrótica do tipo B           | netB                 | Formar poros heptaméricos hidrofílicos com diâmetro central de aproximadamente 26 Å.                                                                                                     |
|                                  | Toxina beta2                                               | cpb2                 | Formação de poros levando à destruição celular.                                                                                                                                          |
| Toxinas intracelulares           | Toxina citotóxica grande de <i>Clostridium perfringens</i> | tpeL                 | Atividade de glucosiltransferase específica para Ras, inativando a via de sinalização Ras e levando à apoptose.                                                                          |
|                                  | Colagenase                                                 | colA                 | Degradar o colágeno, que é o principal componente dos tecidos conjuntivos das células do hospedeiro.                                                                                     |
|                                  | Sialidase                                                  | nanI<br>nanH<br>nanJ | Envolvido na remoção de ácidos siálicos de diversos glicoconjugados nas membranas celulares.                                                                                             |
| Enzimas hidrolíticas             | Hialuronidase                                              | nagH<br>nagI         | Degradar o hialuronano que reveste as células, permitindo o contato direto entre o patógeno e as células do hospedeiro, facilitando o aumento da permeabilidade dos tecidos conjuntivos. |
|                                  |                                                            | nagJ<br>nagK<br>nagL |                                                                                                                                                                                          |
|                                  | Proteína de adesão ao colágeno                             | cnaA                 | Ligação de <i>Clostridium perfringens</i> aos colágenos dos tipos IV, V e ao colágeno desnaturado.                                                                                       |

**Fonte:** Adaptado de Lee; Lillehoje, 2021.

As sialidases (NanH, NanI e NanJ) e as hialuronidases (NagH, NagI, NagJ, NagK e NagL), desempenham um papel crucial na degradação de substratos da superfície celular do hospedeiro, como polissacarídeos e proteínas estruturais. As sialidases degradam glicoconjugados contendo ácido siálico, liberando nutrientes essenciais para o

crescimento da bactéria, enquanto as hialuronidases degradam o ácido hialurônico, facilitando a disseminação do *C. perfringens* nos tecidos infectados e contribuindo para sua virulência e proliferação (LEE; LILLEHOJ, 2021).

Além disso, a presença de genes que codificam essas toxinas específicas, como a NetB, toxina  $\alpha$  e TpeL, é uma característica fundamental das cepas virulentas de *C. perfringens*, determinante para o desenvolvimento da EN (UZAL et al., 2014; ROOD et al., 2018). Compreender o modo de ação dessas toxinas envolvidas na patogênese é essencial, não apenas para entender a patogênese da infecção, mas também para desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e prevenção.

Dentre as toxinas produzidas pelo *C. perfringens*, a toxina  $\alpha$  está presente em todos os isolados e foi por muito tempo considerada a principal responsável pela EN. É uma enzima dependente de zinco, com atividade de fosfolipase C. A toxina  $\alpha$  possui três domínios principais: o domínio tipo C, responsável pelo sítio de ligação à membrana; o domínio N, responsável pelo sítio catalítico; e um domínio de alça central, que contém um sítio de ligação para o gangliosídeo (GM1a) (ODA et al., 2015; JEWELL et al., 2015).

A atividade da toxina  $\alpha$  é complexa e varia conforme os tipos de células devido a proporção de fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM) na membrana plasmática. Essa toxina hidrolisa PC e SM, gerando diacilglicerol (DAG) e ceramida (CER). Além disso, pode ativar indiretamente enzimas endógenas do hospedeiro que possuem propriedades semelhantes à fosfolipase e à esfingomielinase. Essa ativação ocorre por meio da interação com proteínas de ligação ao GTP do tipo Gi (Gi-GTP-BPs), resultando na ativação da fosfolipase endógena do hospedeiro (PI-PLC) e a esfingomielinase (SMase) (ODA et al., 2008; ODA et al., 2015; MEHDIZADEH GOHARI et al., 2021).

A atividade da fosfolipase resulta na formação de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3), sendo que este último mobiliza e aumenta os íons de cálcio intracitoplasmáticos ( $iCa^{2+}$ ). A ação da esfingomielinase leva à formação de ceramida (CER), esfingosina (SPH) e esfingosina-1-fosfato (S1P) estimulando a liberação de íons de cálcio do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Esse aumento dos níveis intracelulares de cálcio desencadeia a ativação da via intrínseca da apoptose celular (ODA et al., 2015).

Além de sua ação na ruptura de membranas, a toxina  $\alpha$  interage, por meio do domínio GM1a, com o receptor de tropomiosina quinase A (TrkA) presente nas membranas celulares. Essa interação desencadeia a fosforilação das quinases PDK1 e PKC $\theta$ , ativando as vias de sinalização MEK/ERK e NF- $\kappa$ B, que estão associadas à produção de espécies

reativas de oxigênio (EROS) e interleucina-8 (IL-8) (ODA et al., 2012; MONTURIOL-GROSS et al., 2014).

O aumento das EROS intensifica o estresse oxidativo celular, promovendo a morte celular. Além disso, a elevação das concentrações IL-8 intensificando a adesão de neutrófilo/heterófilos à fibronectina, retardando a sua migração para os locais de infecção (GOOSSENS et al., 2017; MONTI et al., 2017).

A NetB é um membro da família  $\alpha$ -hemolisina, pertencente ao grupo das toxinas formadoras de poros  $\beta$  ( $\beta$ -PFTs), e é produzida por cepas de *C. perfringens* do tipo G. Assim como outros membros dessa família, a NetB possui quatro domínios estruturais:  $\beta$ -sandwich, latch, rim e prestem domains (YAN et al., 2013). Embora as cepas do tipo G também secretem toxina  $\alpha$ , esta não é considerada um fator essencial para a patogênese da EN (KEYBURN et al., 2006; NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018).

Nas cepas de *C. perfringens* associadas à EN em frangos, a NetB desempenha um papel central na patogênese, apresentando 38% de identidade com a toxina  $\beta$  e 40% de identidade com a toxina  $\delta$  de *C. perfringens*. Além disso, compartilha similaridade estrutural com outras toxinas formadoras de poros como  $\alpha$ -hemolisina (MEHDIZADEH GOHARI et al., 2021).

Após ser secretada, toxina NetB liga-se à superfície celular e se oligomeriza formando um pré-poro heptamérico. Esse processo resulta na criação de uma estrutura de barril com folhas  $\beta$ , permitindo o influxo de íons como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , o que pode levar à lise osmótica das células (ROOD; KEYBURN; MOORE, 2016; NAVARRO; MCCLANE; UZAL, 2018). Embora seu papel na patogênese da EN seja reconhecido, a regulação genética da sua expressão e suas interações com os tecidos intestinais ainda não foram totalmente compreendidas. Além disso, o receptor celular responsável pela ligação da NetB ainda não foi identificado (PRESCOTT et al., 2016b; MOORE, 2024).

Foi sugerido que qualquer alteração na microbiota intestinal poderia favorecer a colonização de *C. perfringens* sendo suficiente para desencadear a EN. No entanto, a maioria das cepas de *C. perfringens* encontradas no intestino das aves são comensais e com baixo potencial patogênico. Para que a EN se desenvolva, é necessário que essas cepas adquiram fatores de virulência essenciais, como a toxina NetB. O gene NetB é transportado por plasmídeos conjugativos, permitindo sua transferência para as cepas comensais e convertendo-as em virulentas. Esse processo ocorre no intestino das aves (LACEY et al., 2017; MOORE, 2024).

Além da toxina NetB, outros fatores de virulência desempenham um papel importante na patogênese da EN. A proteína de adesão ao colágeno, codificado pelo gene *cnaA*, foi identificado em cepas virulentas de *C. perfringens* de frangos com EN, demonstrando afinidade por colágeno do tipo II, IV e V (WADE et al., 2015; LAN-XIN et al., 2024). Em um estudo conduzido por Wade et al. (2016), a deleção de *cnaA* resultou na redução significativa da capacidade de adesão da bactéria, comprometendo sua colonização na mucosa ileal e impedindo a indução de lesões características da EN *in vivo*.

Além disso, *C. perfringens* pode se ligar à fibronectina por meio de duas proteínas de ligação (FbpA e FbpB), facilitando a adesão e colonização do hospedeiro, um mecanismo semelhante ao de outras bactérias patogênicas (KATAYAMA et al., 2015; LAN-XIN et al., 2024). Estudos de deleção gênica também demonstraram que, além de NetB e CnaA, as metalopeptidases de zinco ZmpA e ZmpB influenciam significativamente a virulência de *C. perfringens* na EN (WADE et al., 2016; WADE et al., 2020).

O gene *tpeL* é encontrado em algumas cepas de *C. perfringens* associadas à EN. Embora tenha sido sugerido que essa toxina possa aumentar a virulência das cepas, essa relação ainda não foi definitivamente comprovada. A TpeL possui múltiplos domínios funcionais, incluindo uma região com atividade glicosiltransferase, um domínio transmembrana e uma atividade autocatalítica. Além disso, essa toxina facilita sua própria entrada na célula hospedeira inibindo a sinalização Ras intracelular e induz apoptose celular (GUTTENBERG et al., 2012; LEE; LILLEHOJ, 2021).

Em um estudo, Gu et al. (2019) identificaram que cinco de 19 isolados de *C. perfringens* *netB*-positivos provenientes de frangos com EN também apresentavam o gene *tpeL*, exibindo diferentes padrões de produção de TpeL *in vitro*.

De modo geral, o impacto da EN na avicultura é significativo, comprometendo a saúde intestinal das aves e reduzindo o seu desempenho produtivo. O *C. perfringens* produz diversas toxinas, que exercem papéis distintos na patogênese da EN. No entanto, a simples presença da bactéria no trato intestinal nem sempre resulta em infecção. Assim, a manifestação clínica quanto subclínica está frequentemente associada a fatores predisponentes que favorecem a proliferação da bactéria. Entre esses fatores, destacam-se a manipulação nutricional, especialmente dietas com alta concentração de proteína, coinfeção com parasitas, particularmente a coccidiose, e o estresse estão entre os mais

comumente associados ao desenvolvimento da EN (RODGERS et al., 2015; MOORE, 2016).

Os diferentes componentes dietéticos são associados a EN. Dietas com altas quantidades cereais, como trigo, cevada e aveia, possuem altos níveis de polissacarídeos não amiláceos (PNAs), como  $\beta$ -glucanos e arabinoxilanos, que são considerados fatores predisponentes para a EN. O aumento da viscosidade intestinal causada por esses PNAs prolonga o tempo de trânsito da digesta, reduz a digestibilidade dos nutrientes e estimula a maior produção de muco, criando condições favoráveis para a proliferação de *C. perfringens*. Além disso, a maior produção de muco contribui para o aumento da umidade da cama, o que pode favorecer a esporulação de coccídios, elevando o risco de desenvolvimento da EN (MOORE, 2016; ALIZADEH et al., 2021; KIM et al., 2022; MUNEEB et al., 2024).

A incidência da EN está diretamente relacionada ao nível de proteína bruta na dieta, uma vez que altos teores proteicos criam um ambiente propício para a proliferação de *C. perfringens*, aumentando a suscetibilidade das aves à doença. Fontes proteicas como farelo de soja, farinha de carne e ossos e farinha de peixe são utilizados na formulação de dietas, no entanto, a alta concentração de proteína reduz a digestibilidade na porção superior do trato gastrointestinal, permitindo que a proteína indigerível atue como substrato. Além disso, o metabolismo dessas dietas leva à maior produção de aminas e amônia, elevando o pH intestinal e favorecendo a multiplicação do *C. perfringens* (WU et al., 2014; ADHIKARI et al., 2020; SHAMSHIRGARAN; GOLCHIN, 2024).

As micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos, estão presentes nos alimentos e comprometem a qualidade das rações. Seu primeiro alvo para toxicidade é o trato gastrointestinal, onde promovem o vazamento de proteína plasmática para o epitélio intestinal. O desoxinivalenol e a fumonisina são dois tipos mais comuns de micotoxinas com impacto na função de barreira intestinal, aumentando a disponibilidade de proteínas no lúmen e, consequentemente favorecendo o crescimento do *C. perfringens* (ANTONISSEN et al., 2014; ANTONISSEN et al., 2015; GUERRE, 2020).

Além das micotoxinas, fatores como o estresse também podem contribuir para a gravidade das lesões associadas à EN. O estresse térmico, seja por calor ou frio, exerce um impacto significativo na saúde intestinal das aves, suprimindo a imunidade e tornando o ambiente intestinal mais suscetível a danos. Além disso, o aumento dos níveis de glicocorticoides no sangue, resultante do estresse térmico, potencializa os efeitos

imunossupressores, agravando ainda mais o quadro clínico da doença (LARA; ROSTAGNO, 2013; WASTI; SAH; MISHRA, 2020; AHMAD et al., 2022).

O estresse por frio tem sido associado a um aumento significativo de casos de EN, bem como uma maior contagem cecal de *C. perfringens* e à gravidade das lesões intestinais. Esse cenário está relacionado à redução da ventilação nos galpões, o que eleva os níveis de amônia e umidade na cama, favorecendo a proliferando coccídeos e, consequentemente, a ocorrência de EN (CHEN; JIANG; GENG, 2012; TSIOURIS et al., 2015a).

Por outro lado, o estresse térmico por calor é uma preocupação significativa na avicultura, pois compromete o desempenho, a imunidade e a integridade intestinal, além de alterar a microbiota, predispondo as aves a infecções por patógenos. Esse tipo de estresse também aumenta a incidência e a severidade das lesões associadas à EN. Além disso, o estresse térmico pode desencadear surtos da doença em aves saudáveis e agravar a doença em aves já infectadas, sugerindo um papel relevante na ocorrência de EN em condições de campo (TSIOURIS et al., 2018; VANDANA et al., 2021; SCHREIER et al., 2022).

Além das variações térmicas, a alta densidade é outro fator de estresse relevante, impactando diretamente o ambiente das granjas e a saúde intestinal das aves. Esse fator compromete a qualidade da cama devido ao acúmulo excessivo de umidade e nitrogênio, criando um ambiente propício para a proliferação de microrganismos e coccídios. Além disso, a competição entre as aves intensifica o estresse, tornando-as mais suscetíveis a infecções e facilitando a disseminação da EN (TSIOURIS et al., 2015b; NASR et al., 2021; SUGIHARTO, 2022).

Um dos fatores predisponentes comuns da EN é a coinfeção por coccidiose, uma doença entérica causada por protozoários do gênero *Eimeria spp.*, que afetam as células intestinais das aves. As espécies de *Eimeria* mais associadas à coccidiose em aves são *Eimeria praecox*, *Eimeria mitis*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix* e *Eimeria tenella*. A coccidiose compromete a produção avícola ao reduzir o desempenho das aves, aumentar a mortalidade e elevar os custos com controle e tratamento, impactando diretamente a rentabilidade do setor (CHAPMAN; RATHINAM, 2022).

A infecção por coccídios, especialmente *Eimeria maxima*, é um fator importante para promoção do *C. perfringens*, pois provoca rápida proliferação de esporozoítos na mucosa intestinal, resultando em danos epiteliais, como hemorragias, ruptura da

integridade intestinal, vazamento de proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal e produção excessiva de mucina. Essas alterações criam um ambiente propício para a colonização e proliferação da bactéria. Além disso, a resposta inflamatória do hospedeiro, marcada pelo aumento da produção de muco, fornece nutrientes essenciais para produção de toxinas bacterianas, exacerbando a gravidade da doença (COLLIER et al., 2008; ASSIS et al., 2010; ADHIKARI et al., 2020).

Embora a coccidiose e a EN estejam associadas e apresentem sintomas semelhantes, a coccidiose geralmente se desenvolve antes ou simultaneamente à fase inicial da EN (ABD EL-HACK et al., 2022). A forma subclínica da coccidiose é a mais comum e de difícil diagnosticar, manifestando-se por diarreia, redução no consumo de ração e piora no desempenho das aves. Já a forma clínica, se caracteriza pela presença de excretas com excesso de muco e exsudato viscoso avermelhado, laranja ou rosa, além do aumento na mortalidade (ADHIKARI et al., 2020; MORAES et al., 2019).

Apesar das semelhanças, a coccidiose causa lesões mais localizadas no epitélio intestinal, enquanto a EN provoca necrose e acúmulo de gases no trato gastrointestinal (SHINI et al., 2020; MESA-PINEDA et al., 2021). Diante do impacto econômico e produtivo dessas infecções, o uso de antibióticos como promotores de crescimento (AGPs) na dieta das aves foi amplamente adotado para prevenir a EN, levando ao surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos, além da presença desses fármacos em produtos avícolas destinado ao consumo humano (MEHDI et al., 2018).

Como consequência, muitos países implementaram restrições ou proibiram o uso, especialmente aqueles críticos para a saúde pública. No entanto, a retirada desses AGPs tem sido associada a um aumento na incidência da EN. Diante desse cenário, torna-se essencial a busca por alternativas seguras e eficazes para o controle dessa enfermidade, garantindo a saúde intestinal das aves sem comprometer a segurança alimentar e a sustentabilidade da produção (MUNEEB et al., 2025).

Nesse contexto, ingredientes funcionais como a farinha da mosca-soldado negra e o probiótico *Bacillus velezensis* têm se destacado por seus potenciais efeitos imunomoduladores e benéficos à saúde intestinal. No entanto, não há registros na literatura científica de estudos que avaliem a associação entre esses dois aditivos em condições de desafio sanitário, como a enterite necrótica. A investigação dessa associação representa, portanto, uma estratégia promissora e ainda pouco explorada no controle dessa enfermidade.

## CONSIDERAÇÃO FINAL

A farinha da larva da mosca-soldado negra destaca-se como um ingrediente funcional promissor na nutrição de frangos de corte, tanto por seu valor nutricional quanto pela presença de compostos bioativos com potencial imunomodulador. O uso de processos biotecnológicos, como a fermentação microbiana controlada, pode intensificar seus efeitos benéficos, sobretudo em cenários de desafio sanitário, como a enterite necrótica. De forma complementar, o probiótico *Bacillus velezensis* tem se mostrado eficaz na promoção da saúde intestinal e desempenho zootécnico. No entanto, observa-se uma lacuna significativa na literatura quanto à avaliação da associação entre esses dois aditivos funcionais, especialmente em condições de enterite necrótica. Diante disso, justifica-se a realização do presente estudo, que busca explorar o potencial dessa combinação inovadora como alternativa ao uso de antibióticos promotores de crescimento, contribuindo com evidências científicas para o desenvolvimento de estratégias nutricionais mais sustentáveis e eficazes na avicultura.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E. et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives—a comprehensive review. **Poultry science**, v. 101, n. 2, p. 101590, 2022.
- ADHIKARI, P. et al. An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. **Journal of applied poultry research**, v. 29, n. 2, p. 515-534, 2020.
- AHMAD, R. et al. Influence of heat stress on poultry growth performance, intestinal inflammation, and immune function and potential mitigation by probiotics. **Animals**, v. 12, n. 17, p. 2297, 2022.
- ALIAKBARPOUR, H. R. et al. The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 25, n. 9, p. 1285, 2012.
- ALIZADEH, M. et al. Necrotic enteritis in chickens: A review of pathogenesis, immune responses and prevention, focusing on probiotics and vaccination. **Animal Health Research Reviews**, v. 22, n. 2, p. 147-162, 2021.
- ANTONISSEN, G. et al. Fumonisin affect the intestinal microbial homeostasis in broiler chickens, predisposing to necrotic enteritis. **Veterinary Research**, v. 46, p. 1-11, 2015.
- ANTONISSEN, G. et al. The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108775, 2014.
- ASSIS, R. C. L. et al. Histomorphometry and macroscopic intestinal lesions in broilers infected with *Eimeria acervulina*. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 185-189, 2010.
- BADERUDDIN, S. H. et al. Influence of different levels of black soldier fly larvae meal on growth performance and carcass quality of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 290, p. 105588, 2024.
- BEAN-HODGINS, L.; KIARIE, E. G. Mandated restrictions on the use of medically important antibiotics in broiler chicken production in canada: implications, emerging challenges, and opportunities for bolstering gastrointestinal function and health—a review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 101, n. 4, p. 602-629, 2021.
- BELHADJ SLIMEN, I. et al. Insects as an alternative protein source for poultry nutrition: a review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1200031, 2023.
- BESSIN, Y. et al. Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes**, v. 1667, n. 2, p. 148-156, 2004.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Antihypertensive peptides of animal origin: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 3, p. 566-578, 2017.

BIASATO, I. et al. Black soldier fly and gut health in broiler chickens: insights into the relationship between cecal microbiota and intestinal mucin composition. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, p. 1-12, 2020.

BOMAN, H. G. et al. Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. **Infection and immunity**, v. 10, n. 1, p. 136-145, 1974.

BUENO, I. et al. Efficacy of antibiotic and non-antibiotic interventions in preventing and treating necrotic enteritis in broiler chickens: A systematic review. *Avian diseases*, v. 67, n. 1, p. 20-32, 2023.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 169-184, 2004.

BUONOCORE, F. et al. Attacins: A promising class of insect antimicrobial peptides. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 212, 2021.

CALIGIANI, A. et al. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. **Food research international**, v. 105, p. 812-820, 2018.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185-198, 2015b.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and biomass valorization**, v. 6, p. 1085-1093, 2015a.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Simultaneous hydrolysis of proteins from different sources to enhance their antibacterial properties through the synergistic action of bioactive peptides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 209-212, 2016.

ČEŘOVSKÝ, V.; BÉM, R. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 3, p. 251-264, 2014.

CHAPMAN, H. D.; RATHINAM, T. Focused review: the role of drug combinations for the control of coccidiosis in commercially reared chickens. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 18, p. 32-42, 2022.

CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S. H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. **Experimental & molecular medicine**, v. 50, n. 8, p. 1-9, 2018.

CHEN, X.; JIANG, R.; GENG, Z. Cold stress in broiler: global gene expression analyses suggest a major role of CYP genes in cold responses. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 425-429, 2012.

CHIRKOV, S. N. The antiviral activity of chitosan. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, p. 1-8, 2002.

CHU, X. et al. Evaluation of the low inclusion of full-fatted *Hermetia illucens* larvae meal for layer chickens: Growth performance, nutrient digestibility, and gut health. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 585843, 2020.

CIURESCU, G. et al. Effect of *Bacillus subtilis* on growth performance, bone mineralization, and bacterial population of broilers fed with different protein sources. **Poultry science**, v. 99, n. 11, p. 5960-5971, 2020.

COLLIER, C. T. et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 122, n. 1-2, p. 104-115, 2008.

CORNET, B. et al. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. **Structure**, v. 3, n. 5, p. 435-448, 1995.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.

CRUZ, L. N.; OLIVEIRA, L. R.; CASTRO, R. J. S. Submerged fermentation using *Aspergillus tubingensis* as an efficient strategy to obtain antioxidant extracts from black cricket proteins. **Food and Humanity**, v. 1, p. 1018-1026, 2023.

CRUZ-CASAS, D. E. et al. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 3, p. 100047, 2021.

CUI, Y. et al. Assessment of probiotic *Bacillus velezensis* supplementation to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. **Poultry Science**, v. 103, n. 8, p. 103897, 2024.

CULLERE, M. et al. Meat quality and sensory traits of finisher broiler chickens fed with black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae fat as alternative fat source. **Animals**, v. 9, n. 4, p. 140, 2019.

CYTRYŃSKA, M. et al. Proline-rich antimicrobial peptides in medicinal maggots of *Lucilia sericata* interact with bacterial DnaK but do not inhibit protein synthesis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 532, 2020.

DABBOU, S. et al. Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on growth performance, blood traits, gut morphology and histological features. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

- DOBSON, A. et al. Bacteriocin production: a probiotic trait?. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2012.
- DÖRPER, A.; VELDKAMP, T.; DICKE, M. Use of black soldier fly and house fly in feed to promote sustainable poultry production. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 7, n. 5, p. 761-780, 2021.
- DUCLOHIER, H. How do channel-and pore-forming helical peptides interact with lipid membranes and how does this account for their antimicrobial activity? **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 2, n. 4, p. 331-342, 2002.
- DUPONT, D. Peptidomic as a tool for assessing protein digestion. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 53-58, 2017.
- DURAK, M. Z.; NESLIHAN, A. T. Antihypertensive peptides in dairy products. **Am. J. Biomed. Sci. Res**, v. 7, p. 191-195, 2020.
- ELBAZ, A. M. et al. Effect of oregano essential oils and probiotics supplementation on growth performance, immunity, antioxidant status, intestinal microbiota, and gene expression in broilers experimentally infected with *Eimeria*. **Livestock Science**, v. 291, p. 105622, 2025.
- ELHAG, O. et al. Screening, expression, purification and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L.). **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169582, 2017.
- ELNESR, S. S. et al. Impact of chitosan on productive and physiological performance and gut health of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 78, n. 2, p. 483-498, 2022.
- EMAMI, N. K. et al. Managing broilers gut health with antibiotic-free diets during subclinical necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 100, n. 5, p. 101055, 2021.
- EMAMI, N. K.; DALLOUL, R. A. Centennial Review: Recent developments in host-pathogen interactions during necrotic enteritis in poultry. **Poultry science**, v. 100, n. 9, p. 101330, 2021.
- FACEY, H. et al. Complete replacement of soybean meal with black soldier fly larvae meal in feeding program for broiler chickens from placement through to 49 days of age reduced growth performance and altered organs morphology. **Poultry Science**, v. 102, n. 1, p. 102293, 2023.
- FAHMY, L. et al. A novel family of defensin-like peptides from *Hermetia illucens* with antibacterial properties. **BMC microbiology**, v. 24, n. 1, p. 167, 2024.
- FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002.

FATHIMA, S. et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: a review on the pathogen, pathogenesis, and prevention. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1958, 2022.

FATHOLAH, A. et al. Nano-Bio zinc synthesized by *Bacillus subtilis* modulates broiler performance, intestinal morphology and expression of tight junction's proteins. **Livestock Science**, v. 251, p. 104660, 2021.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Gastrointestinal digestion of food proteins under the effects of released bioactive peptides on digestive health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 64, n. 21, p. 2000401, 2020.

FICKO-BLEAN, E. et al. Carbohydrate recognition by an architecturally complex  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33524, 2012.

FIRMANSYAH, M.; ABDUH, M. Y. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. **Heliyon**, v. 5, n. 6, 2019.

FOWLES, T. M.; NANSEN, C. Insect-based bioconversion: value from food waste. In: NÄRVÄNEN, E.; MESIRANTA, N.; MATTILA, M.; HEIKKINEN, A. (Ed.). **Food waste management: solving the wicked problem**, Palgrave Macmillan: Cham, 2020. p. 321-346, 2020.

FRUCI, M. et al. Effects of partial or complete replacement of soybean meal with commercial black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal on growth performance, cecal short chain fatty acids, and excreta metabolome of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 102, n. 4, p. 102463, 2023.

FUJITA, M. et al. Glycoside hydrolase family 89  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens* specifically acts on GlcNAc $\alpha$ 1, 4Gal $\beta$ 1R at the non-reducing terminus of O-glycans in gastric mucin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6479-6489, 2011.

GARZÓN, A. G. et al. Purification, identification and in silico studies of antioxidant, antidiabetogenic and antibacterial peptides obtained from sorghum spent grain hydrolysate. **Lwt**, v. 153, p. 112414, 2022.

GHIMIRE, S. et al. Efficacy of *Bacillus subtilis* probiotic in preventing necrotic enteritis in broilers: a systematic review and meta-analysis. **Avian Pathology**, v. 53, n. 6, p. 451-466, 2024.

GOOSSENS, E. et al. Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. **Veterinary research**, v. 48, p. 1-17, 2017.

GU, C. et al. Characterization of virulent netB+/tpeL+ *Clostridium perfringens* strains from necrotic enteritis-affected broiler chicken farms. **Avian Diseases**, v. 63, n. 3, p. 461-467, 2019.

GUERRE, P. Mycotoxin and gut microbiota interactions. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 769, 2020.

GUINÉ, R. P. F et al. The role of edible insects to mitigate challenges for sustainability. **Open Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 24-36, 2021.

GUTTENBERG, G. et al. Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 24929-24940, 2012.

HALDER, N. et al. Probiotics in poultry: a comprehensive review. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 85, n. 1, p. 23, 2024.

HEITA, D. et al. Effects of dietary inclusion of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal on growth performance and carcass yield of broilers. **International Science and Technology Journal of Namibia**, v. 16, p. 1-10, 2023.

HERNANDEZ-PATLAN, D. et al. The use of probiotics in poultry production for the control of bacterial infections and aflatoxins. In: **Prebiotics and Probiotics-Potential Benefits in Nutrition and Health**. IntechOpen, 2019.

HOFACRE, C. L.; SMITH, J. A.; MATHIS, G. F. An optimist's view on limiting necrotic enteritis and maintaining broiler gut health and performance in today's marketing, food safety, and regulatory climate. **Poultry science**, v. 97, n. 6, p. 1929-1933, 2018.

HOLMES, L. A.; VANLAERHOVEN, S. L.; TOMBERLIN, J. K. Relative humidity effects on the life history of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). **Environmental entomology**, v. 41, n. 4, p. 971-978, 2012.

HOSSAIN, M. E. et al. Growth performance, meat yield, oxidative stability, and fatty acid composition of meat from broilers fed diets supplemented with a medicinal plant and probiotics. **Asian Australas J Anim Sci.**, v. 25, n. 8, p. 1159, 2012.

HUANG, J. et al. Effects of drinking water supplemented with essential oils and organic acids mixtures on growth performance and intestinal health of broilers challenged with necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 104, n. 2, p. 104712, 2025.

HULTMARK, D. et al. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **European journal of biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 7-16, 1980.

IÑAKI, G. B. J. et al. Black soldier fly: Prospection of the inclusion of insect-based ingredients in extruded foods. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100075, 2022.

JADHAV, K. et al. Probiotics in broiler poultry feeds: A review. **J. Anim. Nutr. Physiol.**, v. 1, p. 4-16, 2015.

JEWELL, S.A. et al. *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin interaction with red cells and model membranes. **Soft matter**, v. 11, n. 39, p. 7748-7761, 2015.

JOZEFIAK, A; ENGBERG, R. M. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 26, n. 2, p. 87-99, 2017.

KATAYAMA, S. et al. Determination of the *Clostridium perfringens*-binding site on fibronectin. **Anaerobe**, v. 34, p. 174-181, 2015.

KEERQIN, C. et al. Probiotic *Bacillus subtilis* 29,784 improved weight gain and enhanced gut health status of broilers under necrotic enteritis condition. **Poultry Science**, v. 100, n. 4, p. 100981, 2021.

KEHINDE, B. A.; SHARMA, P. Recently isolated antidiabetic hydrolysates and peptides from multiple food sources: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 2, p. 322-340, 2020.

KEYBURN, A. L. et al. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. **Infection and immunity**, v. 74, n. 11, p. 6496-6500, 2006.

KHALID, A. et al. Effect of spore-forming probiotics on the poultry production: a review. **Food Science of Animal Resources**, v. 42, n. 6, p. 968, 2022.

KHAN, S. et al. Effect of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal and oil on the performance, biochemical profile, intestinal health and gut microbial dynamics in laying hens. **Poultry Science**, v. 103, n. 12, p. 104460, 2024.

KIM, E. et al. Ileal profile of non-starch polysaccharides and oligosaccharides in response to exogenous enzymes in broiler chickens offered wheat-or maize-based diets under subclinical necrotic enteritis challenge. **Animal Nutrition**, v. 10, p. 207-215, 2022.

KULKARNI, R. R. et al. Probiotics as alternatives to antibiotics for the prevention and control of necrotic enteritis in chickens. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 692, 2022.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, p. 4, 2018.

LACEY, J. A. et al. Conjugation-mediated horizontal gene transfer of *Clostridium perfringens* plasmids in the chicken gastrointestinal tract results in the formation of new virulent strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 24, p. e01814-17, 2017.

LACEY, J. A. et al. In silico identification of novel toxin homologs and associated mobile genetic elements in *Clostridium perfringens*. **Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 16, 2019.

LAN-XIN, O. U. et al. Mechanisms of intestinal epithelial cell damage by *Clostridium perfringens*. **Anaerobe**, p. 102856, 2024.

- LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 356-369, 2013.
- LAROUCHE, J. et al. Effects of killing methods on lipid oxidation, colour and microbial load of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Animals**, v. 9, n. 4, p. 182, 2019.
- LEE, J. et al. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae enhances immune activities and increases survivability of broiler chicks against experimental infection of *Salmonella Gallinarum*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 5, p. 736-740, 2018.
- LEE, K. S.; YUN, E. Y.; GOO, T. W. Antimicrobial activity of an extract of *Hermetia illucens* larvae immunized with *Lactobacillus casei* against *Salmonella* species. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 704, 2020.
- LEE, K. W.; LILLEHOJ, H.S. Role of *Clostridium perfringens* necrotic enteritis B-like toxin in disease pathogenesis. **Vaccines**, v. 10, n. 1, p. 61, 2021.
- LENI, G.; CALIGIANI, A.; SFORZA, S. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: A metabolomics and proteomic insight. **Food Research International**, v. 115, p. 116-125, 2019.
- LI, C. et al. Screening and characterization of *Bacillus velezensis* LB-Y-1 toward selection as a potential probiotic for poultry with multi-enzyme production property. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1143265, 2023.
- LI, Z. et al. Antibacterial and immunomodulatory activities of insect defensins-DLP2 and DLP4 against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12124, 2017.
- LIAO, S. F.; NYACHOTI, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. **Animal nutrition**, v. 3, n. 4, p. 331-343, 2017.
- LIAQAT, F.; ELTEM, R. Chitoooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. **Carbohydrate polymers**, v. 184, p. 243-259, 2018.
- LIU, H. et al. Untargeted metabolomics and PacBio analysis on bioactive components and microbial community in co-fermentation of black soldier fly larva. **Food Research International**, v. 197, p. 115304, 2024a.
- LIU, P. P. X. S. et al. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K88. **Journal of animal science**, v. 88, n. 12, p. 3871-3879, 2010.
- LIU, Y. et al. Dietary *Bacillus velezensis* KNF-209 supplementation improves growth performance, enhances immunity, and promotes gut health in broilers. **Poultry Science**, v. 103, n. 9, p. 103946, 2024b.

LOW, K. E. et al. The glycoconjugate-degrading enzymes of *Clostridium perfringens*: Tailored catalysts for breaching the intestinal mucus barrier. **Glycobiology**, v. 31, n. 6, p. 681-690, 2021.

LU, M. et al. Effects of *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* infections on cecal microbial composition and the possible correlation with body weight gain in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 142-149, 2020.

LU, S. et al. Nutritional composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) and its potential uses as alternative protein sources in animal diets: A review. **Insects**, v. 13, n. 9, p. 831, 2022.

MAKKAR, H. P. S et al. State-of-the-art on use of insects as animal feed. **Animal feed science and technology**, v. 197, p. 1-33, 2014.

MANFREDINI, P. G. et al. Bioactive peptides and proteases: characteristics, applications and the simultaneous production in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 39, n. 5, p. 360-377, 2021.

MANZOOR, M.; SINGH, J.; GANI, A. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: In vitro, in silico and in vivo studies. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131395, 2022.

MARTENS, E. C.; NEUMANN, M.; DESAI, M. S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 457-470, 2018.

MAT, K. et al. Effects of the inclusion of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal on growth performance and blood plasma constituents in broiler chicken (*Gallus gallus domesticus*) production. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 809-815, 2022.

MATOS, F. M.; CASTRO, R. J. S. Edible insects as potential sources of proteins for obtaining bioactive peptides. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. e2020044, 2021.

MATOS, F. M.; NOVELLI, P. K.; CASTRO, R. J. S. Enzymatic hydrolysis of black cricket (*Gryllus assimilis*) proteins positively affects their antioxidant properties. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 2, p. 571-578, 2021.

MATOS, F. M.; RASERA, G. B.; CASTRO, R. J. S. Insects as a sustainable source of emerging proteins and their processing to obtain bioactive compounds: an updated review. **Sustainable Food Technology**, v. 2, n. 1, p. 19-31, 2024.

MEHDI, Y. et al. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. **Animal nutrition**, v. 4, n. 2, p. 170-178, 2018.

MEHDIZADEH GOHARI, I. et al. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 723-753, 2021.

MESA-PINEDA, C. et al. Chicken coccidiosis: from the parasite lifecycle to control of the disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 787653, 2021.

METICULOUS RESEARCH®. **Black soldier fly market – Global opportunity analysis and industry forecast (2019-2030)**. Disponível em: <https://www.meticulousresearch.com/product/black-soldier-fly-market-5074>

MONTEAGUDO-MERA, A. et al. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 6463-6472, 2019.

MONTI, M. et al. Integrin-dependent cell adhesion to neutrophil extracellular traps through engagement of fibronectin in neutrophil-like cells. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171362, 2017.

MONTURIOL-GROSS, L. et al. *Clostridium perfringens* phospholipase C induced ROS production and cytotoxicity require PKC, MEK1 and NFκB activation. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86475, 2014.

MOORE, R. J. Necrotic enteritis and antibiotic-free production of broiler chickens: Challenges in testing and using alternative products. **Animal Nutrition**, v. 16, p. 288-298, 2024.

MOORE, R. J. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 275-281, 2016.

MORA, Z. V. et al. *Clostridium perfringens* as foodborne pathogen in broiler production: pathophysiology and potential strategies for controlling necrotic enteritis. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1718, 2020.

MORAES, P. O. et al. Effect of functional oils on the immune response of broilers challenged with *Eimeria* spp. **animal**, v. 13, n. 10, p. 2190-2198, 2019.

MORETTA, A. et al. A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: *Stratiomyidae*). **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 16875, 2020.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. **World's poultry science journal**, v. 73, n. 2, p. 245-256, 2017.

MÜLLER, A.; WOLF, D.; GUTZEIT, H. O. The black soldier fly, *Hermetia illucens*—a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 72, n. 9-10, p. 351-363, 2017.

MUNEEB, M. et al. An updated review on alternative strategies to antibiotics against necrotic enteritis in commercial broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, p. 1-50, 2024.

MUNEEB, M. et al. Comparative Effects of Antibiotic and Antimicrobial Peptide on Growth Performance, Gut Morphology, Intestinal Lesion Score, Ileal Microbial Counts,

and Immune Status in Broilers Challenged with Necrotic Enteritis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-15, 2025.

MURAWSKA, D. et al. Partial and total replacement of soybean meal with full-fat black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal in broiler chicken diets: impact on growth performance, carcass quality and meat quality. **Animals**, v. 11, n. 9, p. 2715, 2021.

MYERS, G. S. A. et al. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. **Genome research**, v. 16, n. 8, p. 1031-1040, 2006.

NAIR, M. S.; AMALARADJOU, M. A.; VENKITANARAYANAN, K. Antivirulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis. **Advances in applied microbiology**, v. 98, p. 1-29, 2017.

NASR, M. A. F et al. Potential impact of stocking density on growth, carcass traits, indicators of biochemical and oxidative stress and meat quality of different broiler breeds. **Poultry science**, v. 100, n. 11, p. 101442, 2021.

NAVARRO, M. A.; MCCLANE, B. A.; UZAL, F. A. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 212, 2018.

NDOTONO, E. W. et al. Insights into the gut microbial communities of broiler chicken fed black soldier fly larvae-desmodium-based meal as a dietary protein source. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1351, 2022.

NICOLAS, P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. **The FEBS journal**, v. 276, n. 22, p. 6483-6496, 2009.

NINGSIH, N. et al. Efficacy of *Bacillus subtilis* to replace in-feed antibiotics of broiler chickens under necrotic enteritis-challenged experiments: a systematic review and meta-analysis. **Poultry Science**, v. 102, n. 10, p. 102923, 2023.

NUENGJAMNONG, C.; ANGKANAPORN, K. Efficacy of dietary chitosan on growth performance, haematological parameters and gut function in broilers. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 2, p. 428-435, 2018.

OCDE/FAO, OCDE-FAO Agricultural. Outlook 2023–2032. Paris: OECD Publishing; 2023. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.oecd-ilibrary.org/deliver/08801ab7-en.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F08801ab7-en&mimeType=pdf>

ODA, M. et al. *Clostridium perfringens* alpha-toxin recognizes the GM1a-TrkA complex. **Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 39, p. 33070-33079, 2012.

ODA, M. et al. Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5268-5275, 2015.

ODA, M. et al. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxins. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 5, p. 1039-1047, 2008.

OHTANI, K.; SHIMIZU, T. Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. **Research in microbiology**, v. 166, n. 4, p. 280-289, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, E. N. et al. Growth of phytopathogenic fungi in the presence of partially acetylated chitoooligosaccharides. **Mycopathologia**, v. 166, p. 163-174, 2008.

OLIVEIRA, C. C.; SOUZA, A. K. S.; CASTRO, R. J. S. Bioconversion of chicken feather meal by *Aspergillus niger*: simultaneous enzymes production using a cost-effective feedstock under solid state fermentation. **Indian journal of microbiology**, v. 59, p. 209-216, 2019.

ONSONGO, V. O. et al. Insects for income generation through animal feed: effect of dietary replacement of soybean and fish meal with black soldier fly meal on broiler growth and economic performance. **Journal of economic entomology**, v. 111, n. 4, p. 1966-1973, 2018.

PARK, C. J.; SUN, S. S. Effect of dietary metallo-protease and *Bacillus velezensis* CE 100 supplementations on growth performance, footpad dermatitis and manure odor in broiler chickens. **Animal bioscience**, v. 35, n. 10, p. 1628, 2022.

PARK, K. H. et al. Seasonal pupation, adult emergence and mating of black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) in artificial rearing system. **International Journal of Industrial Entomology**, v. 21, n. 2, p. 189-191, 2010.

PARK, M.; RAFII, F. Effects of Bile Acids and Nisin on the Production of Enterotoxin by *Clostridium perfringens* in a Nutrient-Rich Medium. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, n. 1, p. 7276523, 2018.

PARK, S. I.; YOE, S. M. A novel cecropin-like peptide from black soldier fly, *Hermetia illucens*: Isolation, structural and functional characterization. **Entomological Research**, v. 47, n. 2, p. 115-124, 2017b.

PARK, S. I.; KIM, J. W.; YOE, S. M. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 52, n. 1, p. 98-106, 2015.

PARK, S. I.; YOE, S. M. Defensin-like peptide3 from black soldier fly: Identification, characterization, and key amino acids for anti-Gram-negative bacteria. **Entomological research**, v. 47, n. 1, p. 41-47, 2017a.

PATTERSON, P. H. et al. The impact of dietary Black Soldier Fly larvae oil and meal on laying hen performance and egg quality. **Poultry science**, v. 100, n. 8, p. 101272, 2021.

PERINI, H. F. et al. Inhibitory effect of *Bacillus velezensis* 1273 strain cell-free supernatant against developing and preformed biofilms of *Staphylococcus aureus* and MRSA. **Microbial Pathogenesis**, v. 197, p. 107065, 2024.

PIMCHAN, T. et al. Antibacterial peptides from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae: mode of action and characterization. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 26469, 2024.

POPOVA, T. L.; PETKOV, E.; IGNATOVA, M. Effect of black soldier fly (*Hermetia illucens*) meals on the meat quality in broilers. **Agricultural and Food Science**, v. 29, n. 3, p. 177–188, 2020.

PRESCOTT, J. F. et al. Experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens: a review. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 317-322, 2016b.

PRESCOTT, J. F. et al. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 288-294, 2016a.

RIBEIRO, J. C.R. et al. Diets supplemented with probiotics improve the performance of broilers exposed to heat stress from 15 days of age. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 5, p. 1327-1341, 2023.

RIZWAN, D. et al. Bioactive peptides from fermented foods and their relevance in COVID-19 mitigation. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 53, 2023.

ROCHA, A.C. C.; ANDRADE, C. J.; OLIVEIRA, D. Perspective on integrated biorefinery for valorization of biomass from the edible insect *Tenebrio molitor*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 480-491, 2021.

RODGERS, N. J. et al. A multifactorial analysis of the extent to which *Eimeria* and fishmeal predispose broiler chickens to necrotic enteritis. **Avian Diseases**, v. 59, n. 1, p. 38-45, 2015.

RODRIGUES, R. A. et al. Association of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: minimizes the adverse effects of necrotic enteritis in the gastrointestinal tract and improves zootechnical performance in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 103, n. 3, p. 103394, 2024.

ROOD, J. I. et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. **Anaerobe**, v. 53, p. 5-10, 2018.

ROOD, J. I.; KEYBURN, A. L.; MOORE, R. J. NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 295-301, 2016.

ROSTAGNO, H. S. et al. Composição de alimentos e exigências nutricionais. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**, ed. 4, p 488, 2017.

SALAHUDDIN, M. D. et al. Flight toward Sustainability in Poultry Nutrition with Black Soldier Fly Larvae. **Animals**, v. 14, n. 3, p. 510, 2024.

SANDVANG, D. et al. Effects of feed supplementation with 3 different probiotic *Bacillus* strains and their combination on the performance of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Poultry Science**, v. 100, n. 4, p. 100982, 2021.

SAUCIER, L. et al. Comparison of black soldier fly larvae pre-treatments and drying techniques on the microbial load and physico-chemical characteristics. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 8, n. 1, p. 45-64, 2022.

SCALA, A. et al. Rearing substrate impacts growth and macronutrient composition of *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: *Stratiomyidae*) larvae produced at an industrial scale. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 19448, 2020.

SCHÄFER, L. et al. Effect of replacement of soybean oil by *Hermetia illucens* fat on performance, digestibility, cecal microbiome, liver transcriptome and liver and plasma lipidomes of broilers. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 20, 2023.

SCHIAVONE, A. et al. Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on carcass traits, breast meat quality and safety. **Animal**, v. 13, n. 10, p. 2397-2405, 2019.

SCHIAVONE, A. et al. Black soldier fly larva fat inclusion in finisher broiler chicken diet as an alternative fat source. **Animal**, v. 12, n. 10, p. 2032-2039, 2018.

SCHIAVONE, A. et al. Nutritional value of a partially defatted and a highly defatted black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) meal for broiler chickens: apparent nutrient digestibility, apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 8, p. 1-9, 2017.

SCHREIER, J. et al. Influence of heat stress on intestinal integrity and the caecal microbiota during *Enterococcus cecorum* infection in broilers. **Veterinary research**, v. 53, n. 1, p. 110, 2022.

SEDANO, L. et al. Research note: In vitro anticoccidial activity of protein and lipid extracts from the black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). **Poultry Science**, p. 105009, 2025.

SEYEDALMOOSAVI, M. M. et al. Growth efficiency, intestinal biology, and nutrient utilization and requirements of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae compared to monogastric livestock species: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 31, 2022.

SHAMSHIRGARAN, M.A.; GOLCHIN, M. A comprehensive review of experimental models and induction protocols for avian necrotic enteritis over the past 2 decades. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, p. 1429637, 2024.

SHIMIZU, T. et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 2, p. 996-1001, 2002.

SHIN, H. S.; PARK, S. I. Novel attacin from *Hermetia illucens*: cDNA cloning, characterization, and antibacterial properties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 279-285, 2019.

SHINI, S. et al. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* H57 ameliorates subclinical necrotic enteritis in broiler chicks by maintaining intestinal mucosal integrity and improving feed efficiency. **Poultry science**, v. 99, n. 9, p. 4278-4293, 2020.

SHUMO, M. et al. Influence of temperature on selected life-history traits of black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared on two common urban organic waste streams in Kenya. **Animals**, v. 9, n. 3, p. 79, 2019.

SILVA, B. C. R.; LEHNEN, C. R.; MARCATO, S. M. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) as a protein ingredient in poultry feed. **World's Poultry Science Journal**, p. 1-32, 2024.

SILVA, G. D. P.; HESSELBERG, S. A review of the use of black soldier fly larvae, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), to compost organic waste in tropical regions. **Neotropical entomology**, v. 49, n. 2, p. 151-162, 2020.

SINGH, A.; KUMARI, K. An inclusive approach for organic waste treatment and valorisation using Black Soldier Fly larvae: A review. **Journal of environmental management**, v. 251, p. 109569, 2019.

SONI, R. et al. Genome assisted probiotic characterization and application of *Bacillus velezensis* ZBG17 as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler chickens. **Genomics**, v. 113, n. 6, p. 4061-4074, 2021.

SOUSA, E. G. et al. The research on the identification, taxonomy, and comparative genomics analysis of nine *Bacillus velezensis* strains significantly contributes to microbiology, genetics, bioinformatics, and biotechnology. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1544934, 2025.

SOUZA, J. V. et al. Black soldier fly larvae in broiler diets improve broiler performance and modulate the immune system. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 695-706, 2021.

SPRANGHERS, T. et al. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2594-2600, 2017.

SUGIHARTO, S. Dietary strategies to alleviate high-stocking-density-induced stress in broiler chickens—a comprehensive review. **Archives Animal Breeding**, v. 65, n. 1, p. 21-36, 2022.

- SWIATKIEWICZ, S. et al. Chitosan and its oligosaccharide derivatives (chito-oligosaccharides) as feed supplements in poultry and swine nutrition. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 99, n. 1, p. 1-12, 2015.
- TADESSE, S. A.; EMIRE, S. A. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. **Heliyon**, v. 6, n. 8, 2020.
- TALAT, A. et al. Farm to table: colistin resistance hitchhiking through food. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 5, p. 167, 2023.
- TIMBERMONT, L. et al. Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. **Veterinary research**, v. 45, p. 1-10, 2014.
- TO, H. et al. Experimental induction of necrotic enteritis in chickens by a netB-positive Japanese isolate of *Clostridium perfringens*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 2, p. 350-358, 2017.
- TOMBERLIN, J. K.; ADLER, P. H.; MYERS, H. M. Development of the black soldier fly (*Diptera: Stratiomyidae*) in relation to temperature. **Environmental entomology**, v. 38, n. 3, p. 930-934, 2009.
- TOMBERLIN, J. K.; SHEPPARD, D. C.; JOYCE, J. A. Selected life-history traits of black soldier flies (*Diptera: Stratiomyidae*) reared on three artificial diets. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 3, p. 379-386, 2002.
- TRAKSELE, L. et al. Investigation of in vitro and in vivo digestibility of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae protein. **Journal of Functional Foods**, v. 79, p. 104402, 2021.
- TSIOURIS, V. et al. Heat stress as a predisposing factor for necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v. 47, n. 6, p. 616-624, 2018.
- TSIOURIS, V. et al. High stocking density as a predisposing factor for necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v. 44, n. 2, p. 59-66, 2015b.
- TSIOURIS, V. et al. The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v. 44, n. 6, p. 430-435, 2015a.
- ULUG, S. K.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Novel technologies for the production of bioactive peptides. **Trends in food science & technology**, v. 108, p. 27-39, 2021.
- UZAL, F. A. et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. **Future microbiology**, v. 9, n. 3, p. 361-377, 2014.
- VAN DIJK, M. et al. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. **Nature Food**, v. 2, n. 7, p. 494-501, 2021.

- VAN MOLL, L. et al. In vitro evaluation of antimicrobial peptides from the black soldier fly (*Hermetia illucens*) against a selection of human pathogens. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, p. e01664-21, 2022.
- VANDANA, G. D. et al. Heat stress and poultry production: impact and amelioration. **International Journal of Biometeorology**, v. 65, p. 163-179, 2021.
- VERCRUYSSSE, L. et al. ACE inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of insect protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 5207-5211, 2005.
- VERCRUYSSSE, L. et al. Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 38-43, 2009.
- VIECO-SAIZ, N. et al. Unraveling the benefits of *Bacillus subtilis* DSM 29784 poultry probiotic through its secreted metabolites: an in vitro approach. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 11, p. e00177-24, 2024.
- VILELA, J. S. et al. Black soldier fly larvae in broiler diets improve broiler performance and modulate the immune system. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 695-706, 2021.
- VILELA, J. S. et al. Inclusion of up to 20% Black Soldier Fly larvae meal in broiler chicken diet has a minor effect on caecal microbiota. **PeerJ**, v. 11, 2023.
- VOGEL, H. et al. Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 78, p. 141-148, 2018.
- WADE, B. et al. Binding of *Clostridium perfringens* to collagen correlates with the ability to cause necrotic enteritis in chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 3-4, p. 299-303, 2015.
- WADE, B. et al. The adherent abilities of *Clostridium perfringens* strains are critical for the pathogenesis of avian necrotic enteritis. **Veterinary microbiology**, v. 197, p. 53-61, 2016.
- WADE, B. et al. Two putative zinc metalloproteases contribute to the virulence of *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, p. 259-267, 2020.
- WANG, Y. S.; SHELOMI, M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 91, 2017.
- WASTI, S.; SAH, N.; MISHRA, B. Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. **Animals**, v. 10, n. 8, p. 1266, 2020.

- WU, S. B. et al. Two necrotic enteritis predisposing factors, dietary fishmeal and *Eimeria* infection, induce large changes in the caecal microbiota of broiler chickens. **Veterinary microbiology**, v. 169, n. 3-4, p. 188-197, 2014.
- XIA, J.; GE, C.; YAO, H. Antimicrobial peptides from black soldier fly (*Hermetia illucens*) as potential antimicrobial factors representing an alternative to antibiotics in livestock farming. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1937, 2021.
- YADAV, S., JHA, R. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. **J Animal Sci Biotechnol**, v.10, n.2, 2019.
- YAMAMOTO, T. et al. The perpendicular orientation of amphotericin B methyl ester in hydrated lipid bilayers supports the barrel-stave model. **Biochemistry**, v. 58, n. 17, p. 2282-2291, 2019.
- YAN, X. X. et al. Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from *Clostridium perfringens*. **MBio**, v. 4, n. 1, p. 10.1128/mbio. 00019-13, 2013.
- YE, M. et al. Effect of *Bacillus velezensis* to substitute in-feed antibiotics on the production, blood biochemistry and egg quality indices of laying hens. **BMC veterinary research**, v. 16, p. 1-8, 2020.
- YI, H. Y. et al. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 5807-5822, 2014.
- YOUSEFI, B. et al. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 6, p. 8008-8018, 2019.
- YU, Q. et al. The Agr-like quorum sensing system is required for pathogenesis of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in poultry. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 6, p. 10.1128/iai. 00975-16, 2017.
- YUAN, J.; AJUWON, K. M.; ADEOLA, O. Impact of partially defatted black soldier fly larvae meal on coccidia-infected chickens: effects on growth performance, intestinal health, and cecal short-chain fatty acid concentrations. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 30, 2025.
- ZHAN, S. et al. Genomic landscape and genetic manipulation of the black soldier fly *Hermetia illucens*, a natural waste recycler. **Cell research**, v. 30, n. 1, p. 50-60, 2020.
- ZHANG, Q. et al. Vaccination with formulations targeting *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* conferred comprehensive protection using a dual-infection challenge model of necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 104, n. 2, p. 104687, 2025.
- ZHITNITSKY, D.; ROSE, J.; LEWINSON, O. The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44554, 2017.

ZHU LA, A. L. T. et al. A New *Bacillus velezensis* strain CML532 improves chicken growth performance and reduces intestinal *Clostridium perfringens* colonization. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 771, 2024.

ZULKIFLI, N. F. N. M. et al. Nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae processed by different methods. **PloS one**, v. 17, n. 2, p. e0263924, 2022.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGO**

**CONVENTIONAL AND FERMENTED BLACK SOLDIER FLY LARVAE  
MEAL ASSOCIATED WITH *BACILLUS VELEZENSIS* BV01 AS  
FUNCTIONAL ADDITIVE FOR BROILERS UNDER SUBCLINICAL  
NECROTIC ENTERITIS CHALLENGE**

**ARTICLE FORMATTED ACCORDING TO THE GUIDELINES OF THE  
JOURNAL ANIMAL**

**<https://animal-journal.eu/animal-journal/instructions-and-policies/>**

**Conventional and Fermented Black Soldier Fly Larvae Meal Associated with  
*Bacillus velezensis* BV01 as Functional Additive for Broilers under  
Subclinical Necrotic Enteritis Challenge**

I. C. de B. Ayres <sup>a</sup>, J. P. F. Guimarães <sup>a</sup>, L. E. N. de Oliveira <sup>a</sup>, B. C. Aguiar <sup>a</sup>, M.  
M. B. Oshima <sup>a</sup>, M. E. de S. T. Campos <sup>b</sup>, B. B. Fonseca <sup>c</sup>, J. C. Silva <sup>d</sup>, V. A. de  
C. Azevedo <sup>e</sup>, L. de P. Naves <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Animal Science, Federal University of Lavras, Lavras, Minas  
Gerais, Brazil*

<sup>b</sup> *Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras,  
Minas Gerais, Brazil*

<sup>c</sup> *School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Uberlândia,  
Minas Gerais, Brazil*

<sup>d</sup> *Institute of Agricultural Sciences, Federal University de Minas Gerais, Montes  
Claros Minas Gerais, Brazil*

<sup>e</sup> *Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo  
Horizonte, Brazil*

Corresponding author: Luciana Naves. Email: [luciananaves@ufla.br](mailto:luciananaves@ufla.br)

**Abstract**

The objective of this study was to evaluate the effects of the controlled  
fermentation process of black soldier fly larvae meal on its potential as a  
functional additive in association with *Bacillus velezensis* BV01, in diets provided  
to broilers under subclinical necrotic enteritis conditions. A total of 360 broilers

were distributed into three treatments, evaluated in ten replicates of 12 broilers each: T1- basal diet (BD) without added antibiotic and anticoccidial; T2- BD supplemented with conventional black soldier fly larvae meal associated with *B. velezensis* BV01; T3 - BD supplemented with pre-fermented black soldier fly larvae meal associated with *B. velezensis* BV01. Necrotic enteritis was induced via feed, with administration of *Eimeria maxima* at 14 days and *Clostridium perfringens* on days 18, 19, and 20 of age. Feed intake, weight gain, and feed conversion ratio were evaluated during the phases of 1 to 7, 1 to 14, 1 to 21, 1 to 35, and 1 to 42 days of age. At 14, 21, and 42 days, lesion score, macroscopic evaluation, histopathology, histomorphometry, and cytokines were assessed. Carcass and parts yield were evaluated at 42 days. The feed conversion ratio was significantly influenced by dietary treatments in the initial phases (1 to 7 and 1 to 14 days), with a worse feed efficiency observed in the control group during the sanitary challenge period (1 to 21 days). Differences were also identified in the concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-6 cytokines, indicating inflammatory response modulation in broilers fed diets supplemented with conventional or fermented black soldier fly larvae meal associated with *B. velezensis* BV01. The inclusion of conventional or fermented black soldier fly larvae meal, associated with *B. velezensis* BV01 modulated the immune response and favored the performance of broilers subjected to subclinical necrotic enteritis, indicating the potential of these combinations as functional additive under intestinal challenge conditions.

**Keywords:** *Hermetia illucens*, Probiotic, Fermentation, *Clostridium perfringens*, Poultry

## Implications

Black soldier fly larvae meal (BSFLM) is known for its high protein content and the presence of peptides with antimicrobial activity, which can contribute to the modulation of intestinal health. The application of a biotechnological treatment, such as controlled fermentation, aims to enhance the release of these bioactive compounds. When combined with *Bacillus velezensis* BV01, a probiotic with recognized antimicrobial action, this strategy shows potential to improve the productive performance of broilers. Given the challenge posed by necrotic enteritis and the increasing restrictions on antibiotic use in poultry farming, the investigation of sustainable functional additives becomes a promising approach to promote intestinal health and productive performance.

## Introduction

There is an estimated increase in global food demand of 35% to 56%. This has heightened concerns about food security and sustainability (Van Dijk et al., 2021). Currently, animal-derived products account for almost 70% of global food consumption, with growth projections due to the increasing demand for animal proteins. Broiler meat, which currently represents 59% of total global meat production, is expected to reach 62% by 2032 (Mottet and Tempio, 2017; OECD/FAO, 2023).

To meet the growing demand for animal-derived products, it will be necessary to increase grain production for feed formulation, which will result in significant environmental impacts (Belhadj Slimen et al., 2023; Lau et al., 2024). This scenario has driven the search for sustainable alternatives, such as the use of non-conventional ingredients in animal feed.

Concurrently, concern over the use of antibiotic growth promoters (AGPs) in poultry feeds is growing due to the emergence of resistant bacteria and the presence of residues in poultry products, which compromise human and animal health (Shah et al., 2023). In response, the European Union began restricting the use of AGPs in 2003, culminating in a total ban in 2006 (European Union, 2003). In Brazil, although there has been an increase in restrictions in recent years, the ban is not yet total, and some molecules remain authorized for use (MAPA, 2020).

In this context, the use of functional ingredients as an alternative auxiliary measure, such as black soldier fly larvae meal (BSFLM, *Hermetia illucens*), has gained attention. Besides its good nutritional composition, BSFLM presents antimicrobial and immunomodulatory compounds, such as chitin, lauric acid, and antimicrobial peptides (AMPs) (Slimen et al., 2023).

AMPs are the main molecules of the insect immune system, with a broad spectrum of action against bacteria, fungi, and viruses. *Hermetia illucens* presents the greatest diversity of AMPs among insects, which act rapidly and have a low risk of inducing resistance, as bacteria find it difficult to modify their membranes to prevent rupture (Moretta et al., 2020; Xia et al., 2021; Fahmy et al., 2024).

In this context, biotechnological strategies such as microbial fermentation have stood out for their ability to improve biological and functional properties. During this process, selected microorganisms produce proteolytic enzymes that hydrolyze proteins present in the substrate, releasing a variety of bioactive peptides. These compounds exhibit antimicrobial, immunomodulatory, and antioxidant activities, contributing to intestinal health and pathogen control (Castro and Sato, 2016; Oliveira et al., 2019).

In turn, the use of probiotics, such as *Bacillus velezensis*, has proven to be an effective strategy in pathogen control and promoting intestinal health. Studies demonstrate that *B. velezensis* contributes to improved productive performance, in addition to reducing intestinal inflammation and exhibiting inhibitory activity against pathogenic microorganisms, such as *Clostridium perfringens* (Soni et al., 2021; Park and Sun, 2022; Li et al., 2023; Cui et al., 2024; Zhu et al., 2024).

Although *B. velezensis* and BSFLM have the potential to be used as additives in broiler diets, studies evaluating their combined application under necrotic enteritis conditions a disease with global costs from control measures and production losses exceeding 6 billion dollars per year (Keerqin et al., 2021) are still scarce. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of the controlled fermentation process of BSFLM on its potential as a functional additive in association with *Bacillus velezensis* BV01, in diets provided to broilers under subclinical necrotic enteritis conditions.

## **Material and Methods**

### ***Experimental Design and Diets***

The experimental design was completely randomized, consisting of three dietary treatments evaluated in ten replicates (experimental units) of 12 broilers each, totaling 360 animals.

The T1 group diet consisted of a basal diet without added antimicrobials and antibiotic as a performance enhancer, formulated based on corn and soybean meal, considering the nutritional composition of the feedstuffs reported by Rostagno et al. (2017) and the nutritional requirements of the broilers

according to the strain manual (COBB, 2022) for the periods of 1 to 7, 8 to 21, 22 to 35, and 36 to 42 days of age (Table 1). The T2 group diet consisted of the basal diet supplemented with conventional black soldier fly larvae meal (cBSFLM), as commercially available, plus the inclusion of *Bacillus velezensis* BV01. For the T3 group, the cBSFLM was previously subjected to a controlled biotechnological fermentation process, resulting in fermented black soldier fly larvae meal (fBSFLM), which was added to the basal diet concomitantly with the addition of *B. velezensis* BV01. The meals (cBSFLM and fBSFLM) and probiotic (*Bacillus velezensis* BV01) were included in the T2 and T3 diets by replacing, weight for weight, the inert kaolin, fixed at 30 g/kg in the basal diet (T1). The kaolin substitutions corresponded to 25 g/kg for the cBSFLM and fBSFLM additives and 1 g/kg for *B. velezensis* BV01, corresponding to a supplementation of  $1 \times 10^9$  CFU/kg of feed. Diets and water were provided ad libitum to the broilers throughout the experimental period from 1 to 42 days of age.

### ***Black Soldier Fly Larvae Meals***

A 50 kg batch of cBSFLM (Lot FD 14 NOV 2022) was obtained from the company BSF Nutrição e Biotecnologia Ltda (CYNS®, Piracicaba, São Paulo, Brazil). Following optimized, standardized environmental, health, and nutritional protocols practiced by the company, black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) were reared until they reached approximately 14 days of age and an average weight of 150 mg. Subsequently, the larvae were slaughtered by boiling, dried in an oven at 85°C for 2 hours, and cold-pressed for partial fat removal, thus obtaining the cBSFLM.

After receiving the cBSFLM, 25 kg were sent to the Federal University of Minas Gerais (UFMG) where *in vitro* fermentation of the cBSFLM was performed to obtain the fBSFLM. Initially, the fungus *Aspergillus oryzae* was activated using potato dextrose agar, incubated in a bio-oxygen demand incubator at 30°C for 5 to 7 days. For fermentation, 62.5 g of cBSFLM and 37.5 ml of distilled water were used, sterilized at 121°C for 15 minutes. After the addition of 10 to 20 ml of sterile Tween 20 solution (0.3%), the spores were scraped, suspended, filtered, and quantified ( $10^7$  spores/g). The inoculum was adjusted to  $10^9$  spores/500ml of moist substrate and incubated at 30°C for 3 to 4 days. After fermentation, the meal was autoclaved, lyophilized, and included in the diet (Oliveira; Souza; Castro, 2019).

The proximate chemical composition and gross energy of cBSFLM and fBSFLM were determined in triplicate (Table 2). The contents of dry matter, ash, ether extract, crude fiber, neutral detergent fiber, and acid detergent fiber were determined using gravimetric principles, according to methodologies described by Detman et al. (2021). Crude protein was estimated from the total nitrogen content, multiplied by a correction factor of 6.25 (Detman et al., 2021). Non-protein nitrogen content was measured according to the Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2017). Gross energy was determined using a calorimetric bomb (model C200, IKA®, Staufen, Germany). Furthermore, the amino acid profile was determined according to White et al. (1986) and Hagen et al. (1989) (Table 3), and the fatty acid profile was carried out according to chromatographic methodologies described by AOAC (2005), Kerem et al. (2005), and pre-analytical steps from the Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2017) (Table 4).

## ***Bacillus velezensis* BV01: selection and production of the strain**

To assess the ability of *B. velezensis* BV01 (UNICLON) to inhibit *C. perfringens* growth, 5 µL of *B. velezensis* BV01 at a concentration of 8 log CFU/mL were individually inoculated at the center of Nutrient Agar plates in triplicate and incubated under aerobic conditions for 24 hours at 36.5°C. Afterward, the *B. velezensis* spot was inactivated using chloroform vapor for 30 minutes. Subsequently, 5 µL of *C. perfringens* was dispensed into 10 mL of liquid Triptona-Sulfito-Cicloserina (TSC) Agar (Laborclin) at 45°C, and the mixture was poured onto the *B. velezensis* spot. The plates were then incubated for 24 hours under anaerobic conditions. The antagonistic capacity of the probiotic bacteria was determined as follows: very strong inhibition (zones larger than 20 mm in diameter); strong inhibition (15–19 mm); moderate inhibition (11–14 mm); weak inhibition (9–10 mm); and no inhibition (less than 9 mm) (Dos Reis et al., 2022). The inhibition halo was the average diameter of the zones from three plates. It was observed that the mean of inhibition halo of *B. velezensis* BV01 was of 18.03 (+/-1.408) showing that this microorganism has a strong inhibition on *Clostridium perfringens* *in vitro*. This result led us to use this strain in the experiment.

Thus, the *Bacillus velezensis* BV01 was produced at the Laboratory of Infectious Diseases of the Federal University of Uberlândia. Initially, it was isolated from soil in the state of Bahia, Brazil. Species identification was performed by next-generation sequencing (NGS), using the Illumina platform, which identified the sample as *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB2. However, it was later reclassified as *Bacillus velezensis* BV01 (Sousa et al., 2025).

The strain was then sent to the Laboratory of Cellular and Molecular Genetics of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) for the production necessary to conduct the experiment. *B. velezensis* BV01 was cultured in BHI broth for 48 hours and, after growth, subjected to spray-drying with 5% skim milk.

### ***Broilers, Facilities, and Experimental Procedures***

Day-old male Cobb-500 chicks were acquired from a commercial hatchery and housed in a conventional semi-automated poultry house at the Poultry Section of the Department of Animal Science, University Federal of Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brazil. At housing, a total of 360 chicks were distributed into 30 pens (replicates; experimental units), with 12 broilers allocated per pen. Each diet (T1, T2, and T3) was evaluated in 10 replicates, totaling 120 broilers per treatment or experimental group. The initial average weight of the chicks was similar ( $45.4 \text{ g} \pm 0.021 \text{ g}$ ) across all experimental units.

The pens had dimensions of 2 x 1.5 m, with each pen equipped with an incandescent lamp for heating the chicks, a tube feeder, and a bell drinker. The pen floor was covered with wood shavings. The poultry house was equipped with fans and side curtains for ventilation and sunlight incidence control, as necessary.

The lighting program consisted of 24 hours of light from 1 to 14 days and 16 hours of light and 8 hours of dark from 15 to 42 days of age, according to the Cobb-500 strain manual (2022). The average temperature recorded inside the poultry house was  $27.7^{\circ}\text{C} \pm 5.7$  in the 1 to 7-day phase,  $23.6^{\circ}\text{C} \pm 4.37$  from 8 to 21 days,  $22.3^{\circ}\text{C} \pm 4.34$  from 22 to 35 days, and  $21.0^{\circ}\text{C} \pm 4.32$  from 36 to 42 days; the average relative humidity in the poultry house was  $63.5\% \pm 6.5\%$ .

### **Sanitary Challenge for Induction of Subclinical Necrotic Enteritis**

The necrotic enteritis induction model used in this study was based on Dierick et al. (2021), with adaptations. The in-feed induction method was chosen considering that gavage methods are time-consuming, which can interfere with results among experimental units, besides being a method that results in the mortality of some broilers due to the invasiveness intrinsic to the method itself. Therefore, from 1 to 13 days of age, broilers were reared according to the standard strain protocol, without sanitary challenge. On the 14th day of age, all broilers were challenged via feed with *Eimeria maxima* oocysts from Centro de Amparo à Pesquisa Veterinária Ltda (Amparo, São Paulo, Brazil). The inoculum in liquid medium was included in the feed at a rate of 20% (192 mL of inoculum + 768 g of feed, for each treatment), being manually mixed in plastic bags for three minutes and subsequently divided into ten bags with 96 g each.

After a 3-hour feed withdrawal period, the inoculated feeds were provided (one bag per experimental unit), considering a quantity of 8 g per bird, with the inoculated feed being completely consumed within one hour. It is estimated that each broiler consumed, on average, approximately  $1 \times 10^4$  *Eimeria maxima* oocysts.

On days 18, 19, and 20 of age, the broilers received feed inoculated with NetB-positive *Clostridium perfringens* from the Federal University of Minas Gerais. The protocol for mixing the *Clostridium* inoculum into the feeds was similar to that performed for *Eimeria*. In summary, 176 mL of liquid *C. perfringens* inoculum + 704 g of feed were used, subsequently manually mixed for three minutes and divided into ten bags with 88 g each. It is estimated that each broiler consumed  $1.6 \times 10^6$  CFU.

### ***Productive Performance, Carcass and Parts Yield, and Mortality***

The productive performance of the broilers was evaluated in the cumulative periods of 1 to 7, 1 to 14, 1 to 21, 1 to 35, and 1 to 42 days of age. Feed intake (FI) was calculated by the difference between the amount of feed offered and the leftovers in the referred periods. Weight gain (WG) was calculated by the difference between the final weight and the initial weight of the broilers. Feed conversion ratio (FCR) was determined by dividing FI by WG in the period. Mortality was recorded daily for the correction of FI, WG, and FCR data (methodology 5 described by Sakomura and Rostagno, 2016).

Furthermore, mortality records were organized according to the periods of 1 to 14 days (period before the sanitary challenge), from 15 to 20 days (period after the start of the sanitary challenge), on the 21st day (the seventh day after the start of the sanitary challenge is considered by Collier et al., 2008 as the peak day of the disease), and in the periods of 22 to 35 and 36 to 42 days (post-peak disease periods and established in accordance with the performance evaluation periods).

At 42 days of age, after an eight-hour feed withdrawal, two broilers from each experimental unit were selected according to the average weight of the pen  $\pm$  5%, slaughtered by cervical dislocation followed by bleeding, scalded, defeathered, and eviscerated. Carcass yield was calculated as the ratio between the clean carcass weight (without shanks, head, and feet) and the live weight. The yields of wings, thighs+drumsticks, and breast were calculated by correlating the weight of the cut with the carcass weight. Abdominal fat present in the region between the Bursa of Fabricius and the cloaca was collected, weighed, and

correlated with the eviscerated clean carcass weight as described by Gomide et al. (2014).

### ***Macroscopic Evaluation, Intestinal Lesion Score, and Histopathology of the Broilers***

Broilers were slaughtered at 14, 21, and 42 days of age. At 14 days (before the sanitary challenge), one broiler from each experimental unit was selected according to the average weight of the pen, totaling 10 broilers per treatment. At 21 days (peak of the disease) and at 42 days, two broilers from each experimental unit were selected, also based on the average weight of the pen, totaling 20 broilers per treatment at each considered age.

At the time of slaughter, a macroscopic examination was performed on each animal, evaluating body condition and macroscopic observations of internal organs. Subsequently, intestinal necropsy was performed, where jejunal fragments were collected and immersed in 10% formalin solution for preservation.

The jejunal fragments were sectioned, underwent histological processing, then were embedded in paraffin blocks, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis. In the evaluations of intestinal lesions, the following pathological processes were considered: necrosis, hemorrhage, lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate predominantly composed of heterophils, quantity of *Eimeria* sp. structures in the mucosa, and congestion. For the intensity of each pathological process, the following criteria were considered: 0- absent, 1- mild, 2- moderate, and 3- severe.

### ***Intestinal Histomorphometry***

After slaughter, jejunal fragments of approximately 6 cm were opened longitudinally, carefully washed, placed on Kraft paper where the ends of the fragment were fixed by stapling with the mucosa facing upwards, and transferred to a vial containing 10% formalin solution. They were kept in the vials for 72 hours until processing. Subsequently, the samples were dehydrated in graded alcohol series, cleared with xylene, and embedded in paraffin blocks. After this process, the blocks were sectioned, and transverse sections of 5  $\mu$ m were placed on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Histological images were observed under a light microscope with a 4x objective lens (Olympus CX31, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Olympus SC30) and coupled to an image acquisition system (AnalySIS getIT). The images were analyzed using ImageJ software (version 1.54d) with measurements calibrated using a stage micrometer. A total of 15 intact villi were measured for each analyzed image. The following parameters were measured: villus height, from the base to the apex of the villi; villus width, approximately in the middle of the villi; crypt depth, from the muscularis mucosae to the base of the villi; and crypt width, approximately in the middle of the crypt. The villus height to crypt depth ratio was calculated by dividing villus height by crypt depth.

### ***Cytokine Profile***

At 13, 21, and 42 days of age, blood was collected in tubes containing a clot activator. Subsequently, the samples were centrifuged at 1095 x g for 10 minutes (Excelsa baby II, 206-R, Fanem, São Paulo, Brazil). The serum was then pipetted and stored in microtubes.

Serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 were quantified using ELISA kits (Chicken TNF- $\alpha$ , ELK Biotechnology, Hubei, China; Chicken IL-6, ELK Biotechnology, Hubei, China; Chicken IL-10, ELK Biotechnology, Hubei, China), according to the manufacturer's recommendations.

### **Statistical Analysis**

The data were analyzed using SAS OnDemand for Academics software. The normality of the data was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Data with a normal distribution were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure; when significant, means were subjected to the SNK test at 5% probability. Data with a non-normal distribution were subjected to non-parametric analysis of variance using the NPAR1WAY procedure with the Kruskal-Wallis test, and treatment means were compared using the SNK test at 5% probability. Data regarding macroscopic evaluation, lesion score, histopathology, feed intake and feed conversion ratio (1 to 7 days), villus width (13 and 21 days), crypt depth (21 days), abdominal fat, as well as cytokine concentrations of IL-6 (42 days) and IL-10 (21 days), showed a non-normal distribution. All other data exhibited a normal distribution.

## **Results**

### ***Productive Performance, Carcass Yield, and Mortality***

Weight gain and feed conversion ratio did differ significantly ( $P > 0.05$ ) between treatments in the 1 to 7-day-old phases. Broilers supplemented with cBSFLM or fBSFLM, both associated with *B. velezensis* BV01, showed higher weight gain and better feed conversion ratio ( $P < 0.05$ ). In the period from 1 to 14

days of age, broilres fed diet supplemented with cBSFLM or fBSFLM, both associated with *B. velezensis* BV01, maintained a better feed conversion ratio ( $P < 0.05$ ), although feed intake and weight gain were not altered (Table 5).

In the 1 to 21-day phase, corresponding to the sanitary challenge period, a trend towards increased weight gain was observed in broilers fed diets supplemented with cBSFLM or fBSFLM associated with *B. velezensis* BV01, in addition to a better feed conversion ratio ( $P < 0.05$ ). This increase in weight gain represented an approximate increase of 5.08% (cBSFLM + *Bacillus velezensis* BV01) and 4.51% (fBSFLM + *Bacillus velezensis* BV01). On the other hand, broilers fed the basal diet showed a poorer feed conversion ratio ( $P < 0.05$ ).

In the 1 to 35-day-old phase, feed intake and weight gain were not altered by dietary treatments ( $P > 0.05$ ). However, the feed conversion ratio showed a trend towards better feed conversion in broilers fed diets supplemented with cBSFLM or fBSFLM, associated with *B. velezensis* BV01. This improvement in feed conversion ratio corresponds to approximately 4.11%. Diets containing BSFLM (cBSFLM or fBSFLM), both associated with *Bacillus velezensis* BV01, resulted in feed intake, weight gain, and feed conversion ratio similar to those observed in broilers that received the basal diet without added antibiotics or anticoccidials. In the 1 to 42-day period, productive performance parameters were not influenced by dietary treatments ( $P > 0.05$ ).

There was no difference ( $P > 0.05$ ) between treatments for live weight at slaughter, carcass yield, breast yield, and percentage of abdominal fat deposition in broilers at 42 days of age. On the other hand, the yields of thighs + drumsticks and wings were higher ( $P < 0.05$ ) for broilers fed diets containing BSFLM (cBSFLM or fBSFLM) associated with *B. velezensis* BV01.

In the periods before the sanitary challenge (1 to 14 days of age), during the challenge period (1 to 21 days of age), and the total rearing period, mortality was similar ( $P > 0.05$ ) among the evaluated treatments (Table 6).

### ***Lesion Score and Macroscopic Evaluation***

No significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed for the macroscopic parameters evaluated in the duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, and rectum (Table 7). On the other hand, within the evaluation time points, differences were identified ( $P < 0.05$ ) for the presence of fibrin in the jejunum and ileum for the broilers that received diets containing meals (cBSFLM or fBSFLM) associated with the evaluated probiotic.

There was no difference ( $P > 0.05$ ) between treatments for the average intestinal lesion score evaluated, incidence of *Eimeria*, lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate, necrosis, hemorrhage, and congestion (Table 8). However, when these parameters were evaluated at different ages within treatments, a significant effect was observed at 14, 21, and 42 days of age for the incidence of *Eimeria*, lymphocytic inflammatory infiltrate, and necrosis in both supplemented treatments, and for congestion in the broilers fed the basal diet without the use of antibiotics and anticoccidials.

### ***Histomorphometry and Histopathology***

Dietary treatments did not influence ( $P > 0.05$ ) the histopathological parameters at the 21 and 42-day-old phases, such as the incidence of *Eimeria*, lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate, necrosis, hemorrhage, and congestion (Tables 9 and 10). Similarly, the histomorphometric evaluations of villus height or

width and crypt depth or width were not influenced by the different treatments ( $P > 0.05$ ) at 14, 21, and 42 days of age (Table 11).

## **Cytokines**

TNF- $\alpha$  levels differed significantly ( $P < 0.05$ ) between treatments throughout the evaluated periods (Day 14 - before the challenge, Day 21 - peak of the challenge, and Day 42 - final recovery phase). At 14 days of age, broilers fed diets supplemented with fBSFLM + *B. velezensis* BV01 showed lower concentrations (51.00 pg/mL) compared to the group fed the basal diet (79.93 pg/mL). Similar results occurred at 21 and 42 days; TNF- $\alpha$  levels were significantly reduced in the groups supplemented with cBSFLM or fBSFLM, both associated with *B. velezensis* BV01 (Figure 1).

For IL-6, no differences ( $P > 0.05$ ) were found between treatments at 14 and 21 days. However, at 42 days, IL-6 levels were higher for broilers fed diets supplemented with cBSFLM + *Bacillus velezensis* BV01 ( $P < 0.05$ ) (Figure 2). At 14 and 42 days of age, no differences ( $P > 0.05$ ) were observed for IL-10. However, at 21 days, broilers fed diets supplemented with cBSFLM + *B. velezensis* BV01 showed higher levels of IL-10 ( $P < 0.05$ ) (Figure 3).

## **Discussion**

In this study, broilers fed diets supplemented with cBSFLM or fBSFLM, both associated with *B. velezensis* BV01, had better feed conversion in the 1 to 7 and 1 to 14-day-old phases. The observed improvement may be related to the high protein content of BSFLM and its balanced profile of essential amino acids, such as methionine, lysine, threonine, and leucine, which are fundamental for the

growth and development of broilers, especially in the initial phases. The meals also have a sulfur amino acid content, such as methionine, favoring protein synthesis and muscle metabolism (Agostini et al., 2016).

Furthermore, the inclusion of 25 g/kg of the meals in the diet resulted in an estimated energy increment of up to 70 Kcal/kg and 1.5% protein in the feed, considering the naturally high lipid and protein content of this ingredient. This additional energy and protein contribution may have favored feed conversion, especially at a time of high metabolic demand and accelerated development in the initial rearing phases.

These results are consistent with those reported by Yuan et al. (2025), who observed a positive impact of BSFLM for broilers, especially in the first week (1 to 8 days); supplementation with the meal positively impacted growth performance, promoting improvements of up to 6% in weight gain and feed conversion, attributed to the high protein content and amino acid profile of the meal.

The diet supplementation with cBSFLM associated with *B. velezensis* BV01 increased TNF- $\alpha$  concentration at 14 days, possibly due to the presence of bioactive compounds such as chitin, which acts as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), binding to pattern recognition receptors (PRRs), and thus stimulating the production of cytokines and immunological mediators (Stenberg et al., 2019).

On the other hand, broilers that received diet supplemented with fBSFLM and *B. velezensis* BV01 showed lower concentrations of TNF- $\alpha$ , which may indicate a modulatory effect of fermentation on the inflammatory response. One possible explanation is that fermentation may have promoted structural

modifications in PAMPs present in the meal, reducing their immunogenicity. These changes may have hindered recognition by innate immune system receptors, resulting in lower activation of the inflammatory cascade.

During the sanitary challenge period (1 to 21 days), broilers fed diet supplemented with cBSFLM or fBSFLM, both associated with *B. velezensis* BV01, showed better feed conversion and a trend towards increased weight gain. This response may be related to the functional properties of the meal and the probiotic, which, in addition to providing nutritional support, also acted in modulating the inflammatory response.

This hypothesis is reinforced by the lower TNF- $\alpha$  concentrations observed in the supplemented groups during the same period, indicating a reduction in intestinal inflammation. This immune modulation may have favored the redirection of the organism's energy towards growth, instead of inflammatory responses, contributing both to better diet utilization and improved productive performance.

The analysis of the lipid profile of the meals revealed that both meals (cBSFLM or fBSFLM) contained approximately 4.26% lauric acid. This medium-chain fatty acid is widely recognized for its antimicrobial properties, as it inhibits bacterial cell wall synthesis. This effect occurs because lauric acid contains a hydroxyl group with antibacterial properties, which binds strongly to the surface of anionic bacteria through electrostatic attraction, causing structural damage to the cell membrane, resulting in lysis and cell death (Borrelli et al., 2021; Dewanti et al., 2024).

Fortuoso et al. (2019) report that lauric acid has anti-inflammatory and antimicrobial action, capable of reducing the release of pro-inflammatory

cytokines. This immune modulation is especially relevant in conditions of enteric challenge, such as necrotic enteritis, in which the exacerbated production of cytokines is associated with tissue damage and increased energy expenditure.

Thus, the presence of lauric acid in the diets may have contributed to the lower TNF- $\alpha$  concentrations observed during the challenge period for the broilers fed diets supplemented with the meals. In addition to lauric acid, BSFLM contains antimicrobial peptides, which may also have favored a lower inflammatory response due to their ability to disrupt bacterial membranes (Xia et al., 2021; Fahmy et al., 2024).

In the same phase, broilers that received the basal diet (without additives) had a poorer feed conversion ratio. This result is corroborated by Sun et al. (2023), who reported that subclinical necrotic enteritis frequently results in poorer feed conversion due to intestinal damage caused by the actions of toxins and consequent lower nutrient absorption.

IL-6, a pro-inflammatory cytokine, showed no significant difference between treatments at 14 days (before the challenge) and 21 days (peak of the challenge). However, an increase in the levels of this cytokine is observed at 21 days compared to 14 days, which suggests an inflammatory response associated with the challenge phase (Daneshmand et al., 2022).

The cytokine IL-10 is an important anti-inflammatory mediator, with an important role in attenuating exacerbated inflammatory responses. At 21 days, broilers that received diet supplemented with cBSFLM and *B. velezensis* BV01 showed a higher concentration of IL-10, which may reflect a more intense anti-inflammatory response to the challenge. However, birds that received fBSFLM and the probiotic showed lower concentrations of IL-10. This result is explained

by the lower concentrations of pro-inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ ) observed in this group. Thus, faced with a less intense inflammatory response, the production of IL-10, whose function is precisely to contain this process, also tends to be reduced.

In the final rearing periods (1 to 35 and 1 to 42 days), it was observed that broilers fed diet supplemented with cBSFLM or fBSFLM, both associated with *B. velezensis* BV01, showed performance similar to the control treatment (without additives). However, a trend towards better feed conversion was observed, possibly related to the effect of immune system modulation also observed in this final rearing phase.

Similar to what was observed at 21 days, TNF- $\alpha$  concentrations were also lower at 42 days in broilers fed diet supplemented with cBSFLM or fBSFLM and probiotic reinforcing the role of this combination in regulating the inflammatory response. Studies by Liu et al. (2024) demonstrate that *B. velezensis* KNF-209 reduced TNF- $\alpha$  and IL-6 levels, in addition to increasing IL-10 levels; these immunomodulatory effects promoted by the probiotic are attributed to its anti-inflammatory potential, promoted by mechanisms such as the production of biomolecules with immunomodulatory action, including proteins, cell wall components, and microbial metabolites.

Furthermore, *B. velezensis* is capable of synthesizing secondary metabolites with antimicrobial activity, such as bacteriocins, antimicrobial proteins, and lipopeptides, which act directly in containing pathogenic agents and reducing inflammatory processes (Ye et al., 2020).

In this same period, broilres fed the control diet, without the use of additives, showed performance similar to those supplemented with cBSFLM or

fBSFLM plus *B. velezensis* BV01. This result may be related to the compensatory growth of the broilres, characterized by the ability of animals to recover previous performance losses, especially after recovering from adverse conditions, such as intestinal inflammation resulting from the sanitary challenge. During this process, broilers generally demonstrate better feed efficiency, with this response being influenced by factors such as diet composition, duration of stress, and environmental conditions during recovery (Ajao et al., 2024; Valipourian et al., 2025).

At 42 days, broilers fed diets supplemented with cBSFLM and *B. velezensis* BV01 showed significantly higher concentrations of IL-6. Although it plays a role as a pro-inflammatory cytokine, IL-6 also plays an important part in controlling inflammation. This action of IL-6 occurs sequentially; initially, it participates in the inflammatory response against pathogens, and subsequently, with the reduction and control of the infection, it acts in activating tissue repair mechanisms and mucosal regeneration (Scheller et al., 2011). This regenerative role of IL-6 may explain the reduction in intestinal lesion scores observed in this same period.

The low mortality observed during the experiment is compatible with the subclinical form of necrotic enteritis. This disease presentation is generally milder, does not cause evident clinical signs or mortality peaks, and is characterized mainly by a general reduction in the productive performance of the birds (Paiva and McElroy, 2014). This pattern was confirmed in this study, in which, despite the absence of significant mortality, typical intestinal changes of subclinical enteritis and a worsening of performance during the challenge period were identified.

It is worth noting that the study aimed to induce a state of subclinical necrotic enteritis, precisely because it represents the manifestation with the greatest economic impact in poultry farming (Shini et al., 2020; Mora et al., 2020).

Regarding the carcass and parts yield of the broilres at 42 days, in the present study, no significant differences were observed between dietary treatments for live weight, breast yield, and abdominal fat. These results may be related to the subclinical nature of the enteritis, whose effects are concentrated in the intestinal tract, without promoting severe systemic changes capable of compromising generalized muscle development (Silva et al., 2024).

Furthermore, although the tested additives showed positive effects on productive performance and modulation of the immune response, their mechanisms of action may not have promoted direct stimuli to protein synthesis or muscle growth, which would explain the absence of expressive effects on carcass yield.

Similarly, Soni (2021) observed no significant effects with the inclusion of *B. velezensis* ZBG17 on carcass characteristics. Likewise, studies by Pieterse et al. (2019), Cirilo et al. (2023), and Saidani et al. (2024), which evaluated the use of BSFLM, also did not report significant variations.

However, differences were observed for the variables of wing and thigh + drumstick yield, suggesting that the additives used may have positively influenced localized muscle deposition. Rehman et al. (2020) attributed improvements in carcass characteristics to the addition of prebiotics, associating this effect with the inhibition of intestinal pathogen colonization and increased efficiency in nutrient utilization, such as protein and energy.

The analysis of intestinal lesions represents one of the main parameters for determining the severity of necrotic enteritis in experimental models (Cooper et al., 2009). The jejunal intestinal lesion scores of the broilers were not influenced by the treatments; however, at 21 days, the broilers had the highest scores, which coincides with the expected peak of intestinal inflammation induced by the challenge. Nevertheless, at 42 days, a reduction in scores was observed, indicating that the broilers, regardless of the treatment, were able to recover their intestinal integrity.

The mortality and lesion scores observed in this study corroborate those found by Swaggerty et al. (2016), Johnson et al. (2019), and Kan et al. (2021), who indicate that the condition of subclinical necrotic enteritis tends to promote lower mortality and milder lesions, which is compatible with the subclinical conditions of the sanitary challenge employed. The results found in this study were compatible with those described by Paiva and McElroy (2014) for subclinical necrotic enteritis, which is characterized by macroscopic lesions observed mainly in the jejunum and ileum, with possible extension to the duodenum and cecum, being characterized by mucosal necrosis and the presence of an adhered diphtheritic membrane. These authors also describe that, in histopathological analysis, an intense inflammatory response to *C. perfringens* occurs, with an inflammatory infiltrate composed of heterophils, lymphocytes, macrophages, and plasma cells. Diffuse coagulative necrosis of the mucosa, vascular congestion in the lamina propria and submucosa, as well as membranes formed by tissue fragments, cellular debris, and bacterial colonies, are also observed.

Macroscopic evaluation indicated a higher incidence of fibrin in the jejunum and ileum at 21 days of age, although no significant differences were

observed between treatments. Fibrin deposition may be related to lesions in the intestinal mucosa and the activation of the coagulation cascade in response to tissue damage, common in cases of enteritis (Smyth, 2016).

The evaluation of the frequency of histological lesions corroborates these results. At 21 days, most birds showed a score of 2 for *Eimeria* sp., necrosis, and lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate, in which the predominance of heterophils was noted, indicative of an acute inflammatory response. Vascular congestion varied between scores 0 and 2. At 42 days, a predominance of scores 0 and 1 was observed for all evaluated variables, suggesting a process of intestinal regeneration and reduction of local inflammation.

The lower incidence and severity of intestinal lesions observed in broilers fed diet supplemented with *B. velezensis* may be related to the antimicrobial action of this strain against *C. perfringens*, the etiological agent of necrotic enteritis. In particular, Zhu La et al. (2024) demonstrated that the *B. velezensis* CML352 strain showed significant inhibitory activity against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, and, principally, *C. perfringens*, reinforcing the potential of this probiotic in preventing intestinal damage associated with the infection.

The diets evaluated in this experiment did not influence jejunal histomorphometry, corroborating reports by Chu et al. (2020) that BSFLM showed no effect on intestinal morphology. Conversely, Yuan et al. (2025) observed that increasing inclusion of BSFLM, especially at high levels, aggravated the effects of coccidial infection, compromising intestinal integrity. In the present study, the use of BSFLM at low inclusion may justify the absence of effects on intestinal morphology.

Similarly, some studies with probiotics have also observed no effects on intestinal histomorphometry, as reported by Wang et al. (2016), using individual and combined commercial prebiotics and probiotics (*Bacillus subtilis* strains 2084, LSSAO1, and 15A-P4) in broiler diets. Although intestinal morphology was not altered in the present study, the positive effects observed on productive performance and modulation of the inflammatory response suggest that the additives used, especially in association, exerted a relevant functional influence, possibly through mechanisms that are not directly reflected in histological structures but contribute to the integrity and efficiency of the gastrointestinal tract.

## **Conclusion**

Dietary inclusion of black soldier fly larvae meal, in conventional or fermented forms, associated with *Bacillus velezensis* BV01, modulates inflammatory cytokine of broilers challenged with subclinical necrotic enteritis. This immunomodulation was concomitant with the improved feed conversion ratio during early growth and the peak challenge phase, indicating the potential of these combinations as functional additive for broilers under subclinical intestinal disease.

## **Ethics approval**

The animal study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Lavras (UFLA) (protocol number 015/21).

## **Data and model availability statement**

None of the data were deposited in an official repository. The data are available from the authors upon reasonable request.

### **Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process**

During the preparation of this work the author (s) did not use any AI and AI-assisted technologies.

### **Author ORCIDs**

I. C. de B. Ayres <https://orcid.org/0000-0003-4295-9108>

J. P. F Guimarães <https://orcid.org/0000-0002-0355-7491>

L. E. N. de Oliveira <https://orcid.org/0009-0005-5428-172X>

B. C. Aguiar <https://orcid.org/0009-0002-2877-0333>

M. M. B. Oshima <https://orcid.org/0009-0003-8955-6258>

M. E. de S. T. Campos <https://orcid.org/0000-0002-7222-0737>

B. B. Fonseca <https://orcid.org/0000-0001-8485-078X>

J. C. Silva <https://orcid.org/0000-0002-1547-4087>

V. A. de C. Azevedo <http://orcid.org/0000-0002-4775-2280>

L. de P. Naves <https://orcid.org/0000-0001-8067-829X>

### **Declaration of interest**

We have no conflicts of interest to declare.

### **Acknowledgements**

To the company BSF Nutrição e Biotecnologia Ltda (CYNS®, Piracicaba, São Paulo, Brazil) for supplying the conventional black soldier fly larvae meal.

#### **Financial support statement**

The authors thank the financial support provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; Edital N° 001/2021 - DEMANDA UNIVERSAL, process number APQ-00952-21), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### **References**

- Agostini, P.S., Dalibard, P., Mercier, Y., Van der Aar, P., Van der Klis, J.D. 2016. Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers. Poult. Sci., v. 95, p. 560–569.
- Ajao, A.M., Liu, G., Taylor, J., Ball, M.E.E., Mercier, Y., Applegate, T.J., Olukosi, O.A. Phase-specific outcomes of arginine or branched-chain amino acids supplementation in low crude protein diets on performance, nutrient digestibility, and expression of tissue protein synthesis and degradation in broiler chickens infected with mixed *Eimeria* spp. 2024. Poult. Sci., v. 103, n. 7, p. 103811.
- Association of Official Analytical Chemists. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 18th ed., AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.

- 725 Belhadj Slimen, I., Yerou, H., Ben Larbi, M., M'Hamdi, N., Najar, T. Insects as  
 726 an alternative protein source for poultry nutrition: A review. 2023. *Front.*  
 727 *Vet. Sci.*, v. 10, p. 1200031.
- 728 Borrelli, L., Varriale, L., Dipineto, L., Pace, A., Menna, L.F., Fioretti, A. Insect  
 729 derived lauric acid as promising alternative strategy to antibiotics in the  
 730 antimicrobial resistance scenario. 2021. *Front. Microbiol.*, v. 12, p. 620798.
- 731 Castro, R.J.S., Sato, H.H. Simultaneous hydrolysis of proteins from different  
 732 sources to enhance their antibacterial properties through the synergistic  
 733 action of bioactive peptides. 2016. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v. 8, p.  
 734 209–212.
- 735 Chu, X., Li, M., Wang, G., Wang, K., Shang, R., Wang, Z., Li, L. Evaluation of  
 736 the low inclusion of full-fatted *Hermetia illucens* larvae meal for layer  
 737 chickens: Growth performance, nutrient digestibility, and gut health. 2020.  
 738 *Front. Vet. Sci.*, v. 27, n. 7, p. 1-7.
- 739 Cirilo, E.H., Junior, N.R., Andrade, T., Souza, C., Kaufmann, C., Kohler, T.L.,  
 740 Nunes, R.V. Effects of probiotics on blood metabolites, enterocytes,  
 741 growth, and carcass characteristics of broilers challenged with *Salmonella*  
 742 Serovar Heidelberg. 2023. *Livest. Sci.*, v. 270, 105188.
- 743 Cobb Vantress. 2022. Performance & Nutrition Supplement. Cobb-Vantress:  
 744 Siloam Springs, AR, USA. Available online: [https://www.cobb-](https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/2022-Cobb500-Broiler-Performance-Nutrition-Supplement.pdf)  
 745 [vantress.com/assets/Cobb-Files/2022-Cobb500-Broiler-Performance-](https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/2022-Cobb500-Broiler-Performance-Nutrition-Supplement.pdf)  
 746 [Nutrition-Supplement.pdf](https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/2022-Cobb500-Broiler-Performance-Nutrition-Supplement.pdf) (accessed on 30 September 2024).
- 747 Collier, C.T., Hofacre, C.L., Payne, A.M., Anderson, D.B., Kaiser, P., Mackie,  
 748 R.I., Gaskins, H.R. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of

- 749 necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. 2008. *Vet.*  
750 *Immunol. Immunopathol.*, v. 122, p. 104–115.
- 751 Cooper, K.K., Songer, J.G. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric  
752 infection by *Clostridium perfringens* type A. 2009. *Anaerobe*, v. 15, p. 55–  
753 60.
- 754 Cui, Y., Zhu, J., Li, P., Guo, F., Yang, B., Su, X., Xu, F. Assessment of probiotic  
755 *Bacillus velezensis* supplementation to reduce *Campylobacter jejuni*  
756 colonization in chickens. 2024. *Poult. Sci.*, v. 103, n. 8, p. 1-10. 103897.
- 757 Daneshmand, A., Kermanshahi, H., Mohammed, J., Sekhavati, M.H.,  
758 Javadmanesh, A., Ahmadian, M., Kulkarni, R.R. Intestinal changes and  
759 immune responses during *Clostridium perfringens*-induced necrotic  
760 enteritis in broiler chickens. 2022. *Poult. Sci.*, v. 101, n. 3, p. 1-9.
- 761 Detmann, E., Costa e Silva, L.F., Rocha, G.C., Palma, M.N.N., Rodrigues,  
762 J.P.P. Métodos para Análise de Alimentos, INCT: Viçosa, Minas Gerais,  
763 Brazil, 2021.
- 764 Dewanti, R., Martien, R., Ariyadi, B. Nano-emulsified black soldier fly oil  
765 concerning performance traits, health, and immunity of broilers. *Poult. Sci.*  
766 2024, v. 103, n. 10, p. 1-13.
- 767 Dierick, E., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., Goossens, E. Research Note: The  
768 administration schedule of coccidia is a major determinant in broiler  
769 necrotic enteritis models. 2021. *Poult. Sci.*, v. 100, n. 3, p. 1-6. 100806.
- 770 dos Reis, T.F.M., Hoepers, P.G., Azevedo, V.A. et al. Chicken embryos are a  
771 valuable model for the selection of *Bacillus subtilis* for probiotic  
772 purposes. 2022. *Arch Microbiol* v. 204, n. 715.

- 773 European Union. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament  
774 and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal  
775 nutrition. Off. J. Eur. Union 2003, L 268, 29–43. Available online:  
776 <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2003/1831/oj> (accessed on 30 September  
777 2024).
- 778 Fahmy, L., Generalovic, T., Ali, Y.M., Seilly, D., Sivanesan, C., Kalmar, L.,  
779 Pipan, M., Christie, G., Grant, A.J. A novel family of defensin-like peptides  
780 from *Hermetia illucens* with antibacterial properties. 2024. BMC Microbiol.,  
781 v. 24, n. 167, p. 1-13.
- 782 Fortuoso, B.F., Dos Reis, J.H., Gebert, R.R., Barreta, M., Griss, L.G.,  
783 Casagrande, R.A., Cristo, T.G., Santiani, F., Campigotto, G., Rampazzo,  
784 L., et al. Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing  
785 conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat  
786 quality. 2019. Microb. Pathog., v. 129, p. 161–167.
- 787 Gomide, E.M., Rodrigues, P.B., Naves, L.D.P., Bernardino, V.M., Bertechini,  
788 A.G., Fassani, E.J., de Freitas, R.T. Phytase and amino acids for broilers  
789 from 36 to 42 days of age. 2014. Rev. Bras. Ciênc. Agrár., v. 9, p. 295–  
790 300.
- 791 Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J. Precolumn phenylisothiocyanate  
792 derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. 1989. J.  
793 Assoc. Off. Anal. Chem., v. 72, p. 912–916.
- 794 Johnson, C.N., Kogut, M.H., Genovese, K., He, H., Kazemi, S., Arsenault, R.J.  
795 Administration of a postbiotic causes immunomodulatory responses in  
796 broiler gut and reduces disease pathogenesis following challenge. 2019.  
797 Microorganisms, v. 7, n. 8, p. 1-19.

- 798 Kan, L., Guo, F., Liu, Y., Pham, V.H., Guo, Y., Wang, Z. Probiotics *Bacillus*  
 799 *licheniformis* improves intestinal health of subclinical necrotic enteritis-  
 800 challenged broilers. 2021. *Front. Microbiol.*, v. 12, p. 1-17. 623739.
- 801 Keerqin, C., Rhayat, L., Zhang, Z.H., Gharib-Naseri, K., Kheravii, S.K.,  
 802 Devillard, E., Crowley, T.M., Wu, S.B. Probiotic *Bacillus subtilis* 29784  
 803 improved weight gain and enhanced gut health status of broilers under  
 804 necrotic enteritis condition. 2021. *Poult. Sci.*, v. 100, n. 4, p. 1-13. 100981.
- 805 Kerem, Z., Bravdo, B.A., Shoseyov, O., Tugendhaft, Y. Rapid liquid  
 806 chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic  
 807 compounds in red wine and must. 2004. *J. Chromatogr. A*, v. 1052, n. 1-2,  
 808 p. 211–215.
- 809 Lau, C.H.F., Capitani, S., Tien, Y.C., Verellen, L.A., Kithama, M., Kang, H.,  
 810 Kiarie, E.G., Topp, E., Diarra, M.S., Fruci, M. Dynamic effects of black  
 811 soldier fly larvae meal on the cecal bacterial microbiota and prevalence of  
 812 selected antimicrobial resistant determinants in broiler chickens. 2024.  
 813 *Anim. Microbiome*, v. 6, p. 1-16.
- 814 Li, C., Li, S., Dang, G., Jia, R., Chen, S., Deng, X., Cai, H. Screening and  
 815 characterization of *Bacillus velezensis* LB-Y-1 toward selection as a  
 816 potential probiotic for poultry with multi-enzyme production property. 2023.  
 817 *Front. Microbiol.*, v. 14, p.1-15. 1143265.
- 818 Liu, Y., Xiong, M., Hu, X., Li, Y., Zhang, W., He, W., Chen, Y. Dietary *Bacillus*  
 819 *velezensis* KNF-209 supplementation improves growth performance,  
 820 enhances immunity, and promotes gut health in broilers. 2024. *Poult. Sci.*,  
 821 v. 103, n. 9, p. 1-10. 103946.

- 822 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução  
823 Normativa Nº 1, de 13 de Janeiro de 2020. Available online:  
824 [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/legislacao-alimentacao-animal)  
825 [agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/legislacao-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/legislacao-alimentacao-animal)  
826 [alimentacao-animal](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/legislacao-alimentacao-animal) (accessed on 30 September 2024).
- 827 Mora, Z.V., Macías-Rodríguez, M.E., Arratia-Quijada, J., Gonzalez-Torres, Y.S.,  
828 Nuño, K., Villarruel-López, A. Clostridium perfringens as foodborne  
829 pathogen in broiler production: Pathophysiology and potential strategies  
830 for controlling necrotic enteritis. 2020. Animals, v. 10, p, 1-28. 1718.
- 831 Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Di Somma, A., Vogel, H., Pucci, P.,  
832 Falabella, P. A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in  
833 the Black Soldier Fly (BSF) Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae).  
834 2020. Sci. Rep., v. 10, p. 1-14. 16875.
- 835 Mottet, A., Tempio, G. Global poultry production: Current state and future  
836 outlook and challenges. 2017. World's Poult. Sci. J., v. 73, p. 245–256.
- 837 OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2023–2032, OECD Publishing:  
838 Paris, France, FAO: Rome, Italy, 2023. Available online:  
839 [https://www.oecd.org/en/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-2023-](https://www.oecd.org/en/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-2023-2032_08801ab7-en.html)  
840 [2032\\_08801ab7-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-2023-2032_08801ab7-en.html) (accessed on 30 September 2024).
- 841 Oliveira, C.C., Souza, A.K.S., Castro, R.J.S. Bioconversion of chicken feather  
842 meal by Aspergillus niger: Simultaneous enzymes production using a cost-  
843 effective feedstock under solid state fermentation. 2019. Indian J.  
844 Microbiol., v. 59, p. 209–216.
- 845 Paiva, D., McElroy, A. Necrotic enteritis: Applications for the poultry industry.  
846 2014. J. Appl. Poult. Res., v. 23, p. 557–566.

- 847 Park, C.J., Sun, S.S. Effect of dietary metallo-protease and *Bacillus velezensis*  
848 CE 100 supplementations on growth performance, footpad dermatitis and  
849 manure odor in broiler chickens. 2022. *Anim. Biosci.*, v. 35, p. 1628–1636.
- 850 Pieterse, E., Erasmus, S.W., Uushona, T., Hoffman, L.C. Black soldier fly  
851 (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a dietary protein source for broiler  
852 production ensures a tasty chicken with standard meat quality for every  
853 pot. 2019. *J. Sci. Food Agric.*, v. 99, p. 893–903.
- 854 Rehman, A., Arif, M., Sajjad, N., Al-Ghadi, M.Q., Alagawany, M., Abd El-Hack,  
855 M.E., Swelum, A.A. Dietary effect of probiotics and prebiotics on broiler  
856 performance, carcass, and immunity. 2020. *Poult. Sci.*, v. 99, p. 6946–  
857 6953.
- 858 Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Hannas, M.I., Donzele, J.L., Sakomura, N.K.,  
859 Perazzo, F.G., Saraiva, A., Teixeira, M.L., Rodrigues, P.B., Oliveira, R.F.,  
860 et al. Composição de alimentos e exigências nutricionais. In *Tabelas*  
861 *Brasileiras para Aves e Suínos*, 4th ed., UFV: Viçosa, Brazil, 2017, p. 488.
- 862 Saidani, M., Dabbou, S., Ben Larbi, M., Belhadj Slimen, I., Fraihi, W., Arbi, T.,  
863 M'Hamdi, N. Effect of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal  
864 on growth performance, carcass characteristics, meat quality, and cecal  
865 microbiota in broiler chickens. 2025. *Front. Anim. Sci.*, v. 6, p. 1-12.  
866 1531773.
- 867 Sakomura, N.K., Rostagno, H.S. *Métodos de Pesquisa em Nutrição de*  
868 *Monogástricos*, FUNEP: Jaboticabal, São Paulo, Brazil, 2016.
- 869 SAS Institute Inc. SAS OnDemand for Academics, SAS Institute Inc.: Cary, NC,  
870 USA, 2012. Available online: [https://www.sas.com/pt\\_br/software/on-](https://www.sas.com/pt_br/software/on-demand-for-academics.html)  
871 [demand-for-academics.html](https://www.sas.com/pt_br/software/on-demand-for-academics.html) (accessed on 30 September 2024).

- 872 Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. The pro-and anti-  
873 inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. 2011. *Biochim.*  
874 *Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, v. 1813, p. 878–888.
- 875 Shah, B.R., Hakeem, W.A., Shanmugasundaram, R., Selvaraj, R.K. Effect of  
876 synbiotic supplementation on production performance and severity of  
877 necrotic enteritis in broilers during an experimental necrotic enteritis  
878 challenge. 2023. *Poult. Sci.*, v. 102, n. 10, p. 1-15, 102959.
- 879 Shini, S., Zhang, D., Aland, R.C., Li, X., Dart, P.J., Callaghan, M.J., Speight,  
880 R.E., Bryden, W.L. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* H57 ameliorates  
881 subclinical necrotic enteritis in broiler chicks by maintaining intestinal  
882 mucosal integrity and improving feed efficiency. 2020. *Poult. Sci.*, v. 99, p.  
883 4278–4293.
- 884 Silva, P., Rohloff, N., Catoia, M.R., Kaufmann, C., Tesser, G.L., Weber, S.H.,  
885 Costa, L.B. Alternative to antimicrobial growth promoters in the diets of  
886 broilers challenged with subclinical necrotic enteritis. 2024. *Poult. Sci.*, v.  
887 103, p. 1-10, 103986.
- 888 Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES). 2017.  
889 *Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal*, SINDIRAÇÕES: São Paulo,  
890 Brazil.
- 891 Slimen Belhadj, I., Yerou, H., Ben Larbi, M., M’Hamdi, N., Najar, T. Insects as  
892 an alternative protein source for poultry nutrition: A review. 2023. *Front.*  
893 *Vet. Sci.*, v. 10, p. 1-15. 1200031.
- 894 Smyth, J.A. Pathology and diagnosis of necrotic enteritis: Is it clear-cut? 2016.  
895 *Avian Pathol.*, v. 45, p. 282–287.

- 896 Soni, R., Keharia, H., Bose, A., Pandit, N., Doshi, J., Rao, S.R., Raju, M.V.L.N.  
 897 Genome assisted probiotic characterization and application of *Bacillus*  
 898 *velezensis* ZBG17 as an alternative to antibiotic growth promoters in  
 899 broiler chickens. 2021. *Genomics*, v. 113, p. 4061–4074.
- 900 Sousa, E.G., Campos, G.M., Viana, M.V.C., Gomes, G.C., Rodrigues, D.L.N.,  
 901 Aburjaile, F.F., Fonseca, B.B., Araújo, M.R.B., Costa, M.M., Guedon, E., et  
 902 al. The research on the identification, taxonomy, and comparative  
 903 genomics analysis of nine *Bacillus velezensis* strains significantly  
 904 contributes to microbiology, genetics, bioinformatics, and biotechnology.  
 905 2025. *Front. Microbiol.*, v. 16, p. 1-15. 1544934.
- 906 Stenberg, O.K., Holen, E., Piemontese, L., Liland, N.S., Lock, E.J., Espe, M.,  
 907 Belghit, I. Effect of dietary replacement of fish meal with insect meal on in  
 908 vitro bacterial and viral induced gene response in Atlantic salmon (*Salmo*  
 909 *salar*) head kidney leukocytes. 2019. *Fish Shellfish Immunol.* v. 91, p.  
 910 223–232.
- 911 Sun, N., Xue, Y., Wei, S., Wu, B., Wang, H., Zeng, D., Ni, X. Compound  
 912 probiotics improve body growth performance by enhancing intestinal  
 913 development of broilers with subclinical necrotic enteritis. 2023. *Probiotics*  
 914 *Antimicrob. Proteins*, v. 15, p. 1013–1027.
- 915 Swaggerty, C.L., McReynolds, J.L., Byrd, J.A., Pevzner, I.Y., Duke, S.E.,  
 916 Genovese, K.J., Kogut, M.H. Selection for pro-inflammatory mediators  
 917 produces chickens more resistant to *Clostridium perfringens*-induced  
 918 necrotic enteritis. 2016. *Poult. Sci.*, v. 95, p. 370–374.
- 919 Valipourian, R., Shariatmadari, F., Ahmadi, H., Torshizi, M.A.K. Probiotic post  
 920 feed restriction supplementation on realimentation performances, carcass

- characteristic, gut morphology and gut microbes of broiler chicken. 2025. J. Appl. Poult. Res., v. 34, p. 1-7. 100502.
- Van Dijk, M., Morley, T., Rau, M.L., Saghai, Y. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. 2021. Nat. Food, v. 2, p. 494–501.
- Wang, X., Farnell, Y.Z., Peebles, E.D., Kiess, A.S., Wamsley, K.G.S., Zhai, W. Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. 2016. Poult. Sci., v. 95, p. 1332–1340.
- White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. 1986. J. Autom. Chem. v. 8, p. 170–177.
- Xia, J., Ge, C., Yao, H. Antimicrobial peptides from black soldier fly (*Hermetia illucens*) as potential antimicrobial factors representing an alternative to antibiotics in livestock farming. 2021. Animals, v. 11, n. 7, p. 1-16, 1937.
- Ye, M., Wei, C., Khalid, A., Hu, Q., Yang, R., Dai, B., Wang, Z. Effect of *Bacillus velezensis* to substitute in-feed antibiotics on the production, blood biochemistry and egg quality indices of laying hens. 2020. BMC Vet. Res., v. 16, p. 1-8, 400.
- Yuan, J., Ajuwon, K.M., Adeola, O. Impact of partially defatted black soldier fly larvae meal on coccidia-infected chickens: Effects on growth performance, intestinal health, and cecal short-chain fatty acid concentrations. 2025. J. Anim. Sci. Biotechnol., v. 16, p. 1-12, 30.
- Zhu, L.A.T., Wen, Q., Xiao, Y., Hu, D., Liu, D., Guo, Y., Hu, Y. A New *Bacillus velezensis* strain CML532 improves chicken growth performance and

- 946 reduces intestinal *Clostridium perfringens* colonization. 2024.
- 947 *Microorganisms*, v. 12, n. 4, p. 1-18. 771.

**Table 1**

Ingredients and nutritional composition of the diets provided to broiler chickens during different rearing periods.

|                                   | Broiler rearing period (days of age) |        |         |         |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--------|---------|---------|
|                                   | 1 a 7                                | 8 a 21 | 22 a 35 | 36 a 42 |
| <b>Ingredients (%)</b>            |                                      |        |         |         |
| Corn (CP-7,86%)                   | 54.236                               | 59.167 | 61.296  | 63.083  |
| Soybean meal (CP-46%)             | 35.372                               | 31.458 | 29.244  | 27.144  |
| Soybean oil                       | 2.748                                | 2.532  | 2.959   | 3.501   |
| Limestone                         | 0.527                                | 0.750  | 0.704   | 0.693   |
| Dicalcium phosphate P-18,5%       | 2.557                                | 1.613  | 1.469   | 1.433   |
| Commom salt                       | 0.459                                | 0.460  | 0.461   | 0.462   |
| DL-Methionine (99%)               | 0.379                                | 0.351  | 0.309   | 0.247   |
| L- Lysine HCL (98%)               | 0.306                                | 0.297  | 0.236   | 0.173   |
| L-Threonine (98%)                 | 0.163                                | 0.126  | 0.069   | 0.012   |
| Choline chloride (60%)            | 0.050                                | 0.050  | 0.050   | 0.050   |
| Vitamin supplement <sup>1</sup>   | 0.100                                | 0.100  | 0.100   | 0.100   |
| Mineral supplement <sup>2</sup>   | 0.100                                | 0.100  | 0.100   | 0.100   |
| Kaolin (inert) <sup>3</sup>       | 3.000                                | 3.000  | 3.000   | 3.000   |
| <b>Calculated composition (%)</b> |                                      |        |         |         |
| Metabolizable energy (kcal/kg)    | 2,950                                | 3,000  | 3,050   | 3,100   |
| Crude protein (%)                 | 21.50                                | 20.00  | 19.00   | 18.00   |
| Total calcium (%)                 | 0.96                                 | 0.80   | 0.74    | 0.72    |
| Available phosphorus (%)          | 0.58                                 | 0.40   | 0.37    | 0.36    |
| Sodium (%)                        | 0.19                                 | 0.19   | 0.19    | 0.19    |

|                                         |      |      |      |      |
|-----------------------------------------|------|------|------|------|
| Chlorine (%)                            | 0.34 | 0.34 | 0.34 | 0.34 |
| Potassium (%)                           | 0.82 | 0.76 | 0.73 | 0.69 |
| Digestible lysine (%)                   | 1.26 | 1.16 | 1.06 | 0.96 |
| Digestible methionine +<br>cysteine (%) | 0.94 | 0.88 | 0.82 | 0.74 |
| Digestible threonine (%)                | 0.86 | 0.78 | 0.70 | 0.62 |
| Digestible tryptophan (%)               | 0.24 | 0.22 | 0.20 | 0.19 |

---

<sup>1</sup>Levels per kg of supplement: folic acid (902.5 mg), pantothenic acid (12.0 g), biotin (77.0 mg), niacin (40.0 g), selenium (349.60 mg), vitamin A (8,800,000.0 IU), vitamin B1 (2,499.0 mg), vitamin B12 (16,200.0 µg), vitamin B2 (5,704.0 mg), vitamin B6 (3,998.4 mg), vitamin D3 (3,000,000.0 IU), vitamin E (30,000.0 IU), vitamin K3 (2,198.1 mg).

<sup>2</sup>Levels per kg of supplement: copper (7.0 g), iron (50.0 g), iodine (1,500.0 mg), manganese (67.5 g), zinc (45.6 g).

<sup>3</sup>Experimental diets T2 (containing conventional black soldier fly larvae meal [cBSFLM] + *Bacillus velezensis* BV01) and T3 (containing fermented black soldier fly larvae meal [fBSFLM] + *Bacillus velezensis* BV01) were obtained by replacing kaolin (inert) from the T1 (basal diet) formulation. Kaolin replacement corresponded to 25 g/kg of feed for cBSFLM or fBSFLM, and the probiotic *Bacillus velezensis* BV01 was included at 1 g/kg of feed, corresponding to 1x10<sup>9</sup> CFU/kg of feed.

**Table 2**

Chemical composition and gross energy of the black soldier fly larvae meals evaluated in the experiment (g/100g, as-fed basis) <sup>1</sup>.

|                        | Conventional meal (cBSFLM) <sup>2</sup> | Fermented meal (fBSFLM) <sup>3</sup> |
|------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|
| Gross energy (kcal/kg) | 5,088 ± 130.10                          | 5,080 ± 112.43                       |
| Dry matter             | 94.41 ± 0.02                            | 93.91 ± 0.24                         |
| Ash                    | 10.30 ± 0.32                            | 11.18 ± 0.06                         |
| Crude protein          | 52.40 ± 0.14                            | 53.55 ± 0.07                         |
| Non-protein nitrogen   | 1.85 ± 0.07                             | 2.15 ± 0.07                          |
| Ether extract          | 14.51 ± 0.31                            | 13.64 ± 0.54                         |
| Crude fiber            | 0.52 ± 0.03                             | 0.78 ± 0.03                          |
| NDF <sup>4</sup>       | 48.18 ± 0.90                            | 45.41 ± 0.51                         |
| ADF <sup>5</sup>       | 16.14 ± 0.35                            | 17.42 ± 0.77                         |

<sup>1</sup>Each value represents the mean of triplicate analyses, followed by its respective standard deviation.

<sup>2</sup>Conventional black soldier fly larvae meal (cBSFLM), as commercially available. <sup>3</sup>Fermented black soldier fly larvae meal (fBSFLM), conventional meal commercially acquired and subjected to a fermentation process. <sup>4</sup>Neutral detergent fiber (NDF). <sup>5</sup>Acid detergent fiber (ADF).

**Table 3**

Amino acid profile of the black soldier fly larvae meals evaluated in the experiment (g/100g, as-fed basis) <sup>1</sup>.

| Amino acid        | Conventional meal (cBSFLM) <sup>2</sup> | Fermented meal (fBSFLM) <sup>3</sup> |
|-------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|
| Methionine        | 0.99                                    | 1.00                                 |
| Lysine            | 3.41                                    | 3.34                                 |
| Threonine         | 1.78                                    | 1.89                                 |
| Arginine          | 2.37                                    | 2.25                                 |
| Valine            | 2.79                                    | 2.93                                 |
| Isoleucine        | 2.31                                    | 2.40                                 |
| Leucine           | 3.58                                    | 3.65                                 |
| Histidine         | 1.53                                    | 1.37                                 |
| Phenylalanine     | 2.15                                    | 2.27                                 |
| Alanine           | 3.36                                    | 3.53                                 |
| Cysteine          | 0.52                                    | 0.45                                 |
| Tyrosine          | 3.31                                    | 3.36                                 |
| Glycine           | 2.85                                    | 3.08                                 |
| Serine            | 1.99                                    | 2.03                                 |
| Proline           | 2.76                                    | 2.86                                 |
| Glutamic acid     | 6.09                                    | 6.13                                 |
| Aspartic acid     | 4.85                                    | 4.65                                 |
| Taurine           | 0.15                                    | 0.13                                 |
| Hydroxyproline    | 0.28                                    | 0.21                                 |
| Total amino acids | 47.06                                   | 47.55                                |

<sup>1</sup>Each value represents the mean of duplicate analyses. <sup>2</sup>Conventional black soldier fly larvae meal (cBSFLM), as commercially available. <sup>3</sup>Fermented black soldier fly larvae meal (fBSFLM), conventional meal commercially acquired and subjected to a fermentation process.

**Table 4**

Fatty acid profile and organic acid contents (lactic, propionic, and acetic acids) of the black soldier fly larvae meals evaluated in the experiment (g/100g, as-fed basis) <sup>1</sup>.

| Fatty acids (FA, %)                    | Conventional meal<br>(cBSFLM) <sup>2</sup> | Fermented meal<br>(fBSFLM) <sup>3</sup> |
|----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Capric acid (C10:0)                    | 0.09                                       | 0.10                                    |
| Lauric acid (C12:0)                    | 4.12                                       | 4.41                                    |
| Myristic acid (C14:0)                  | 0.89                                       | 0.95                                    |
| Myristoleic acid (C14:1)               | 0.01                                       | 0.01                                    |
| Pentadecanoic acid (C15:0)             | 0.02                                       | 0.02                                    |
| Palmitic acid (C16:0)                  | 2.73                                       | 2.99                                    |
| Palmitoleic acid (C16:1n-7)            | 0.37                                       | 0.35                                    |
| Margaric acid (C17:0)                  | 0.05                                       | 0.04                                    |
| Stearic acid (C18:0)                   | 0.64                                       | 0.72                                    |
| Elaidic acid (C18:1n-9t)               | 0.02                                       | 0.02                                    |
| Oleic acid (C18:1n-9c)                 | 2.92                                       | 2.78                                    |
| Linoleic acid (LA) (C18:2n-6c)         | 2.17                                       | 0.84                                    |
| Gamma-linolenic acid (GLA) (C18:3n-6)  | 0.01                                       | 0.01                                    |
| Alpha-linolenic acid (ALA) (C18:3n-3)  | 0.12                                       | 0.03                                    |
| Arachidic acid (C20:0)                 | 0.05                                       | 0.06                                    |
| Cis-11-Eicoenoic acid (C20:1n-9)       | 0.01                                       | 0.01                                    |
| Heneicosanoic acid (C21:0)             | 0.02                                       | 0.02                                    |
| Cis-11,14- Eicosadienoic acid (C20:2)  | 0.01                                       | 0.01                                    |
| Arachidonic acid (AA) (C20:4n-6)       | 0.06                                       | 0.01                                    |
| Behenic acid (C22:0)                   | 0.04                                       | 0.04                                    |
| Eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5n-3) | 0.04                                       | 0.01                                    |

|                             |       |       |
|-----------------------------|-------|-------|
| Lignoceric acid (C24:0)     | 0.01  | 0.01  |
| Σ Monounsaturated FA (MUFA) | 3.33  | 3.17  |
| Σ Polyunsaturated FA (PUFA) | 2.41  | 0.89  |
| Σ Unsaturated FA            | 5.74  | 4.06  |
| Σ Saturated FA (SFA)        | 8.67  | 9.37  |
| Σ Trans FA                  | 0.02  | 0.02  |
| Σ Omega-3 FA (n-3)          | 0.16  | 0.03  |
| Σ Omega-6 FA (n-6)          | 2.24  | 0.85  |
| Σ Omega-9 FA (n-9)          | 2.96  | 2.81  |
| Lactic acid                 | 0.351 | 0.281 |
| Propionic acid              | 0.002 | 0.002 |
| Acetic acid                 | 0.155 | 1.060 |

979 <sup>1</sup>Each value represents the mean of duplicate analyses. <sup>2</sup>Conventional black soldier fly larvae  
 980 meal (cBSFLM), as commercially available. <sup>3</sup>Fermented black soldier fly larvae meal (fBSFLM),  
 981 conventional meal commercially acquired and subjected to a fermentation process. Fatty acids at  
 982 concentrations below the limit of quantification (<0.0003 g/100g) in both meals evaluated: Butyric  
 983 acid (C4:0), caproic acid (C6:0), caprylic acid (C8:0), nervonic acid (C24:1n-9), tridecanoic acid  
 984 (C13:0), 10-pentadecenoic acid (C15:1), cis-10-heptadecenoic acid (C17:1), linolelaidic acid  
 985 (C18:2n-6t), cis-11,14,17-eicosatrienoic acid (C20:3), and cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2).

**Table 5**

Performance, carcass and parts yield of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.

| Item                               | T1                 | T2                 | T3                 | SEM <sup>1</sup> | P-value |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|---------|
| 1 to 7 days of age                 |                    |                    |                    |                  |         |
| Feed intake (FI, kg/bird)          | 0,156              | 0,155              | 0,154              | 0,0013           | 0,5866  |
| Weight gain (WG, kg/bird)          | 0,142 <sup>b</sup> | 0,151 <sup>a</sup> | 0,144 <sup>b</sup> | 0,0014           | 0,0212  |
| Feed conversion ratio (FCR, kg/kg) | 1,10 <sup>c</sup>  | 1,02 <sup>a</sup>  | 1,06 <sup>b</sup>  | 0,0081           | 0,0002  |
| 1 to 14 days of age                |                    |                    |                    |                  |         |
| Feed intake (FI, kg/bird)          | 0,692              | 0,686              | 0,672              | 0,0046           | 0,1983  |
| Weight gain (WG, kg/bird)          | 0,521              | 0,540              | 0,521              | 0,0050           | 0,2007  |
| Feed conversion ratio (FCR, kg/kg) | 1,33 <sup>b</sup>  | 1,26 <sup>a</sup>  | 1,29 <sup>ab</sup> | 0,0090           | 0,011   |
| 1 to 21 days of age                |                    |                    |                    |                  |         |
| Feed intake (FI, kg/bird)          | 1,348              | 1,344              | 1,336              | 0,0086           | 0,8578  |
| Weight gain (WG, kg/bird)          | 1,042              | 1,095              | 1,089              | 0,0103           | 0,0629  |
| Feed conversion ratio (FCR, kg/kg) | 1,29 <sup>b</sup>  | 1,22 <sup>a</sup>  | 1,22 <sup>a</sup>  | 0,0083           | <0,0001 |
| 1 to 35 days of age                |                    |                    |                    |                  |         |
| Feed intake (FI, kg/bird)          | 3,633              | 3,610              | 3,585              | 0,0265           | 0,7280  |
| Weight gain (WG, kg/bird)          | 2,491              | 2,577              | 2,569              | 0,0323           | 0,6077  |
| Feed conversion ratio (FCR, kg/kg) | 1,46               | 1,40               | 1,40               | 0,0105           | 0,0703  |
| 1 to 42 days of age                |                    |                    |                    |                  |         |
| Feed intake (FI, kg/bird)          | 5,078              | 4,971              | 4,963              | 0,0361           | 0,3606  |
| Weight gain (WG, kg/bird)          | 3,502              | 3,438              | 3,537              | 0,3577           | 0,5339  |

|                                       |      |      |      |        |        |
|---------------------------------------|------|------|------|--------|--------|
| Feed conversion ratio (FCR,<br>kg/kg) | 1,45 | 1,44 | 1,40 | 0,0098 | 0,0999 |
|---------------------------------------|------|------|------|--------|--------|

## 42 days of age

|                                  |                    |                    |                     |        |        |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------|--------|
| Live weight (kg)                 | 3,521              | 3,536              | 3,594               | 0,0354 | 0,6879 |
| Carcass yield (%)                | 73,92              | 72,84              | 72,87               | 0,2017 | 0,0504 |
| Breast yield (%)                 | 41,46              | 41,78              | 42,19               | 0,2439 | 0,4897 |
| Thighs + drumsticks yield<br>(%) | 28,71 <sup>b</sup> | 30,59 <sup>a</sup> | 31,11 <sup>a</sup>  | 0,3850 | 0,0216 |
| Wings yield (%)                  | 10,58 <sup>b</sup> | 11,44 <sup>a</sup> | 10,85 <sup>ab</sup> | 0,1420 | 0,0347 |
| Abdominal fat (%)                | 1,11               | 1,25               | 1,05                | 0,1834 | 0,6208 |

991 <sup>1</sup> SEM: Standard error of the mean.

992 <sup>a,b,c</sup> Means within a row followed by distinct lowercase letters indicate a significant difference  
 993 among the evaluated treatments by the SNK test (P < 0.05).

**Table 6**

Mortality of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.

| Age (days)   | T1 | T2 | T3 | P- value |
|--------------|----|----|----|----------|
| 1 to 7 days  | 2  | 5  | 1  | 0.4605   |
| 1 to 14 days | 4  | 6  | 4  | 0.8508   |
| 1 to 21 days | 6  | 6  | 5  | 0.7754   |
| 1 a 35 days  | 8  | 7  | 8  | 0.9430   |
| 1 to 42 days | 9  | 12 | 10 | 0.7142   |

**Table 7**

Macroscopic intestinal evaluation of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis\*.

| Parameter          | Age (days) | T1     | T2     | T3     | Chi-square |
|--------------------|------------|--------|--------|--------|------------|
| Duodenum           |            |        |        |        |            |
| Reddened areas     | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000     |
|                    | 21         | 6      | 2      | 1      | 0.0970     |
|                    | 42         | 5      | 5      | 4      | 0.9311     |
|                    | Chi-square | 0.7630 | 0.2568 | 0.1797 |            |
| Presence of fibrin | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000     |
|                    | 21         | 2      | 5      | 3      | 0.4966     |
|                    | 42         | 0      | 2      | 0      | 1.0000     |
|                    | Chi-square | 1.000  | 0.2568 | 1.000  |            |
| Jejunum            |            |        |        |        |            |
| Reddened areas     | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000     |
|                    | 21         | 3      | 2      | 2      | 0.8669     |
|                    | 42         | 3      | 4      | 2      | 0.7165     |
|                    | Chi-square | 1.0000 | 0.4142 | 1.0000 |            |
| Presence of fibrin | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000     |
|                    | 21         | 2      | 10     | 6      | 0.0695     |
|                    | 42         | 0      | 1      | 0      | 1.0000     |
|                    | Chi-square | 1.0000 | 0.0067 | 1.0000 |            |
| Ileum              |            |        |        |        |            |
| Reddened areas     | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000     |
|                    | 21         | 3      | 3      | 1      | 0.5647     |
|                    | 42         | 6      | 3      | 3      | 0.4724     |

|                    |            |        |        |        |        |
|--------------------|------------|--------|--------|--------|--------|
|                    | Chi-square | 0.3173 | 1.000  | 0.3173 |        |
|                    | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000 |
|                    | 21         | 3      | 13     | 9      | 0.0478 |
| Presence of fibrin | 42         | 1      | 1      | 1      | 1.0000 |
|                    | Chi-square | 0.3173 | 0.0013 | 0.0114 |        |
| Cecum              |            |        |        |        |        |
|                    | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000 |
| Presence of        | 21         | 1      | 1      | 0      | 1.0000 |
| petechiae          | 42         | 2      | 0      | 0      | 1.0000 |
|                    | Chi-square | 0.5637 | 1.0000 | 1.0000 |        |
| Colon and rectum   |            |        |        |        |        |
|                    | 14         | 0      | 0      | 0      | 1.0000 |
|                    | 21         | 0      | 1      | 0      | 1.0000 |
| Presence of fibrin | 42         | 1      | 0      | 0      | 1.0000 |
|                    | Chi-square | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |

1003

---

\*Each value indicates the incidence in broilers, according to their respective treatment and age.

**Table 8**

Mean jejunal lesion score\* of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.

| Parameters                                             | Age (days) | T1                | T2                | T3                | Chi-square |
|--------------------------------------------------------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| Incidence of <i>Eimeria</i>                            | 14         | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 1.0000     |
|                                                        | 21         | 1.65 <sup>a</sup> | 2.00 <sup>a</sup> | 1.90 <sup>a</sup> | 0.5308     |
|                                                        | 42         | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 1.0000     |
|                                                        | P-value    | <0.0001           | <0.0001           | <0.0001           |            |
| Lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate <sup>1</sup> | 14         | 0.00 <sup>c</sup> | 0.00 <sup>c</sup> | 0.00 <sup>c</sup> | 1.0000     |
|                                                        | 21         | 2.00 <sup>a</sup> | 1.85 <sup>a</sup> | 2.05 <sup>a</sup> | 0.7197     |
|                                                        | 42         | 0.60 <sup>b</sup> | 0.30 <sup>b</sup> | 0.45 <sup>b</sup> | 0.6526     |
|                                                        | P-value    | <0.0001           | <0.0001           | <0.0001           |            |
| Necrosis                                               | 14         | 0.00 <sup>c</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>c</sup> | 1.0000     |
|                                                        | 21         | 1.75 <sup>a</sup> | 1.90 <sup>a</sup> | 1.90 <sup>a</sup> | 0.8655     |
|                                                        | 42         | 0.60 <sup>b</sup> | 0.20 <sup>b</sup> | 0.40 <sup>b</sup> | 0.4057     |
|                                                        | P-value    | <0.0001           | <0.0001           | <0.0001           |            |
| Hemorrhage                                             | 14         | 0.00              | 0.00              | 0.00              | 1.0000     |
|                                                        | 21         | 0.00              | 0.00              | 0.10              | 0.3679     |
|                                                        | 42         | 0.30              | 0.00              | 0.30              | 0.3546     |
|                                                        | P-value    | 0.1263            | 1.0000            | 0.5951            |            |
| Congestion                                             | 14         | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00              | 1.0000     |
|                                                        | 21         | 0.65 <sup>a</sup> | 0.60 <sup>a</sup> | 0.40              | 0.5404     |
|                                                        | 42         | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00 <sup>b</sup> | 0.00              | 1.0000     |
|                                                        | P-value    | 0.0071            | 0.0399            | 0.1263            |            |

\*Each value represents the mean score of 20 birds. <sup>1</sup>Lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate. Means within a column followed by different lowercase letters indicate a significant difference (P < 0.05) by the SNK test.

**Table 9**

Frequency of intestinal lesions in the jejunum of broilers at 21 days of age fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis\*.

| Parameters                                      | T1        | T2        | T3       | Chi-square |
|-------------------------------------------------|-----------|-----------|----------|------------|
| Incidence of <i>Eimeria</i>                     |           |           |          |            |
| Score 0                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)   | 1.0000     |
| Score 1                                         | 7 (39%)   | 4 (24%)   | 5 (28%)  | 0.6456     |
| Score 2                                         | 9 (50%)   | 9 (53%)   | 9 (50%)  | 1.0000     |
| Score 3                                         | 2 (11%)   | 4 (24%)   | 4 (22%)  | 0.6703     |
| LII (Lymphoplasmacytic Inflammatory Infiltrate) |           |           |          |            |
| Score 0                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)   | 1.0000     |
| Score 1                                         | 4 (22%)   | 6 (35%)   | 6 (33%)  | 0.7788     |
| Score 2                                         | 10 (56%)  | 8 (47%)   | 7 (39%)  | 0.7558     |
| Score 3                                         | 4 (22%)   | 3 (18%)   | 5 (28%)  | 0.7788     |
| Necrosis                                        |           |           |          |            |
| Score 0                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1 (6%)   | 1.0000     |
| Score 1                                         | 5 (28%)   | 6 (35%)   | 5 (28%)  | 0.9394     |
| Score 2                                         | 12 (67%)  | 8 (47%)   | 8 (44%)  | 0.5647     |
| Score 3                                         | 1 (6%)    | 3 (18%)   | 4 (22%)  | 0.4169     |
| Hemorrhage                                      |           |           |          |            |
| Score 0                                         | 18 (100%) | 17 (100%) | 17 (94%) | 0.9810     |
| Score 1                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1 (6%)   | 1.0000     |
| Score 2                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)   | 1.0000     |
| Score 3                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)   | 1.0000     |
| Congestion                                      |           |           |          |            |

|         |          |          |          |        |
|---------|----------|----------|----------|--------|
| Score 0 | 12 (67%) | 13 (76%) | 16 (89%) | 0.7283 |
| Score 1 | 1 (6%)   | 0 (0%)   | 0 (0%)   | 1.0000 |
| Score 2 | 5 (28%)  | 4 (24%)  | 1 (6%)   | 0.2725 |
| Score 3 | 0 (0%)   | 0 (0%)   | 1 (6%)   | 1.0000 |

1016 Scores: 0- absent, 1- mild, 2- moderate, 3- severe. \*Each value in the table represents the number of broilers  
 1017 that exhibited the respective lesion score, followed by its corresponding percentage.

**Table 10**

Frequency of intestinal lesions in the jejunum of broilers at 42 days of age fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis\*.

| Parameters                                      | T1        | T2        | T3        | Chi-square |
|-------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Incidence of <i>Eimeria</i>                     |           |           |           |            |
| Score 0                                         | 20 (100%) | 20 (100%) | 19 (100%) | 0.9832     |
| Score 1                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| Score 2                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| Score 3                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| LII (Lymphoplasmacytic Inflammatory Infiltrate) |           |           |           |            |
| Score 0                                         | 10 (50%)  | 14 (70%)  | 11 (58%)  | 0.6897     |
| Score 1                                         | 8 (40%)   | 6 (30%)   | 8 (42%)   | 0.8338     |
| Score 2                                         | 2 (10%)   | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| Score 3                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| Necrosis                                        |           |           |           |            |
| Score 0                                         | 10 (50%)  | 16 (80%)  | 12 (63%)  | 0.4786     |
| Score 1                                         | 8 (40%)   | 4 (20%)   | 7 (37%)   | 0.5045     |
| Score 2                                         | 2 (10%)   | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| Score 3                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| Hemorrhage                                      |           |           |           |            |
| Score 0                                         | 17 (85%)  | 19 (95%)  | 17 (89%)  | 0.9273     |
| Score 1                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |
| Score 2                                         | 3 (15%)   | 0 (0%)    | 2 (11%)   | 0.6547     |
| Score 3                                         | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 0 (0%)    | 1.0000     |

Scores: 0- absent, 1- mild, 2- moderate, 3- severe. \*Each value in the table represents the number of broilers that exhibited the respective lesion score, followed by its corresponding percentage

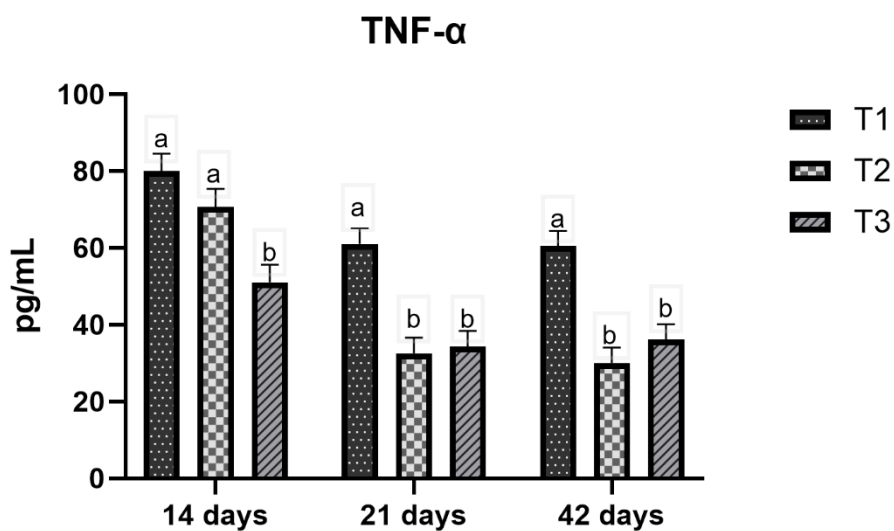
**Table 11**

Jejunal histomorphometry of broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and conventional (T2) or fermented (T3) black soldier fly larvae meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.

| Item           | T1      | T2     | T3      | SEM     | P-value |
|----------------|---------|--------|---------|---------|---------|
| 14 days of age |         |        |         |         |         |
| VH (µm)        | 597.49  | 667.85 | 620.83  | 27.4856 | 0.5623  |
| VW (µm)        | 165.74  | 165.43 | 128.48  | 7.4573  | 0.0774  |
| CD (µm)        | 94.87   | 101.45 | 93.04   | 4.4104  | 0.7409  |
| CW (µm)        | 49.67   | 50.05  | 47.51   | 1.3238  | 0.7517  |
| 21 days of age |         |        |         |         |         |
| VH (µm)        | 676.49  | 703.73 | 734.82  | 16.1968 | 0.3509  |
| VW (µm)        | 68.57   | 71.36  | 74.87   | 1.6903  | 0.2442  |
| CD (µm)        | 110.06  | 115.21 | 132.95  | 5.1251  | 0.2337  |
| CW (µm)        | 48.95   | 50.98  | 49.93   | 0.6012  | 0.3992  |
| 42 days of age |         |        |         |         |         |
| VH (µm)        | 1007.68 | 931.64 | 1018.37 | 22.5336 | 0.2367  |
| VW (µm)        | 75.92   | 75.93  | 78.30   | 1.1714  | 0.6485  |
| CD (µm)        | 91.29   | 92.41  | 85.67   | 1.9090  | 0.3131  |
| CW (µm)        | 43.56   | 40.45  | 43.05   | 0.7808  | 0.2246  |

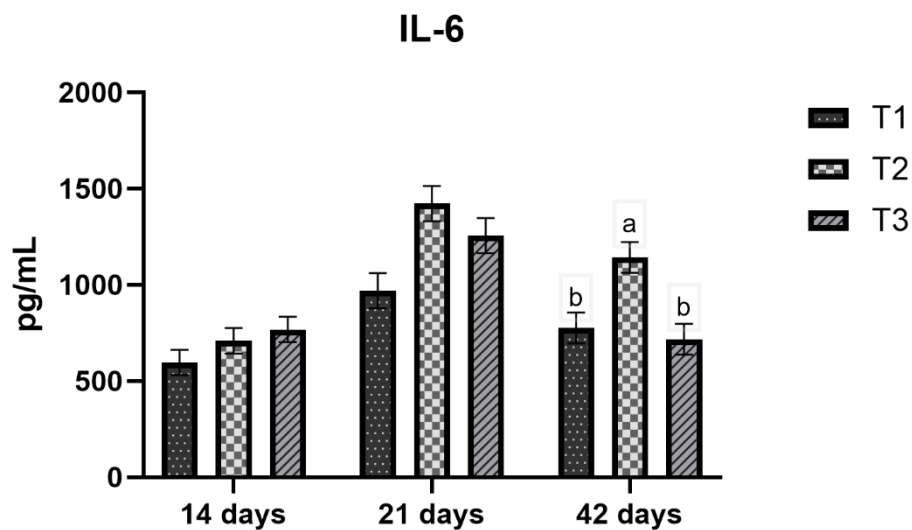
VH = villus height, VW = villus width, CD = crypt depth, CW = crypt width.

**Figure 1.** Blood TNF- $\alpha$  levels in broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and either conventional (T2) or fermented (T3) insect meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.



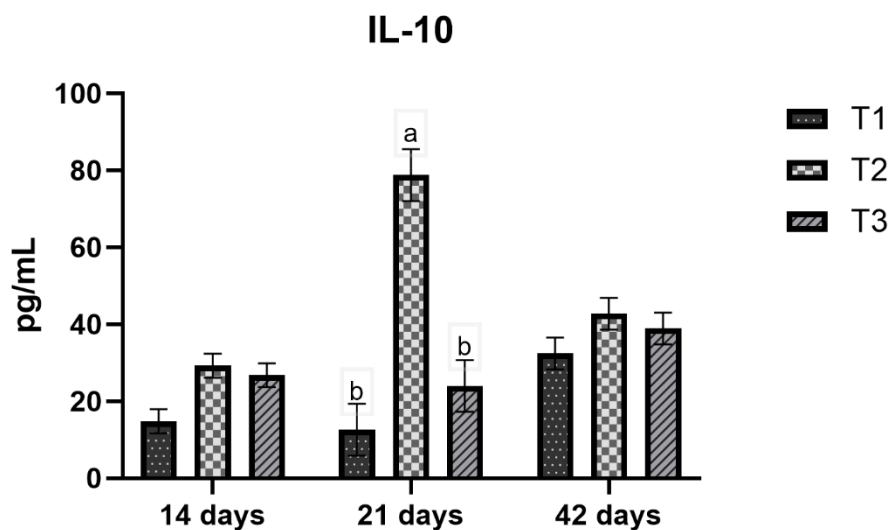
Means followed by different lowercase letters in the row indicate significant differences among treatments, according to the SNK test at a 5% probability level.

**Figure 2.** Blood IL-6 levels in broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and either conventional (T2) or fermented (T3) insect meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.



Means followed by different lowercase letters in the row indicate significant differences among treatments, according to the SNK test at a 5% probability level.

**Figure 3.** Blood IL-10 levels in broilers fed a basal diet (T1) or a basal diet supplemented with *Bacillus velezensis* BV01 and either conventional (T2) or fermented (T3) insect meal, challenged with subclinical necrotic enteritis.



Means followed by different lowercase letters in the row indicate significant differences among treatments, according to the SNK test at a 5% probability level.