



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Valorização nutricional da carne de frangos alimentados com dietas
contendo *Arthrospira platensis* e aditivadas com enzimas exógenas**

Helena Maria Marques Lopes Moreira Santos

Constituição do Júri

Doutor Rui José Branquinho de Bessa
Doutor Carlos Mendes Godinho de
Andrade Fontes
Doutor Mário Alexandre Gonçalves
Quaresma

Orientador

Doutor Carlos Mendes Godinho de
Andrade Fontes

Coorientador

Doutor José António Mestre Prates

2019

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Valorização nutricional da carne de frangos alimentados com dietas
contendo *Arthrospira platensis* e aditivadas com enzimas exógenas**

Helena Maria Marques Lopes Moreira Santos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

Constituição do Júri

Doutor Rui José Branquinho de Bessa
Doutor Carlos Mendes Godinho de
Andrade Fontes
Doutor Mário Alexandre Gonçalves
Quaresma

Orientador

Doutor Carlos Mendes Godinho de
Andrade Fontes

Coorientador

Doutor José António Mestre Prates

2019

LISBOA

DECLARAÇÃO

Nome _____

Endereço electrónico _____ Telefone _____ / _____

Número do Bilhete de Identidade _____

Título: Dissertação ☐ Tese ☐

Orientador(es)

_____ Ano de conclusão _____

Designação do Mestrado ou do ramo de conhecimento do Doutoramento

Nos exemplares das teses de doutoramento ou dissertações de mestrado entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito legal na Biblioteca Nacional e pelo menos outro para a Biblioteca da FMV/UTL deve constar uma das seguintes declarações:

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa, ____/____/____

Assinatura: _____

À minha família

Agradecimentos

Começo por agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Mendes Godinho de Andrade Fontes, por ter aceite ser meu orientador, pelo seu apoio e disponibilidade prestados além dos conhecimentos transmitidos. O meu muito obrigado!

Ao Professor Doutor José António Mestre Prates, por ter aceite ser meu coorientador, pela sua simpatia, compreensão pela disponibilidade na utilização do laboratório de Bioquímica, pelos seus ensinamentos e conselhos.

Ao colega de Mestrado Breno Puerta, pela sua simpatia, disponibilidade e toda a ajuda prestada ao longo do ensaio.

À Teresa Ribeiro pela sua amizade, simpatia, disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos e ajuda.

À D. Paula por todo o apoio, incentivo e ajuda nos momentos mais frágeis.

À Doutora Cristina Alfaia, pelas suas explicações de funcionamento do laboratório da Bioquímica, pelos seus ensinamentos de diversas técnicas, pela sua disponibilidade.

À D. Ana por toda a sua ajuda em garantir o bom funcionamento do laboratório e pelo seu esforço em garantir a “logística” para a realização das minhas análises.

A todo o grupo da Bioquímica nomeadamente, Paula, Marta, Zé, Diogo pela simpatia, disponibilidade e troca de conhecimentos.

À Sandra pela ajuda na parte final do “embelezamento” do trabalho.

Ao Instituto Superior de Agronomia, em particular à Professora Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo Redford, à Engenheira Cátia e Engenheiro David pela simpatia, disponibilidade durante o ensaio dos frangos.

E por último, mas não menos importante, à minha família:

À minha adorada filha e musa inspiradora Madalena e ao meu querido sobrinho Miguel, por me lembrarem sempre aquilo que é realmente importante, pelos vossos sorrisos, pelo olhar e por todos os beijinhos e abraços.

Aos meus queridos pais, e irmã, o meu agradecimento por todos os valores, pelo apoio incondicional, pelo amor, pela partilha, pela confiança, e por me terem feito a pessoa que sou hoje.

Ao Álvaro pelo apoio, amor, amizade, paciência e motivação.

A todos o meu muito bem hajam!

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da incorporação da microalga *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), com ou sem suplementação enzimática no desempenho produtivo de frangos e na composição em ácidos gordos, Vitamina E, carotenoides da carne. Neste estudo realizou-se um ensaio de crescimento onde 120 pintos do dia, machos, da estirpe Ross 308, foram distribuídos por 40 gaiolas e alimentados nos primeiros 21 dias com uma dieta de iniciação comum. Ao vigésimo primeiro dia as gaiolas foram aleatoriamente alocadas a um de quatro tratamentos em que a dieta controlo (CONT), à base de milho e bagaço de soja, foi adicionalmente suplementada com 15% *Spirulina* sem adição de enzimas (MA), com 15% *Spirulina* e 0.05% de Rovabio® (MAR) e com 15% *Spirulina* e 0.1% de lisozima (MAL). Os frangos foram abatidos ao 35º dia, e a coxa e o peito de um frango por gaiola foi utilizado para a análise de lípidos totais, ácidos gordos, vitamina E, carotenos, colesterol e oxidação lipídica pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). Os resultados indicam que a inclusão de 15% de *Spirulina* suplementada com lisozima (MAL) durante os últimos 15 dias de vida dos frangos reduziu o crescimento em relação ao controlo e que a inclusão de *Spirulina* (MA) ou *Spirulina* com Rovabio® (MAR) apresentaram crescimentos intermédios entre o controlo e MAL. A inclusão de *Spirulina* nas dietas, com ou sem adição de enzimas, aumentou a proporção do somatório de ácidos gordos saturados (SFA), reduziu o somatório dos ácidos gordos polinsaturados da família ómega-3 (n-3 PUFA) e o teor de α - e γ -tocoferol na carne de peito e da coxa, afetando negativamente as razões de n-6/n-3 PUFA e de PUFA/SFA. O teor de carotenoides e de TBA não foram afetados pelos tratamentos. Concluindo, a incorporação de 15% de *Spirulina*, com ou sem adição de enzimas exógenas, na dieta de acabamento de frangos de carne não melhorou o desempenho produtivo e afetou negativamente a qualidade nutricional da carne.

Palavras-chave: milho, soja, frangos de carne, lisozima, Rovabio, *Arthrospira platensis*

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of incorporation of the *Spirulina* microalgae (*Arthrospira platensis*) with or without enzymatic supplementation on the productive performance of broilers and meat fatty acid composition, Vitamin E, and carotenoids. In this study, a growth assay was performed where 120 male chicks of the Ross 308 strain were distributed over 40 cages and fed in the first 21 days on a standard starter diet. On the twenty-first day, the cages were randomly assigned to one of the four treatments in which the control (CONT) diet based on corn and soybean meal was additionally supplemented with 15% *Spirulina* without addition of enzymes (MA), with 15% *Spirulina* and 0.05% Rovabio® (MAR), and with 15% *Spirulina* and 0.1% lysozyme (MAL). The broilers were slaughtered on the 35th day and the thigh and chest of a chicken per cage was used for the analysis of total lipids, fatty acids, vitamin E, carotenoids, cholesterol and lipid oxidation. The results indicate that the inclusion of 15% *Spirulina* supplemented with lysozyme (MAL) during the last 15 days of broiler life reduced growth over control and that the inclusion of *Spirulina* (MA) or *Spirulina* with Rovabio® (MAR) showed intermediate growths between the Control and MAL. The inclusion of *Spirulina* in diets, such as or without addition of enzymes, increased the proportion of saturated fatty acids (SFA), reduced the sum of the polyunsaturated fatty acids of the omega-3 family (n-3 PUFA) and the α and γ -tocopherol contents in meat breast and thigh, negatively affecting the n-6 / n-3 PUFA and PUFA / SFA ratios. The carotenoid contents and TBA values were not affected by the dietary treatments. In conclusion, the incorporation of 15% *Spirulina*, with or without the addition of exogenous enzymes, in the broiler finishing diet did not improve the productive performance and negatively affected the nutritional quality of meat.

Keywords: corn, soy, broilers, lysozyme, Rovabio, *Arthrospira platensis*

Extended abstract

At the global level, human consumption of poultry meat has been increasing in recent years. This increase is due to the more salubrious characteristics of poultry meat and the more competitive price for consumers compared to other meats.

Plant cell walls are complex structures. The main constituents are the non-starch polysaccharides (NSP). The monogastric animals does not produce enzymes capable of degrading these structural polysaccharides and without exogenous enzymes a lower level of cereals may be used.

Although maize is considered an important source of energy and soya an important source of protein, the use of enzymes may still help improve performance.

The objective of the present study was to determine the effect of different enzymatic supplements on maize and soybean meal diets. Although they contain some non-starch polysaccharides, leading to an increase in the viscosity of the digestive contents and may even reduce the zootechnical indexes of broilers, they are considered foods of low viscosity and high quality. Thus, enzymatic supplementation may attenuate these effects. In this study, a growth assay was performed, where 120 male chicks of the Ross strain were distributed over 40 cages and fed in the first 21 days on a standard starter diet. On the twenty first day, the cages were randomly assigned to one of the four treatments, in which the control (CONT) diet based on corn and soybean meal was additionally supplemented with 15% Spirulina without addition of enzymes (MA), with 15% Spirulina and 0,005% Rovabio® (MAR), and with 15% Spirulina and 0,1% lysozyme (MAL). The amount of food ingested, live weight, average weight gain dimensions of organs of the digestive system and mortality were recorded. The broilers were slaughtered on the 35th day and the thigh and chest of a chicken per cage was used for the analysis of total lipids, fatty acids, vitamin E, carotenoids, cholesterol and lipid oxidation.

The results indicate that the inclusion of 15% Spirulina supplemented with lysozyme (MAL) during the last 15 days of broiler life reduced growth over control and that the inclusion of Spirulina (MA) or Spirulina with Rovabio® (MAR) showed intermediate growths between the Control and MAL. The inclusion of Spirulina in diets, such as or without addition of enzymes, increased the proportion of saturated fatty acids (SFA), reduced the sum of the polyunsaturated fatty acids of the omega 3 family (n-3 PUFA) and the α - and γ -tocopherol contents in meat breast and thigh, negatively affecting the n-6/n-3 PUFA and PUFA/SFA ratios. The carotenoid contents and TBA values were not affected by the dietary treatment. In conclusion, the incorporation of 15% Spirulina, with or without the addition of exogenous enzymes, in the broiler finishing diet did not improve the productive performance and negatively affected the nutritional quality of meat.

The use of Spirulina microalgae may be one of the best alternatives of supplementing broilers diet, than traditional fish products that will greatly affect the quality of the meat as well as its flavor

The data confirm that microalgae are a viable food for diets of monogastric animals and may contribute a significant proportion of bioactive compounds that contribute to positively modulate the quality of chicken meat. More studies should be done with diets supplemented with microalgae because they are very important in the various trophic chains, besides a natural marine resource, and have several applications in different areas. However, their production costs are still relatively high at present, and it is extremely important to develop appropriate technologies to improve their use.

Lista de Figuras

Figura 1- Etapas da produção de frango de carne.....	2
Figura 2- Soja e milho em grão.....	6
Figura 3- Estrutura química da celulose.....	7
Figura 4- Estrutura química do β -glucano.....	7
Figura 5- Estrutura química do arabinoxilano.....	8
Figura 6- Frango alimentado com a microalga, Spirulina. (<i>Arthospira platensis</i> .).....	19
Figura 7- Aspeto da sala onde decorreu o ensaio.....	21
Figura 8- Aspeto do bebedouro	22
Figura 9- Aspeto do comedouro	22
Figura 10- Distribuição dos tratamentos pela sala.....	23
Figura 11- Aspeto das quatro dietas testadas neste ensaio.....	24
Figura 12- Exemplo da atividade enzimática basal do alimento, tendo o β -glucano (esquerda) e a lisozima (direita) como substratos.....	37
Figura 13- Exemplo da técnica utilizada para avaliar a atividade enzimática (xilanásica, glucanásica e da lisozima) nos conteúdos digestivos dos animais.....	37

Lista de Quadros

Quadro 1 - Produção, consumo e taxa de autossuficiência de carne de aves na EU (2015), em toneladas.	3
Quadro 2 - Projeção do aumento da produção e consumo da carne de aves na EU entre 2015 e 2025 em toneladas.....	4
Quadro 3 - Tipo e nível de polissacáridos não-amiláceos nos grãos do milho, soja e cevada, em % MS.....	9
Quadro 4 - Ingredientes utilizados na formulação das dietas, expressos em kg.....	25
Quadro 5 – Composição em ácidos gordos (% ácidos gordos totais) das dietas experimentais usadas para alimentação dos frangos em crescimento.....	31
Quadro 6 – Efeito das dietas no teor de β -caroteno e vitamina E nas dietas experimentais ($\mu\text{g/g}$).....	32
Quadro 7 - Avaliação da atividade xilanásica dos conteúdos digestivos.	35
Quadro 8 - Avaliação da atividade glucanásica nas amostras dos conteúdos Digestivos.....	36
Quadro 9 –Avaliação da atividade da lisozima nas amostras dos conteúdos digestivos..	36
Quadro 10 Efeito da dieta no período experimental, na evolução do peso (g), de frangos alimentados com dietas contendo microalgas e suplementadas com diferentes misturas enzimáticas.	38
Quadro 11 - Teor de lípidos totais (g/100g de carne), e composição em ácidos (% ácidos gordos totais) do peito de frango.....	40
Quadro 12 - Teor de lípidos totais (g/100g de carne), e composição em ácidos (% ácidos gordos totais) da coxa de frango	42
Quadro 13 - Efeito do regime no teor de colesterol e vitamina E no peito de Frango (mg/g) e ($\mu\text{g/g}$).....	43
Quadro 14 - Efeito do regime no teor de colesterol e vitamina E na coxa de Frango (mg/g) e ($\mu\text{g/g}$).....	43
Quadro 15 - Efeito do tratamento nos carotenoides do peito de frango, (mg/g).....	44
Quadro 16 - Efeito do tratamento nos carotenoides da coxa de frango, (mg/g).....	45
Quadro 17 - Efeito do regime no TBA no peito (mg MDA/kg carne).....	45
Quadro 18 - Efeito do regime no TBA na coxa (mg MDA/kg carne).....	45

Lista de abreviaturas

AGT- ácidos gordos totais
ARA- ácido araquidónico
BHT- hidroxitolueno butilado
CAZymes- enzimas degradadoras de hidratos de carbono
cm- centímetros
C- *Clostridium*
Cont- dieta controlo - (regime alimentar à base de milho e bagaço soja)
DCV- doenças cardiovasculares
DHA- ácido docosahexaenóico
DPA- ácido docosapentaenóico
E.coli- *Escherichia coli*
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
EPA- ácido eicosapentaenóico
EU- União Europeia
FAME- ésteres metílicos de ácidos gordos
FAO- Organização das Nações Unidas para a alimentação e a agricultura
GC- cromatografia gasosa
g- gramas
°C - graus centígrados
h- horas
HCl- ácido clorídrico
HDL- lipoproteínas de elevada densidade
H₂O- água
hPa-hectopascal (unidade de pressão)
HPLC- cromatografia líquida de alta resolução
IC- índice de conversão
kg- quilogramas
KOH- hidróxido de potássio
LA- ácido linoleico (18:2 *n*-6)
LDL- lipoproteínas de baixa densidade
LNA- ácido alfa-linolénico (18:3 *n*-3)
m- metros
mM- milimolar
M- molar
MA- regime alimentar controlo mais 15 % de microalga Spirulina
MAL- regime alimentar controlo mais 15 % de microalga Spirulina, mais lisozima
MAR- regime alimentar controlo mais 15 % de microalga Spirulina, mais enzima comercial Rovabio Excel AP
MDA- malondialdeído
MS- matéria seca
min.- minutos
ml- mililitros
MUFA- ácidos gordos monoinsaturados
NaCl- cloreto de sódio

nm-nanómetros
n-3- ómega 3
n-6- ómega 6
OCDE- Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico
PNA- polissacáridos não amiláceos
p/v- razão peso volume
PV- peso vivo
PUFA- ácido gordo polinsaturado
r.p.m.- rotações por minuto
r.c.f.- força centrífuga relativa
SFA- ácidos gordos saturados
W-watts
TBA- ácido 2-tiobarbitúrico
TCA- ácido tricloroacético
Tris- tris(hidroximetil)aminometano
UV- ultravioleta
µl- microlitros

Índice geral

Agradecimentos.

Abstract.

Lista de figuras.....VII

Lista de quadros.....VIII

Lista de abreviaturas.....IX

1 – Introdução.....1

2 - Revisão bibliográfica.....2

2.1 - Produção e qualidade da carne de frango.....2

2.1.2 - Alimentação dos frangos.....4

2.2 - Suplementação da dieta de frangos com enzimas.....9

2.3 - Composição da carne de frango em ácidos gordos.....12

2.4 - Composição da carne de frango em antioxidantes.....15

2.5 - Utilização de microalgas na alimentação de frangos.....18

2.6 - Objetivos do trabalho.....20

3 - Material e métodos.....21

3.1 - Delineamento experimental e preparação das dietas.....21

3.2 - Atividade enzimática dos conteúdos digestivos e dos regimes alimentares.....26

3.3 - Determinação dos lípidos totais.....27

3.4 - Determinação do perfil de ácidos gordos.....29

3.5 - Determinação do teor em colesterol total e vitamina E.....32

3.6 - Determinação do teor em carotenoides totais.....33

3.7 - Determinação da oxidação lipídica na carne.....34

3.8 - Análise estatística.....34

4- Resultados.....34

4.1 - Avaliação da atividade enzimática dos conteúdos digestivos e dos regimes alimentares.....35

4.2 - Performances zootécnicas.....38

4.3 - Qualidade nutricional dos lípidos da carne.....38

4.3.1 - Lípidos totais.....38

4.3.2 – Ácidos gordos.....38

4.3.3 - Teor em colesterol total e vitamina E.....	43
4.3.4 - Teor total de carotenoides.....	44
4.3.5 - Avaliação da oxidação lipídica da carne.....	45
Discussão.....	46
Conclusão.....	53
Referências bibliográficas.....	54
Anexo (ficha técnica da Spirulina).....	55

1 - INTRODUÇÃO

A nível global, o consumo humano de carne de frango tem vindo a aumentar nos últimos anos. Embora vários fatores possam contribuir para este fenómeno, são de destacar, a qualidade nutricional da carne de aves e o preço muito competitivo da carne de frango para os consumidores, em comparação com outras carnes. O aumento do consumo de carne de frango tem sido assim, acompanhado por uma diminuição na ingestão de carnes vermelhas, cuja ingestão tem sido associada á ocorrência de doenças cardiovasculares e a alguns tipos de cancro (WHO, 2004). Genericamente a carne de frango, mas principalmente o peito, é uma carne magra com baixo conteúdo de gordura intramuscular (Palmquist, 2009). A gordura intramuscular é um dos principais determinantes da qualidade da carne, afetando, igualmente a qualidade sensorial da carne (Chizzolini *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). As características da carne com maior influência sensorial são o sabor, suculência, a tenrura e a aparência geral (Oddy *et al.*, 2001). Encontra-se hoje extensamente documentado que os traços sensoriais da carne são de extrema importância para a sua aceitabilidade por parte dos consumidores (Guo-Bin *et al.*, 2010).

Atualmente, os sistemas de alimentação de aves estão baseados no fornecimento de dietas à base de cereais. Alguns cereais contêm, glúcidos complexos, solúveis e não digeríveis pelas enzimas endógenas, que apresentam uma ação antinutricional na alimentação. Na avicultura para atenuar os efeitos negativos associados com a presença dos glúcidos solúveis, recorre-se à adição de enzimas, o potencial dos biocatalisadores exógenos para melhorar o valor nutritivo de outras matérias-primas, como sejam as microalgas, continua por se conhecer.

O impacto de novos produtos derivados de algas no desempenho produtivo dos frangos e na qualidade da carne permanece, todavia, por ser estabelecida.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Produção e qualidade da carne de frango

Na segunda metade do século XX houve um crescimento marcado da indústria avícola que adotou um modo de produção especializado, que passou a recorrer a elevados *inputs* tecnológico. Estes desenvolvimentos permitiram que a carne de frango passasse a ser muito apreciada na alimentação humana, tanto pelas suas características nutritivas como pelo seu baixo custo (Field, 2004).

O aumento do dinamismo da indústria avícola tem de facto duas facetas, por um lado, do ponto de vista técnico, a aplicação da seleção genética, da melhoria da nutrição e alimentação, da sanidade animal, juntamente com uma boa gestão empresarial permitiriam desenvolver um produto de elevada qualidade (figura 1). Por outro, podemos explicar este crescimento através do consumidor, que procura produtos seguros e saudáveis e oferecidos a um baixo preço (Carbó, 1995). Assim, com base nestes dois aspetos, que compreendem uma componente qualitativa relacionada com o conteúdo proteico de elevada qualidade e facilmente digerível, da carne e um teor de gordura e colesterol mais baixos do que as carnes vermelhas (Field, 2004), e por outro uma otimização das técnicas produtivas que resultaram numa diminuição do índice de conversão alimentar (IC), fazendo diminuir o custo unitário e promover a rapidez do ciclo biológico, foi possível aumentar a oferta da carne de frango conduzindo a um rápido crescimento deste sector.

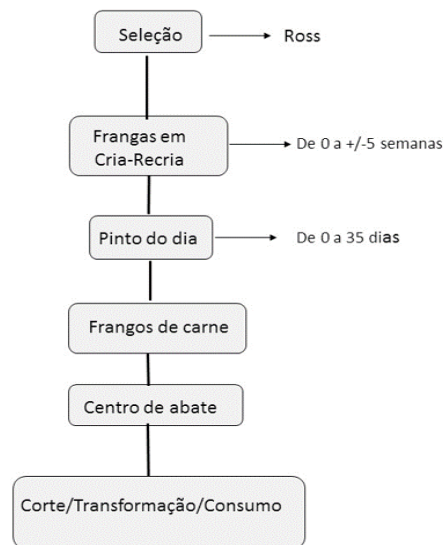


Figura 1-Etapas da produção de frango de carne. (Adaptado de Field, 2004).

Em 2015, os 28 países membros da EU contribuíram com 15,7% para a produção global de carne tendo produzido 12,0% da produção mundial de carne de frango.

Em 2015, os países membros da EU apresentaram um excedente de produção de carne em relação ao consumo de cerca de 44,9 milhões de toneladas, que resultou numa taxa de autossuficiência de 113%. No quadro 1, apresenta-se o perfil de produção da EU, consumo *per capita* e taxa de autossuficiência para os vários tipos de carne. Enquanto a produção e o consumo foram bastante equilibrados na carne de bovino, a carne de suíno apresentou uma taxa de autossuficiência de 110 % e a carne de aves de capoeira de 104,4%. Comparando o consumo per capita constatamos que a carne suína é ainda a preferida pelos consumidores, com 41,9 kg /pessoa/ano contra os 22,5 kg de carne de aves de capoeira (OCDE, 2016). Esta análise revela que a EU revela simultaneamente elevadas taxas de consumo e de produção, sendo capaz de satisfazer as necessidades de consumo e criar ligeiros excedentes. (OCDE, 2016).

Quadro 1-Produção, consumo e taxa de autossuficiência de carne de aves na EU (2015), em milhões toneladas. Fonte OCDE, (2016).

Tipo de carne	Produção (milhões ton.)	Consumo (milhões ton.)	Consumo per capita (kg)	Taxa de autossuficiência (_%_)
Carne de bovino	7,929	7,924	15,5	100,1
Carne de suíno	23,365	21,290	41,9	110,0
Carne de frango	13,614	13,036	22,5	104,4
Total de carne	44,908	42,250	87,3	113,2

Estima-se que a produção de carne de aves na EU aumente 5,3% e que o consumo aumente em 5,1% respetivamente entre 2015 e 2025. Estas variações permitirão que se continuem a acumular de forma crescente excedentes comerciais, que se estimam irão passar de 569.000 toneladas em 2015 para 631.000 toneladas em 2025 (quadro 2).

Em contraste com o desenvolvimento na EU, estima-se que a produção e o consumo global de carne de aves crescerão cerca de 16,2% e 16,6% até 2025, respetivamente (OCDE-FAO 2016-2025). A produção global de carne de aves alcançará um volume de 131,3 milhões de toneladas, ultrapassando assim a produção de carne de suíno, com um volume de produção de 131,0 milhões de toneladas. Este crescimento da produção de carne de aves deve-se principalmente ao rápido aumento da produção e consumo em vários países menos desenvolvidos. (OCDE, 2016)

Quadro 2-Projeção do aumento da produção e consumo da carne de aves na EU entre 2015 e 2025 em milhões toneladas. Fonte: OCDE-FAO 2016-2025.

Ano	Produção (milhões ton.)	Consumo (milhões ton.)	Consumo per capita (kg)	Excedente de exportação
2015	13,605	13,036	22,7	569
2017	13,921	13,512	23,5	410
2019	13,952	13,553	24,5	398
2021	13,074	13,605	23,6	469
2023	14,208	13,658	23,6	530
2025	14,327	13,696	23,7	631
Aumento	+ 5,3	+ 5,1	+ 4,4	+ 10,9

2.1.2 - Alimentação dos frangos

Os sistemas de produção de carne de aves desenvolvem-se com um elevado grau de intensificação, caracterizando-se por elevados níveis de produtividade e eficiência, em grande parte devido aos vários avanços no sector da alimentação. A alimentação é o fator de produção mais relevante em sistemas de produção de aves, já que representa 65 a 85 % dos custos totais, dependendo dos ingredientes utilizados e dos seus preços de mercado (Mountney, 1988; Ravindran, 2012). Assim, existe uma pesquisa constante para satisfazer as exigências nutricionais dos animais, ao menor custo. Esta necessidade surge como uma prioridade no sentido de melhorar a eficácia do sector e conduzir a uma intensificação da produção (Larbier *et al.*, 1991).

Os grãos de cereais são os principais ingredientes das dietas para aves devido às suas propriedades nutricionais, sendo a mais importante o seu elevado teor energético

(Verstegen, 2009). Por outro lado, de uma forma geral, são deficitários em vitaminas e minerais (Mateos *et al.*, 2010).

Os níveis proteicos dos cereais são, no entanto, geralmente inferiores às necessidades dos animais, verificando-se ainda um déficit de alguns aminoácidos essenciais como a lisina e metionina (McDonald *et al.*, 2002), o que limita a sua utilização e torna necessário o uso de outros ingredientes como fonte de proteína.

Dentro dos cereais o milho (*Zea mays*) é o cereal por excelência para a alimentação das dietas das aves domésticas, na maior parte dos países ocidentais, uma vez que o seu valor energético é dos mais elevados entre os cereais e é produzido em extensas áreas à escala global (Labier *et al.*, 1991). O milho é também apreciado pela sua elevada palatibilidade, reduzida variabilidade na composição química e baixo teor em fatores antinutritivos.

A soja (*Glycine max*), nomeadamente o bagaço de soja, é a matéria prima mais utilizada para complementar a escassez proteica revelada pelo milho e os cereais. O seu uso como fonte de proteína é muito importante, já que o valor nutritivo da proteína da soja devido às quantidades significativas da maioria dos aminoácidos essenciais que contém que muitas vezes faltam nos grãos de cereais (McDonald *et al.*, 2002).

Conforme referido anteriormente, a soja é frequentemente usada como fonte de proteína sob a forma de bagaço de soja, o qual é considerado como uma das melhores fontes de proteína de origem vegetal disponíveis para alimentação animal, devido à composição equilibrada em aminoácidos essenciais e ao seu baixo teor de fatores antinutritivos. Sendo assim, o milho e o bagaço de soja são as duas matérias-primas mais frequentemente incorporadas em dietas para aves, que, permitem obter um teor energético e proteico equilibrado à satisfação das necessidades nutritivas dos animais e produzem ótimos resultados. Devido às qualidades anteriormente enunciadas, são consideradas matérias primas de boa qualidade, e são muito utilizados na formulação de alimentos para frangos ao longo de todo o ciclo produtivo (figura 2).

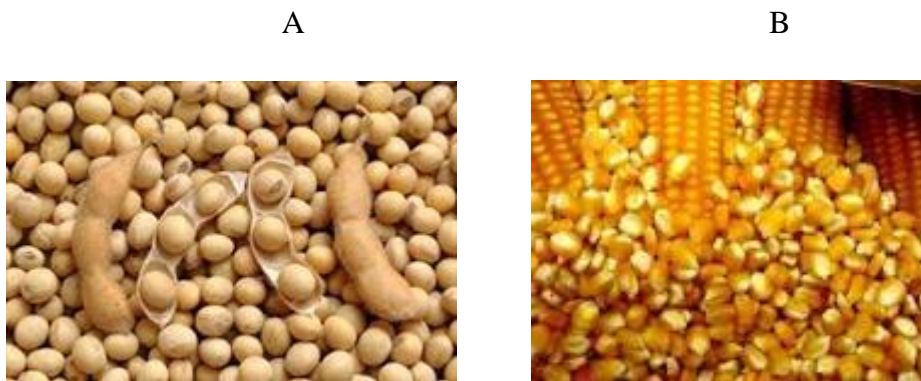


Figura 2-Soja (A) e milho (B) em grão.

Os cereais em geral possuem uma quantidade significativa de polissacáridos-não amiláceos (PNA), que apresentam uma função celular eminentemente estrutural. Estes encontram-se normalmente ao nível da parede celular vegetal, sendo os mais importantes a celulose e as hemiceluloses.

O aparelho digestivo dos animais monogástricos não consegue digerir os hidratos de carbono estruturais de forma autónoma, pois não produz o repertório de enzimas necessário à quebra das suas ligações. Embora a sua função estrutural resulte da rigidez e insolubilidade genericamente apresentada pelos PNAs, alguns destes são facilmente solubilizados, sendo que destes os mais importantes são os arabinoxilanos e os β -glucanos (Choct, 1997).

Os PNAs classificam-se de acordo com os monossacáridos presentes na sua constituição, e pela configuração (α ou β) das suas ligações glicosídicas. As hexoses como a D-glucose, D-galactose e D-manose assim como a L-arabinose e D-xilose são os monossacáridos que normalmente se encontram nas paredes das células vegetais dos cereais. A estrutura dos PNAs é o principal fator que condiciona a sua solubilidade em água e são os PNAs solúveis que constituem os principais fatores antinutritivos dos cereais, para os monogástricos (Teixeira, 2013).

A celulose é o biopolímero mais abundante da Terra e está presente de 35 a 50 % na célula da planta (Paloheimo *et al.*, 2010). É insolúvel em água graças à sua estrutura ordenada, constituída por regiões cristalinas e outras amorfas. As zonas cristalinas resultam do alinhamento paralelo das moléculas de celulose, ligadas umas às outras por pontes de hidrogénio. Nas zonas amorfas não se verifica a mesma organização (Choct, 1997; Paloheimo *et al.*, 2010), permitindo uma facilidade maior na quebra destas ligações comparativamente às regiões cristalinas.

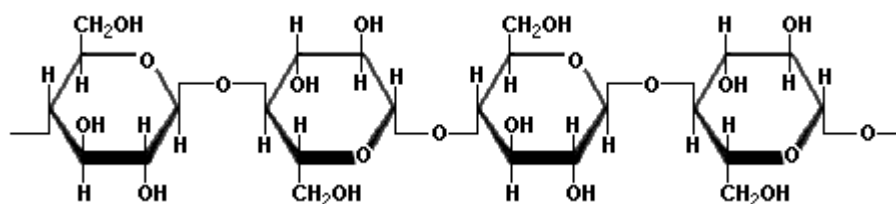


Figura 3-Estrutura química da celulose. Polímero linear constituído por resíduos de glucose unidos por ligações β (1,4).

(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>)

Dos PNAs antinutritivos, o β -glucano encontra-se na maioria dos cereais, mas é na cevada e na aveia que os teores são mais elevados (Marquardt *et al.*, 1996). A sua estrutura é bastante simples e: consiste numa cadeia linear de monómeros de glucose, ligados entre si através de ligações β -1,3 ou β -1,4, o que faz com que a sua estrutura seja diferente da celulose, por impedimento na formação de regiões cristalinas, condicionando assim como as suas propriedades físicas. O β -glucano é por isso um polímero solúvel (Choct,1997).

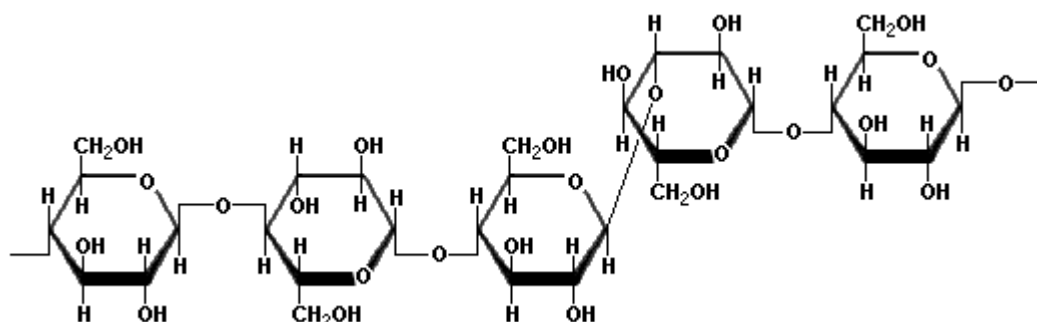


Figura 4-Estrutura química do β -glucano. Polímero linear constituído por resíduos de glucose unidos por ligações β (1,3), e β (1,4).

(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>).

A conformação do arabinoxilano, muito abundante no trigo e centeio, é mais complexa uma vez que é um tipo específico de xilano extensamente decorado com resíduos de arabinose. O xilano, mais concretamente o arabinoxilano mais abundante nos cereais, é a hemicelulose, sendo o segundo PNA mais abundante na natureza (Teixeira, 2013). O seu grau de polimerização depende do tipo de cereal, mas normalmente, é constituído por cadeias mais curtas que as de celulose. A cadeia principal apresenta ligações β , apresentando ramificações de arabinose (Paloheimo *et al.*, 2010), que constituem as

cadeias laterais principais do xilano. O xilano, presente nas plantas anuais, cereais e pastagens é quase sempre o arabinoxilano (Paloheimo *et al.*, 2010).

As moléculas de arabinoxilano podem ser insolúveis em água se estabelecerem ligação direta com as paredes celulares. No entanto, genericamente o arabinoxilano é um hidrato de carbono muito solúvel, conseguindo reter grandes quantidades de água, em cerca de dez vezes mais que o seu peso, conduzindo à formação soluções extremamente viscosas (Choct, 1997).

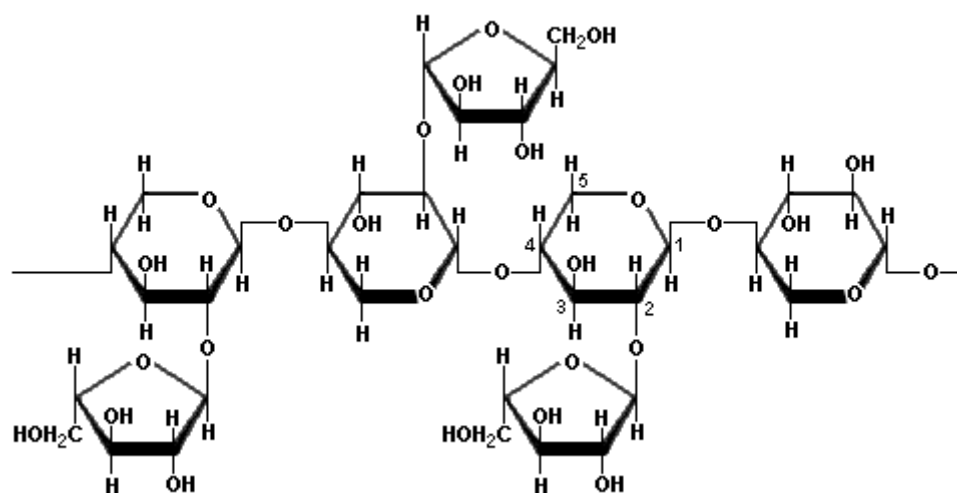


Figura 5-Estrutura química do arabinoxilano. Polímero linear constituído por resíduos de glucose unidos por ligações $\beta(1,4)$.

(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>).

Os dois PNA solúveis, β -glucano e o arabinoxilano, quando presentes em elevadas quantidades nas dietas dos animais provocam um aumento da viscosidade nos conteúdos digestivos dos animais, dificultando a progressão da digesta ao longo do tubo digestivo, diminuindo a velocidade de passagem (Bedford, 2000; Slominski, 2011). Assim sendo, há um aumento da quantidade de água ingerida, diminuição no consumo de alimento e do ganho de peso corporal, com um aumento do índice de conversão alimentar. Este aumento resulta principalmente da menor eficiência das enzimas digestivas na sua ação catalítica, como consequência do aumento de viscosidade do digesta. Há também um aumento do tamanho dos órgãos do tubo digestivo, do número de microrganismos anaeróbicos no intestino grosso e uma maior quantidade de água presente nos conteúdos gastrointestinais e excreções (Marquardt *et al.*, 1996). Todos estes efeitos levam a uma diminuição da

performance dos animais e num aumento de camas húmidas, o por sua vez conduz a patologias. (Bedford, 2008).

No quadro 3, encontra-se a comparação entre os níveis de arabinoxilano, β -glucano e celulose no milho, soja e cevada.

Quadro 3-Tipo e nível de polissacáridos não-amiláceos nos grãos do milho, soja e cevada, em % MS (Adaptado de Choct, 1997).

Cereal	Milho	Soja	Cevada
Arabinoxilano- Solúvel	0,1	-	0,8
Insolúvel	5,1	-	7,1
B-glucano- Solúvel	-	-	3,6
Insolúvel	-	-	0,4
Celulose- Solúvel	-	-	-
Insolúvel	2,0	4,4	3,9

2.2 - Suplementação da dieta de frangos com enzimas

As enzimas são os catalisadores das reações químicas que ocorrem nos seres vivos, geralmente de natureza proteica, sem as quais a vida como a conhecemos não existiria (Scragg, 1988).

A maior parte das enzimas são proteínas globulares altamente especializadas, responsáveis pelas reações de catálise nos sistemas biológicos, nos quais têm um papel central (Nelson *et al.*, 2004). Devido à natureza proteica, apresentam um elevado grau de especificidade para o seu substrato, atuando em sequências organizadas de aminoácidos e acelerando todo o processo químico, sem se consumirem (Nelson *et al.*, 2004).

São cada vez mais empregues na indústria têxtil, farmacêutica e principalmente na indústria alimentar (Smith, 1996). Numa escala menor, mas não menos importante, as enzimas são também aplicadas no fabrico de alimentos compostos para monogástricos, tendo como objetivo minimizar a variabilidade das matérias primas e melhorar o valor nutritivo dos ingredientes incorporados no alimento concentrado (Bedford *et al.*, 1998).

A introdução de enzimas em alimentação animal teve início nos anos 80, com o objetivo de suplementar ou compensar a ausência de enzimas endógenas nos animais de produção. Desde então, possibilita um uso mais económico de matérias primas ao permitir uma maior eficiência no aproveitamento dos seus nutrientes, com consequente diminuição de desperdícios, o que traz benefícios nos parâmetros produtivos do animal e na redução do impacto ambiental gerado (Teixeira, 2013). De um modo geral, as enzimas são

responsáveis pelo aumento da digestibilidade das dietas e ainda pela destruição de compostos que possam interferir com a digestão, absorção e utilização dos mesmos (Teixeira, 2003).

Consoante o tipo de enzima, estas podem aumentar a disponibilidade de fósforo, proteína ou de polissacáridos de reserva da planta, como o amido, que estejam protegidos das enzimas digestivas através de componentes estruturais das paredes celulares vegetais (McDonald, 2002). As enzimas digestivas podem ter uma origem endógena ou exógena. As enzimas endógenas, são produzidas pelo animal e, promovem a quebra das moléculas complexas gerando moléculas mais simples que podem ser absorvidas pelo organismo. Adicionadas aos alimentos encontram-se as enzimas exógenas, cuja maioria provém da fermentação de bactérias (*Bacillus* sp.) e fungos (*Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp.), animais ou vegetais (Haltrich et al., 1996). As aves de capoeira são as espécies que mais parecem beneficiar do uso de enzimas exógenas, talvez por possuírem um sistema digestivo muito curto que não lhes permite tempo suficiente de digestão (Mavromichalis, 2012). Segundo Bedford *et al.* (1998), o tempo de passagem do alimento através do tubo digestivo do frango é de apenas 2 a 4 horas, tendo a fase gástrica uma duração de 20 a 45 minutos. A quantidade de humidade presente no intestino delgado dos frangos também é menor conferindo-lhe uma viscosidade maior.

Atualmente, as enzimas exógenas são um componente essencial das dietas formuladas para a produção avícola. As enzimas mais utilizadas para este fim são as celulasas, β -glucanases, xilanases, amílases, proteases e fitases (Kattak *et al.*, 2006; Slomninski, 2011).

Vários estudos têm demonstrado que as enzimas que hidrolisam os PNAs são capazes de aumentar a utilização dos nutrientes pelas aves, já que eliminam o efeito de proteção provocado pelas paredes celulares vegetais e diminuem a viscosidade do conteúdo digestivo (Slomninski, 2011).

A maior parte das misturas enzimáticas comerciais possuem uma composição enzimática muito diversificada, (o que pode ser exemplificado pelo preparado enzimático comercial usado neste trabalho, o Rovabio, que contém diversas xilanases e β -glucanases). Contudo, segundo Kattak *et al.* (2006), há que ter em conta que a taxa a que uma enzima realiza a catalise numa reação, vai aumentando à medida que a concentração do seu substrato é maior, até ao ponto em que deixa de haver essa resposta, e dizemos que a enzima se

encontra saturada. Daí ser importantíssimo que a quantidade de enzima suplementada numa dieta corresponda à quantidade de substrato a hidrolisar aí presente.

O Rovabio Excel AP é comercializado pela Indukern Portugal-Matérias-primas para a Indústria. Este produto é uma preparação concentrada de enzimas, que visa hidrolisar os arabinoxilanos e β -glucanos presentes nas matérias-primas vegetais. Deste modo, o produto melhora o valor nutricional dos alimentos que contêm diferentes tipos de cereais (milho, trigo, aveia, cevada, etc) e bagaços de sementes de oleaginosas (soja, girassol, etc), reduzindo a viscosidade do conteúdo intestinal e reduzindo a concentração de amónia nas camas das aves (West *et al.*, 2007) (Indukern, ficha técnica do produto nº 122,2015).

O uso isolado de xilanases e glucanases ou em simultâneo com outras enzimas, como protéases, amílases e fitases, em dietas à base de milho tem vindo a ser investigado, face ao aumento atual do preço da energia, e tem conduzido ao desenho de novas estratégias alimentares que permitam reduzir os custos.

Nesse sentido, nos últimos anos, foram feitos alguns estudos (Zanella *et al.*, 1999; Abudados, 2010; Abudados, 2012; Cowienson *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2013) de modo a investigar o efeito da adição de preparados convencionais de xilanases e glucanases e outras, em dietas à base de milho, nos parâmetros produtivos dos frangos de carne.

Por sua vez, West *et al.* (2007), fornecendo dietas à base de milho suplementadas com xilanase e glucanase não obteve diferenças significativas entre tratamentos. Zanella *et al.* (1999) mostraram que a suplementação de uma dieta à base de milho e soja com misturas enzimáticas contendo xilanase, amílase e protéase promoveu um aumento da digestibilidade dos nutrientes e dos parâmetros reprodutivos dos frangos de carne.

Em 1921, Alexandre Fleming demonstrou que a lisozima é uma enzima de origem natural que se encontra em vários fluídos corporais como a saliva, lágrimas, sucos gástricos, etc.

(Sahoo *et al.*, 2012; Gong, 2014). Tem várias funções, como ação anti-inflamatória, imunológica e antibacteriana (Sahoo *et al.*, 2012). Auxilia na hidrólise da parede celular bacteriana, quebrando as ligações glicosídicas entre o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglucosamina (Sahoo *et al.*, 2012; Gong, 2014). Utiliza-se como promotor de crescimento, melhorando os parâmetros produtivos dos animais. Na Rússia realizou-se um estudo em frangos que demonstrou que o uso de lisozima reduz o consumo de

alimentos, a percentagem de gordura, melhorando a digestibilidade e o ganho de peso diário (Fisinin, 2014).

Uma experiência realizada por Liu e colaboradores (2010) em frangos de engorda, demonstrou que a adição de lisozima ao alimento melhorou a taxa de conversão alimentar das aves, reduziu significativamente a concentração de *Clostridium perfringes* no íleo e as lesões intestinais, assim como inibiu o crescimento excessivo de *Escherichia coli* e *Lactobacillus* no íleo.

2.3 - Composição da carne de frango em ácidos gordos

Na carne de aves, os ácidos gordos são distribuídos entre lípidos neutros e polares (triacilgliceróis e fosfolípidos respetivamente) no músculo dos animais (Gandemer, 2002). Os fosfolípidos são um componente essencial das membranas celulares e a sua quantidade permanece constante, ou aumenta ligeiramente, à medida que o teor de gordura aumenta (Wood *et al.*, 2008). Os lípidos neutros ou triacilgliceróis ricos em ácidos gordos saturados e monoinsaturados, são encontrados nos adipócitos localizados no tecido conjuntivo e em outros órgãos (Sanosaka *et al.*, 2008). A carne do peito contém mais fosfolípidos, enquanto a carne da coxa contém mais triacilgliceróis (Gonzalez-Esquerre & Leeson, 2000).

Carne de frango rica em ácidos gordos *n*-3 PUFA pode ser obtida através de dietas contendo sementes de linhaça (Rebole *et al.*, 2006) ou incorporando pastagem (O'Sullivan *et al.*, 2004; Ponte *et al.*, 2008) levando a uma melhoria nos níveis de ácido α -linolénico (LNA) na carne. Por outro lado, dietas incorporando níveis significativos de óleo de peixe ou algas, aumentam os teores de ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) na carne (Komprda *et al.*, 2005; Lopez-Ferrer *et al.*, 2001b; Mooney *et al.*, 1998; Poureslami *et al.*, 2010b; Rymer *et al.*, 2010).

Assim no caso das aves, a composição da dieta influencia diretamente o perfil de ácidos gordos da carne e consequentemente a sua qualidade.

As principais fontes de *n*-6 PUFA para as dietas das aves são algumas sementes tais como linhaça, a canola, soja, etc (Arterburn *et al.*, 2006), enquanto as fontes de *n*-3 PUFA incluem as sementes de linhaça, as farinhas de peixe e seus derivados e as algas. (Schmitz & Ecker, 2008). Os ácidos essenciais, como o ácido alfa linolénico (18:3 *n*-3) e o ácido linoleico (18:2 *n*-6) (Bezard *et al.*, 1994; Schmitz & Ecker, 2008), formam duas famílias

de ácidos gordos essenciais, que os seres humanos são incapazes de sintetizar de novo (Arterburn *et al.*, 2006) tendo que ser por isso fornecidos pela dieta. Em células de mamíferos, LA e LNA são metabolizados em PUFA de cadeia longa (LC-PUFA). O LA é convertido em ácido araquidônico (ARA-20:4 *n*-6) e em seguida, convertido em ácido docosapentaenóico (DPA-22:5 *n*-6) ou eicosanóides (Schmitz & Ecker, 2008). O LNA é convertido em ácido estearidônico (18:4 *n*-3) e ácido eicosatetraenóico (20:4 *n*-3) para formar ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 *n*-3).

Os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa *n*-3 PUFA, especialmente o EPA e docosahexaenóico (DHA, 22:6 *n*-3) são reconhecidos como compostos benéficos para o crescimento e desenvolvimento do animal (Zhang *et al.*, 2010). Estes importantes PUFA têm mostrado que reduzem o risco de várias doenças crônicas, como sejam as doenças cardiovasculares (Lopez-Garcia *et al.*, 2004). Devido ao elevado consumo o de carne de frango nos países desenvolvidos, este tipo de carne foi considerado uma das potenciais fontes de *n*-3 PUFA para os humanos (Rymer and Givens, 2005; Givens and Gibbs, 2008). No entanto, há algumas desvantagens relativas à estabilidade oxidativa da carne.

Assim, os PUFAs são muito suscetíveis à oxidação, produzindo características sensoriais indesejáveis na carne, que estão muitas vezes associadas ao sabor a peixe (Wood *et al.*, 2008). Esta instabilidade oxidativa pode influenciar a qualidade da carne e, consequentemente a aceitabilidade por parte do consumidor. No entanto sabe-se que as algas marinhas são excelentes fontes de *n*-3 PUFA (Schmitz and Ecker, 2008).

As algas são os produtores mais prolíficos de EPA e DHA nos ecossistemas, e vários óleos de algas refinados são particularmente ricos em DHA (Arterburn *et al.*, 2006). Os ácidos gordos *n*-3 PUFA estão presentes nas membranas celulares e são incorporados principalmente nos fosfolípidos. Estes ácidos gordos principalmente os mais insaturados, podem influenciar as propriedades biofísicas das membranas (maior fluidez e flexibilidade).

A composição geral de ácidos gordos da membrana pode ter um grande impacto na função de células e órgãos, bem como numa ampla variedade de processos biológicos (Arterburn *et al.*, 2006). O DHA está presente em todos os órgãos sendo mais abundante no tecido neural como cérebro e retina. Apenas quantidades muito pequenas de EPA e DHA estão presentes no tecido adiposo, o que sugere uma capacidade de armazenamento limitada

desses LC-PUFA e implica a necessidade de um fornecimento contínuo dessas moléculas através da dieta (Arterburn *et al.*, 2006).

O colesterol é o mais importante dos esteróis animais. Este esterol é também o precursor das hormonas esteroides sintetizadas pelas glândulas suprarrenais e pelas gónadas (testículos e ovários), precursor da vitamina D, sendo ainda um componente importante da membrana celular das células dando-lhes rigidez, podendo ser sintetizado pelo fígado (colesterol endógeno) (Breda, 2003). Como o colesterol é insolúvel, a sua presença prolongada no sangue promove a deposição na parede dos vasos sanguíneos, o que leva à formação da placa arterosclerótica (Mc Donald *et al.*, 1995). Há assim uma necessidade urgente de reduzir o teor de colesterol nas dietas modernas nos países industrializados e os consumidores estão cada vez mais preocupados com a seleção de alimentos com baixo teor de colesterol.

O colesterol é um constituinte normal de todas as células do corpo, sendo que 70% tem origem biológica(endógeno) e apenas 30% é fornecido pela dieta (exógeno) (King, 2011).

Os teores de colesterol variam nas diferentes carnes, de acordo com vários fatores como a dieta, idade, espécie, raça, ambiente, e no mesmo animal diferentes músculos também podem apresentar diferentes teores de colesterol (Pratiwi, 2006).

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos. O consumo de gorduras saturadas na dieta e ácidos gordos polinsaturados *n*-6 PUFA aumentam o risco das DCV, enquanto o consumo de *n*-3 PUFA pode reduzir a incidência das mesmas (Simopoulos, 1997). A razão (*n*-6/*n*-3) da dieta em países desenvolvidos é neste momento maior que o recomendado, ou seja 10:1 (Azain, 2004) contra a razão de 1:1 que deveria ser (Simopoulos, 2002).

Vários estudos têm investigado os efeitos benéficos de uma dieta rica em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) sobre a saúde cardiovascular, diminuindo o conteúdo de colesterol de lipoproteína (LDL) de baixa densidade no plasma sanguíneo, entre outros efeitos positivos (Kris-Etherton *et al.*, 1999; Roche, 1999). Podemos destacar as aves utilizadas em alimentação humana que têm níveis baixos de gordura intramuscular e colesterol na carne do peito (Chizzolini *et al.*, 1999; Givens, 2005). Nos últimos anos vários suplementos foram testados para diminuir o colesterol na carne de aves, como sementes de chia (Ayerza *et al.*, 2002), luzerna (Ponte *et al.*, 2004b), entre outros.

Aproximadamente 75% do colesterol total das aves está na forma de lipoproteínas de alta densidade HDL, (Gould & Siegel, 1985; Yu *et al.*, 1976), tendo este um efeito protetor.

2.4 - Composição da carne de frango em antioxidantes

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel, e apresenta uma única estrutura química base, comum ao conjunto de todos os tocoferóis e tocotrienóis, e apresentando 4 formas, (α -, β -, γ -, δ -, tocoferóis e respectivos tocotrienóis) de origem natural, os quais diferem pelo número e posição dos grupos metilo no anel aromático (Machlin, 1991).

Os tocoferóis e os tocotrienóis são moléculas bastante semelhantes do ponto de vista estrutural, ambas constituídas por um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral de dezasseis carbonos na posição carbono 2, sendo esta o que os distingue, pois é uma cadeia saturada nos tocoferóis e insaturada nos tocotrienóis (Yoshida *et al.*, 2002). O mais ativo é o α -tocopherol, sendo a principal fonte de vitamina E encontrada no sangue (Bramley *et al.*, 2000; Traber *et al.*, 1992). Apesar do α -tocopherol ser o homólogo presente em maior concentração na carne, podem aparecer outros homólogos dependendo das carnes e da disponibilidade desses homólogos na dieta dos animais. Assim, nos ruminantes domésticos é também comum encontrar o γ -tocopherol, sendo mesmo possível encontrar todos os homólogos na carne de monogástricos e aves (Ponte *et al.*, 2008; Quaresma *et al.*, 2008).

A vitamina E encontra-se sob a forma de tocoferóis nos óleos vegetais polinsaturados e no gérmen das sementes de cereais (German & Dillard, 2006). Os tocotrienóis encontram-se principalmente, nas sementes de cereais e óleos de palma (Yoshida *et al.*, 2002).

A vitamina E é um poderoso antioxidante presente nos tecidos biológicos e cuja atividade tem sido relacionada com a inibição da oxidação lipídica (Morrissey *et al.*, 1998) que conjuntamente com o desenvolvimento microbiano, formam os principais condicionantes da estabilidade da qualidade da carne (Buckley *et al.*, 1995).

Sendo considerada como a segunda causa mais frequente da deterioração da carne, a oxidação lipídica contribui para a degradação da qualidade da carne, afetando negativamente o seu valor nutricional e os seus atributos organoléticos, tais como cor, flavor, e odor condicionando assim a aceitabilidade pelos consumidores (Gray *et al.*, 1996).

A estabilidade oxidativa depende do equilíbrio entre os antioxidantes, como o α -tocoferol e alguns carotenoides e pro-oxidantes, incluindo os ácidos gordos polinsaturados (Kanner, 1992). Pensa-se que a oxidação ocorra logo após o abate, onde as mudanças bioquímicas na carne favorecem a oxidação devido ao referido desequilíbrio (Morrissey *et al.*, 1998).

A concentração de vitamina E, no isómero α -tocoferol, e o grau de insaturação dos ácidos gordos presentes no músculo são os principais intervenientes desta oxidação (Morrissey *et al.*, 1994). Sendo o grau de insaturação uma condicionante para a estabilidade (Morrissey *et al.*, 1998), é observada uma correlação positiva entre o grau de insaturação dos ácidos gordos e a extensão do ataque oxidativo, ou seja, quanto mais insaturados os ácidos gordos, maior a suscetibilidade à oxidação e maior será a ampliação desta (Wood *et al.*, 2003).

Sendo o teor de α -tocoferol um fator determinante para a estabilidade da carne, o aumento do teor de α -, γ - e δ - tocoferol na ração leva a um aumento destes isómeros no plasma sanguíneo (Jakobsen, 1995).

Alguns estudos demonstram que a deposição do α -tocoferol na carne está relacionada com a ingestão deste, nas dietas dos animais, variando em função do músculo (Jakobsen *et al.*, 1995; Lauridsen *et al.*, 2000).

A vitamina E favorece ainda a proteção das membranas biológicas e pigmentos musculares de danos oxidativos, contribui para a estabilidade da coloração aumentando consequentemente o tempo de prateleira do produto (Arnold *et al.*, 1993), em cerca de 1,6 a 5 dias, sem comprometimento da qualidade microbiológica (Gray *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995). Esta estabilidade ocorre pelo aumento do teor de α -tocoferol no músculo (Arnold *et al.*, 1993).

Em relação ao δ -tocoferol, é pouco frequente o aparecimento deste isómero na carne (Prates *et al.*, 2006), enquanto o β -caroteno (pró-vitamina A) é o carotenoide dominante na carne e seus produtos derivados.

Em resumo, depreende-se da discussão anterior que, a vitamina E tem o papel fundamental para a qualidade e durabilidade da carne (Gray *et al.*, 1996).

É um antioxidante lipossolúvel que juntamente com o desenvolvimento microbiano, é um dos fatores que pode afetar a estabilidade oxidativa e consequentemente a qualidade da

carne, (Lopes, 2009). O β -caroteno se for em excesso contribui para o valor nutricional da carne, alterando a cor, o odor e flavor, contribuindo assim para a fraca aceitabilidade por parte do consumidor (Morrissey, 1994). Da mesma forma, a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados reduz o valor nutricional e funcional da carne (Ramos, 2008).

Sendo o β -caroteno um pigmento vegetal pertencente à família dos carotenoides, as suas tonalidades podem variar entre o amarelo, laranja e vermelho (Reynoso, 2004).

Durante a sua passagem pelo trato gastro-intestinal, nem todo o β -caroteno ingerido é absorvido. Uma parte é transformada diretamente em vitamina A e o excedente é depositado no tecido adiposo onde se vai acumular. Deste modo aparece uma coloração amarela na gordura sub-cutânea dos animais (Mora *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 1969; Strachan *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que os tecidos musculares de animais criados em sistemas biológicos (pastagem) podem apresentar o dobro de valores de β -caroteno em relação a animais criados apenas com cereais (Descalzo *et al.*, 2005).

Sabe-se ainda, que animais criados apenas em pastagens, apresentam uma pigmentação amarela da gordura mais abundante, já que os pastos são ricos em carotenoides (Mora *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 1969; Strachan *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2002). A idade do animal também se encontra relacionada com a pigmentação da gordura, ou seja quanto mais velho o animal mais amarela será a gordura, havendo assim uma relação direta entre a acumulação de carotenoides ao longo da vida do animal e a pigmentação amarela da carne (Ramalho, 2010).

Muitos dos consumidores associam a carne que apresenta gordura com uma coloração amarela a animais criados tradicionalmente, sendo esta percecionada como um critério de qualidade, podendo mesmo ser decisiva na compra (Dune, 2009). No entanto, em países como o Japão, Austrália e México, a pigmentação amarela da gordura da carne desses animais não é desejável podendo levar à rejeição da carne pelos consumidores, causando prejuízos económicos consideráveis, (Yang *et al.*, 1992).

Alguns resultados sugerem que o β -caroteno pode ainda ter efeito em relação ao retardar a oxidação do “LDL” (Siebert & Kruk, 2004) facto que pode desencadear ou promover o aparecimento de aterosclerose. Realizaram-se outros trabalhos, dentro deste âmbito, que sugerem uma redução do risco associado através da ingestão de alimentos ricos em β -

caroteno (Graziano *et al.*, 1995). No entanto, este assunto não está ainda completamente clarificado.

2.5 - Utilização de microalgas na alimentação de frangos

O crescente interesse no estudo das microalgas, deve-se à importância destas nas diversas cadeias tróficas e na sua abundância como recurso marinho natural ou de água doce. As microalgas possuem ainda uma série de aplicações em áreas distintas, tais como a nutrição humana e animal, o tratamento de águas residuais, a produção de energia e a obtenção de compostos de interesse nas indústrias alimentar, química e farmacêutica, entre outras (Borowitzka *et al.*, 1993).

As microalgas são constituídas principalmente por proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerais e carotenoides (Madeira *et al.*, 2017). Esta composição nutricional depende da espécie, da estirpe e das condições de crescimento das algas, (Madeira *et al.*, 2017).

A microalga usada neste ensaio foi a Spirulina (*Arthrospira platensis*), pertencente ao grupo das cianobactérias. O produto utilizado no ensaio, originário da China, foi comercializada pela empresa Francesa Spropêche. A Spirulina é cultivada durante todo o ano, apresentando-se como um pó de cor verde escuro com sabor e odor característicos. É uma alga verde-azulada, de forma helicoidal rica em aminoácidos. A sua cor é devida não só à clorofila, mas também ao pigmento –ficocianina, que tem uma ação desintoxicante. Fonte natural de vitamina B, sendo autorizada na alimentação, e na incorporação de rações. A Spirulina é o descendente da primeira forma de vida fotossintética de há 3,5 milhões de anos atrás. É um microrganismo procariota, unicelular, foto-autotrófico que se desenvolve em lagos de água doce (pH alcalino entre 7 a 8), e em rios e lagos com pH entre 10-11. Já os Astecas adicionavam Spirulina às suas refeições, assim como algumas populações do Norte de África. As suas características nutricionais são elevadas, sendo a principal o teor em proteínas (cerca de 60%), além de conter todos os aminoácidos essenciais, além de vitaminas, minerais, vitamina B12, antioxidante beta-caroteno que pode ser convertido em vitamina A, ferro e clorofila. Consequentemente, a Spirulina está a surgir como um meio económico para melhorar a produtividade animal para um futuro de segurança alimentar sustentável e viável. No entanto, o nosso conhecimento atual de resposta animal à suplementação dietética de Spirulina é para além de escasso, em grande parte desconhecido.

Existem vários estudos desenvolvidos até ao momento que mostram de forma clara que a incorporação de microalgas em dietas para animais pode melhorar o crescimento e qualidade da carne em ruminantes, suínos, aves e coelhos. Esta melhoria está relacionada com a composição das microalgas e com a percentagem de incorporação na dieta (Madeira *et al.*, 2017).

Assim sendo, a incorporação de *Arthrospira platensis* (Spirulina), em dietas de suínos e aves afeta negativamente a taxa de conversão alimentar, (Madeira *et al.*, 2017). Em relação à *Shizochytrium* sp., esta microalga melhora a composição dos ácidos gordos na carne de frango, essencialmente devido ao seu alto teor em ácido docosahexaenóico (DHA), enquanto a *Chlorella*, em percentagens muito baixas, beneficia os parâmetros de crescimento de frangos de carne, (Madeira *et al.*, 2017).



Figura 6-Frango alimentado com a microalga, Spirulina (*Arthrospira pratensis*).

O uso de microalgas como ingrediente em dietas para aves é muito promissor como suplemento para o milho e a soja, suavizando assim a concorrência atual entre as indústrias de biocombustíveis e de alimentos compostos para animais, (Madeira *et al.*, 2017). Além disso as microalgas contribuem para a sustentabilidade do meio ambiente e dos recursos naturais, como seja a degradação do solo e a privação de água. Também nos dão uma alternativa sustentável para obter *n*-3 PUFA, protegendo assim algumas espécies de peixes em todo o mundo, (Madeira *et al.*, 2017).

No entanto, a produção e uso rentável de microalgas é um grande desafio num futuro próximo, além de que a tecnologia atual usada deve ser melhorada para reduzir os custos de produção (Madeira *et al.*, 2017) os quais são neste momento relativamente elevados. É importante para a indústria de alimentos compostos para animais desenvolver

tecnologias adequadas para melhorar a biodisponibilidade de nutrientes das microalgas em animais (Austic *et al.*, 2013; Lum *et al.*, 2013).

A eficiência da incorporação de microalgas em dietas de monogástricos poderá ser melhorada pelo uso de enzimas específicas para hidratos de carbono genericamente designadas por (CAZymes de Carbohydrate-Active enZymes). (Madeira *et al.*, 2017).

As CAZymes, permitirão o aumento da biodisponibilidade de nutrientes, como resultado da degradação das paredes celulares das microalgas, que são muito rígidas (Madeira *et al.*, 2017). Em geral, a introdução de microalgas em dietas para aves representa uma estratégia promissora para a manutenção e desenvolvimento da pecuária, como alternativa ecologicamente correta, que favorece um saudável equilíbrio entre as indústrias de alimentos concentrados para animais e biocombustíveis, (Madeira *et al.*, 2017).

Assim, a inovação de novos métodos para melhorar o valor nutritivo de matérias primas ricas em compostos bioativos pouco disponíveis associado à eficiência melhorada na utilização dos recursos, desempenharão um papel vital para a sustentabilidade dos sistemas de produção pecuária.

2.6 - Objetivos do trabalho

Este trabalho pretende avaliar o efeito da utilização de CAZymes exógenas sobre a melhoria da eficiência do uso de microalgas na dieta para frangos de carne.

Espera-se que a eficiência do uso das microalgas na dieta de monogástricos possa ser melhorada através da incorporação de CAZymes, de atividade específica, devido à degradação da parede celular e ao consequente aumento da biodisponibilidade dos nutrientes.

Pretende-se ainda estudar o efeito dos compostos bioativos das microalgas na qualidade nutricional da carne de frango (coxa e peito), principalmente a relacionada com a fração lipídica, incluindo lípidos totais, perfil de ácidos gordos e teor e perfil de antioxidantes.

3 - Material e métodos

3.1 - Delineamento experimental e preparação das dietas

O ensaio aqui descrito teve a duração de 35 dias e decorreu nas instalações da secção de produção animal do Instituto Superior de Agronomia. A partir de uma amostra inicial de 200 animais, foram seleccionados 120 pintos do dia, machos, da estirpe Ross 308 obtidos do aviário Quinta da Freiria. A seleção foi feita com base no peso vivo (PV) com o intuito de obter a maior homogeneidade possível entre animais. As aves foram anilhadas, pesadas e aleatoriamente alojadas em 40 gaiolas de crescimento em lotes de 3. O ensaio foi estruturado em 4 tratamentos com 10 réplicas por tratamento ($n=10$) e os animais foram alimentados *ad libitum*. Previamente ao início do ensaio, a sala na qual se encontram as gaiolas, assim como todo o equipamento nela disposta, foi limpo e desinfetado. O aquecimento da sala foi ligado 24 h antes da chegada dos animais, de modo que a temperatura ambiente fosse de 27-28 °C. A temperatura e a ventilação foram controladas durante o ensaio.

A sala na qual decorreu o ensaio (figura 7), possui 10 m de comprimento por 3 m de largura e 4,5 m de altura. Está organizada com 16 gaiolas do lado esquerdo, 8 em cima e 8 em baixo, e 24 gaiolas do lado direito, 12 em cima e 12 em baixo. A disposição das gaiolas permite um distanciamento das paredes e a constituição de um corredor central.



Figura 7-Aspeto da sala onde decorreu o ensaio.

As 40 gaiolas de crescimento possuíam 66 cm de comprimento por 66 cm de altura e 66 cm de largura. Cada gaiola incluía 2 bebedouros de pipeta (figura 8), que disponibilizaram água à descrição e um comedouro, (figura 9), sendo que ambos tiveram a altura ajustada

ao crescimento dos animais. Cada gaiola possui ainda uma lâmpada incandescente refletora de infravermelho, possuindo as gaiolas inferiores com lâmpadas de 150 W e as superiores com lâmpadas de 175 W. As lâmpadas incandescentes refletoras de infravermelho ficaram ligadas durante todo o ensaio, juntamente com o exaustor. Este foi programado com a temperatura mínima e máxima de acordo com as práticas de criação padrão sendo que se ligava e desligava automaticamente com base nesses valores. Todos os dias a temperatura foi regulada e medida de manhã na chegada ao local e na hora de saída. Somente nesse período eram ligadas as luzes do ambiente.



Figura 8-Aspetto do bebedouro.



Figura 9-Aspetto de Comedouro.

A limpeza da sala foi realizada pelo menos uma vez por semana para retirar as fezes, penas e restos de ração que excepcionalmente pudessem cair.

Os 4 tratamentos, descritos em baixo, foram dispersos aleatoriamente pelas 40 gaiolas em que decorreu o ensaio, de forma a minimizar qualquer efeito indesejável que pudesse afetar as performances zootécnicas dos animais.

A planificação da distribuição dos tratamentos pela sala de ensaio está representada na figura 10.

MAL 29	MAL 30	Cont 31	Cont 32	MA 33	MA 34	MAR 35	MAR 36	Cont 37	Cont 38	MAL 39	MAL 40
MA 17	MA 18	MAR 19	MAR 20	Cont 21	Cont 22	MAL 23	MAL 24	MAR 25	MAR 26	MA 27	MA 28

Cont 9	Cont 10	MAL 11	MAL 12	MAR 13	MAR 14	MA 15	MA 16
MAL 1	MAL 2	Cont 3	Cont 4	MA 5	MA 6	MAR 7	MAR 8

Cont- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima.

Figura 10-Distribuição dos tratamentos pela sala.

A quantidade de alimento adicionada e a mortalidade foram registadas diariamente e o PV e o consumo de alimento foram registados semanalmente. Após a terceira semana, o alimento foi distribuído 2 vezes ao dia independentemente da quantidade ingerida. A partir dos registos diários e semanais calculou-se a quantidade de alimento ingerido, o índice de conversão (IC), o ganho médio diário de peso e a mortalidade.

No 35º dia ocorreu o abate de 40 animais, 10 de cada dieta. Os animais foram insensibilizados através de eletronarcose seguido do destroncamento do pescoço. Após o abate, houve a recolha do sangue, músculos da coxa e do peito, do sistema digestivo começando pelo papo, moela, duodeno, jejuno, íleo, cecos, pâncreas e fígado, juntamente com o conteúdo dos órgãos. Todos os órgãos foram pesados, cheios e vazios, com medição do duodeno, jejuno, íleo e ceco. Após a recolha do conteúdo do duodeno mais jejuno e íleo, parte deste foi para o cálculo da viscosidade. Efetuou-se a centrifugação das várias amostras dos conteúdos dos compartimentos gastrointestinais durante 10 minutos a 9000 rotações por minuto (rpm), e os sobrenadantes foram utilizados para medir as viscosidades, no viscosímetro Brookfield cone and plate LVCDVII. A outra parte dos conteúdos foi recolhida para posterior análise de atividade enzimática.

Todos os alimentos usados no ensaio aqui descrito foram preparados na fábrica de rações da Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia. Dos 0-21 dias de idade os animais foram alimentados com uma dieta completa e equilibrada à base de milho e soja, designada por dieta de crescimento. O período experimental decorreu dos 21-35 dias de idade e consistiu na dieta base milho-soja, ajustada em termos nutricionais para a idade dos animais. Esta dieta base foi substituída com uma proporção fixa de uma microalga (Spirulina), sendo que as dietas contendo microalgas foram suplementadas ou

não com dois preparados enzimáticos diferentes. Assim as quatro dietas (figura 11), experimentais testadas neste ensaio consistiram em:

- regime alimentar controlo à base de milho e bagaço de soja (tratamento Cont);
- regime alimentar Cont com 15% de microalgas (tratamento MA);
- regime alimentar Cont com 15% de microalgas + enzima comercial Rovabio Excel AP, (tratamento MAR);
- regime alimentar Cont com 15% de microalgas + lisozima, (tratamento MAL).



Figura 11-Aspetto das quatro dietas testadas neste ensaio.

A dieta de crescimento e a dieta controlo (Cont) possuem os mesmos ingredientes, mas em proporções diferentes, ajustadas às necessidades nutricionais dos animais em cada fase. A composição das várias dietas testadas neste ensaio encontra-se descrita no quadro 4.

Quadro 4-Ingredientes utilizados na formulação das dietas, expressos em kg.

	DIETA DE	DIETA DE CRESCIMENTO			
	INICIAÇÃO	Controlo	MA	MAR	MAL
Milho	60,45	64,25	69,00	69,00	69,00
Bagaço soja 47%	33,50	30,00	11,30	11,30	11,30
Óleo de soja	1,60	2,10	1,25	1,25	1,25
Carbonato de cálcio	1,23	1,06	1,22	1,22	1,22
Fosfato bicálcico	1,94	1,44	1,00	1,00	1,00
Metionina sintética	0,38	0,31	0,23	0,23	0,23
Lisina sintética	0,25	0,22	0,37	0,37	0,37
Premix*	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Sal	0,35	0,33	0,33	0,33	0,33
Spirulina	0	0	15,00	15,00	15,00
Rovabio	0	0	0	0,005	0
Lisozima	0	0	0	0	0,01
TOTAL	100	100	100	100	100
Energia (Kcal/kg)	3050,34	3130,73	3131,64	3131,64	3131,64
Matéria seca (%)	84,02	88,7	89,2	89,3	89,3
Proteína Bruta (%)	21,51	20,05	21,1	21,1	21,0
Lisina (%)	1,22	1,11	1,14	1,14	1,14
Metionina (%)	0,69	0,60	0,62	0,62	0,62
Cálcio (%)	0,96	0,77	0,78	0,78	0,78
Fósforo. (%)	0,47	0,38	0,42	0,42	0,42
Sódio (%)	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisozima. *Composição do Premix: Vitaminas A, D3, E, K3, B1, B2, B6 e B12, Patotenato de cálcio, Ácido nicotínico, fólico e cítrico, Biotina, Betaina, Cobre, Ferro, Iodo, Manganês, Selénio, Zinco, Butil-hidroxitolueno (BHT) e Perlite.

Na preparação dos alimentos o milho e bagaço de soja foram moídos e colocados na misturadora. Foram sequencialmente adicionados à misturadora os diferentes micro-ingredientes de cada dieta, nas proporções requeridas, e só no final foi adicionado o óleo de soja, demorando todo este processo cerca de 10 minutos. Após preparação os alimentos foram armazenados em caixas de plástico, mantidas em locais fresco e seco. Ao todo foram produzidos 250 kg da dieta de crescimento e 400 (4 x 100) kg de dieta de acabamento. O alimento concentrado base foi formulado de modo a ser similar aos regimes alimentares comerciais padrão, produzidos industrialmente para frangos de carne. Após a preparação dos alimentos estes foram sujeitos a uma análise química, para confirmação dos valores da sua composição. No quadro 4 apresentam-se a composições químicas dos diferentes alimentos de acabamento preparados no âmbito deste ensaio.

3.2 - Atividade enzimática dos conteúdos digestivos e dos regimes alimentares

O procedimento para a avaliação qualitativa da atividade enzimática das amostras dos conteúdos digestivos dos vários compartimentos gastrointestinais, recolhidos em microtubos, foi efetuada após uma centrifugação (Eppendorf 5415 R) a 13000 r.p.m. durante 5 minutos, no sobrenadante posteriormente recolhido para um microtubo novo. Foram preparados dois meios de cultura diferentes: um com 0,1 % (p/v) de arabinoxilano (Megazyme) e outro com 0,1 % (p/v) de β -glucano (Megazyme), ambos numa solução de 2 % (p/v) de agar (Nzytech) em 10 mM de Tris pH 8 (Sigma Trizma base, Tris[hydroxymethyl]amino-methane). Estes dois meios, após homogeneização e esterilização por autoclave, foram colocados em placas de Petri.

Após solidificação dos meios nas placas, fizeram-se pequenos poços, previamente identificados, com auxílio de pipetas de Pasteur, colocando-se 20 μ l do sobrenadante de cada compartimento gastrointestinal acima referido. Seguidamente as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e foram depois coradas com Vermelho do Congo numa concentração final de 1% (p/v) em 10 mM de Tris-HCl com pH 8, durante 20 minutos. Para retirar o excesso de corante, efetuaram-se várias lavagens com uma solução descorante de NaCl 1 M em 10 mM de Tris com pH 8, em intervalos de 15 minutos. Para leitura dos resultados e registo fotográfico, as placas foram colocadas sobre um transiluminador de luz visível (Molecular Imager-Chemidoc-XRS+, Bio-Rad). Um resultado positivo observa-se nas zonas ao redor dos poços onde houve degradação apresentam-se descoradas em relação à cor vermelha da placa.

Para a avaliação qualitativa da atividade da Lisozima, as amostras dos conteúdos digestivos dos vários compartimentos gastrointestinais, foram obtidas como já referido acima. Preparou-se um meio de cultura com 1,0 g de agarose (Nzytech) numa solução de 0,1 g NaCl em 100 ml de tampão fosfato de pH 6,5 com 0,020 g de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma). Esta mistura foi ao micro-ondas até entrar em ebulição, agitando de vez em quando, sendo colocada em placas de Petri. Após a solidificação do meio na placa procedeu-se do mesmo modo como referido anteriormente, sendo neste caso as placas incubadas a 47 °C durante 24 horas (Gosnell *et al.*, 1975). As placas foram posteriormente coradas com 0,5 g de Amido Black 10B em 7 % de ácido acético, durante 5 minutos. Para retirar o excesso de corante, efetuaram-se várias lavagens com 7 % de ácido acético. Para leitura dos resultados e registo fotográfico, as placas foram colocadas

sobre um transiluminador de luz visível (Molecular Imager-Chemidoc-XRS+, Bio-Rad). As zonas ao redor dos poços onde houve degradação apresentaram-se descoradas em relação à cor azul da placa.

Também foi avaliada a atividade enzimática basal do alimento fornecido. Para isso pesou-se 0,75 g do alimento Controle, MA, MAR e MAL e colocou-se em microtubos previamente identificados, adicionando a cada um 1000 µl de solução tampão PC, seguido de uma agitação em vórtex. Colocaram-se as reações numa incubadora (Shel Lab SI) a 37 °C a 200 r.p.m., durante 30 minutos. Centrifugou-se de seguida a 13000r.p.m., cerca de 5 minutos, para se retirar o sobrenadante. Foram colocados em placas de Petri 20 µl de sobrenadante de cada um dos alimentos em poços dos dois meios acima referidos sendo sujeitas a uma incubação a 37 °C, durante 36 horas, tendo seguido a mesma metodologia já descrita.

3.3 - Determinação dos lípidos totais

O teor de matéria seca (MS) das amostras musculares em estudo foi determinada por liofilização, em duplicado, de acordo com o método descrito por Rosenkranz, (1993). O método consistiu na pesagem de cerca de 20,00 g de músculo, cortado grosseiramente em pedaços, colocados em copo de plástico e congelados durante 24 horas a - 18 °C. De seguida as tomas do ensaio foram colocadas no liofilizador durante 48 horas, ajustado a - 60 °C e 2,0 hPa. Terminado o período de liofilização, as tomas de ensaio foram pesadas com igual rigor e o produto liofilizado armazenado em exsicador até posteriores ensaios.

O teor de matéria seca, expresso em g por g de massa de músculo, foi calculado pela seguinte relação algébrica:

$$\text{Matéria seca} = \text{mL} / \text{m0}$$

Sendo:

mL = massa da toma de ensaio após x horas de liofilização, expressa em g.

m0 = massa da toma de ensaio antes da liofilização, expressa em g.

O teor de matéria seca pode também ser expresso em percentagem em relação à matéria húmida, pela expressão seguinte:

$$\text{Matéria seca} = \text{mL} / \text{m0} \times 100$$

Estas determinações foram efetuadas em duplicado, tendo a média dos valores obtidos sido aceite para coeficientes de variação inferiores a 1 %.

O método de extração e quantificação dos lípidos da carne adotado neste ensaio, está de acordo com o descrito por Folch *et al.*, (1957). Este procedimento foi desenvolvido em triplicado para cada amostra. Os balões de rotoevaporador (IKA HB10 Basic) foram previamente tarados, tendo sido colocados na estufa Struers (Fabr. El. A.B Helios) a 70 °C durante a noite com o auxílio de pinças, tendo o cuidado de não mexer com as mãos. De seguida foram retirados para um exsicador (este é de vidro com sílica de gel ativada) e pesados (Gibertini E42) 1 hora depois, registando-se os valores. Os balões foram novamente colocados no exsicador até posterior utilização.

Adicionou-se a cada tubo 2,5 ml de metanol deixando humedecer a amostra durante 5 minutos. Cada tubo foi agitado no vórtex durante 10 segundos e colocado no banho-maria de ultrassons (Grant, modelo MXB14; Grant Instruments, Cambridge, Inglaterra), durante 5 minutos a 30 °C, agitando regularmente. De seguida efetuaram-se três extrações:

1ª Extração - adicionaram-se 5 ml de diclorometano, agitando no vórtex durante 10 segundos, seguida de uma incubação no banho-maria com ultrassons, durante 5 minutos, a 30 °C, agitando regularmente. No final o homogeneizado foi centrifugado a 2500 r. p. m., durante 5 minutos, e recolheu-se a fase líquida de cada um para um tubo de plástico de 50 ml, passando por um funil e filtro (nº1 Whatman; Whatman International Lda, Maidston, Inglaterra)

2ª Extração - à amostra da centrifugação anterior foram adicionados 7,5 ml de diclorometano/metanol (2:1) efetuando-se uma extração idêntica à anterior colocando os tubos no banho de ultrassons durante 10 minutos. A fase líquida resultante da centrifugação é recolhida para o tubo de plástico referido na extração anterior.

3ª Extração - à fase sólida resultante da extração anterior adicionaram-se 7,5 ml de solução de diclorometano/metanol e procedeu-se do mesmo modo, com 5 minutos de agitação no banho-maria com ultrassons. O sobrenadante foi recolhido para o mesmo tubo referido anteriormente. A cada tubo de 50 ml, onde foram recolhidos os vários extratos, adicionaram-se 3 ml de solução de cloreto de potássio 0,8%, tendo-se agitado durante 10 segundos no vórtex, e feito uma centrifugação de 2500 r. p. m. durante 5 minutos. As fases orgânicas, de dois dos três tubos de 50 ml, foram aspiradas e filtradas

com filtro separador de fases, humedecido com diclorometano, para dois balões de rotoevaporador, previamente tarados como descrito anteriormente para análise ponderal. A fase orgânica do terceiro tubo de 50 ml foi recolhida para um tubo de vidro de 23 ml para análise do perfil de ácidos gordos.

Os solventes dos balões foram evaporados em rotoevaporador, a 40 °C, e o solvente do tubo, sob corrente de azoto (Cilindro de azoto:CG220, Linde Sogás, Lda., Lisboa, Portugal), a 30 °C. Os resíduos dos balões foram secos na estufa a 70 °C durante 2 horas, arrefecidos no exsiccador e pesados 1 hora depois para determinar os lípidos totais. Ao resíduo do tubo procedeu-se à transesterificação combinada dos ácidos gordos. Os cálculos do teor lipídico foram efetuados recorrendo à relação seguinte:

$$\text{Lípidos totais} = \Delta M \times 100/m$$

Sendo:

$$\Delta M = M2 - M1$$

M2 = massa do balão com o resíduo, expressa em g

M1 = massa do balão, expressa em g

M = massa da toma de ensaio, expressa em g

O teor em lípidos totais de cada amostra foi calculado pela média aritmética de duas determinações efetuadas em paralelo, aceitando-se um coeficiente de variação inferior a 15 %.

3.4 - Determinação do perfil de ácidos gordos

A transesterificação combinada dos ácidos gordos totais foi desenvolvida segundo o método descrito por Raes *et al.* (2001). De forma sucinta, para esta determinação dissolveu-se o resíduo do tubo de 23 ml, obtido na técnica anterior, em 1 ml de tolueno seco. Adicionaram-se 100 µl de padrão interno (FAME C21:0 10 mg/ml) e 3 ml de solução de metóxido de sódio 0,5 M, agitou-se fortemente em vórtex, e a reação foi colocada no banho com agitação a 50°C durante 10 minutos, deixando depois arrefecer à temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se 2 ml de HCL/metanol (1/1, v/v), agitou-se de novo em vórtex, 10 segundos, e colocou-se novamente no banho com agitação a 50 °C durante 10 minutos, arrefecendo depois à temperatura ambiente. No fim da reação adicionou-se 2 ml de água Milli Q (ou de qualidade) agitou-se no vórtex durante

10 segundos. Seguidamente a adição de 3 ml de *n*-hexano, agitando-se no vórtex, durante 10 segundos, e o homogeneizado foi centrifugado a 2500 r.p.m. durante 5 minutos.

O sobrenadante (fase orgânica) foi recolhido para um tubo de 16 ml, sendo esta extração efetuada por duas vezes, combinando a totalidade da fase orgânica no mesmo tubo. Às fases recolhidas foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro, tendo estas sido agitadas em vórtex durante 10 segundos e centrifugadas a 2500 r.p.m., durante 10 minutos. De seguida, o extrato orgânico foi aspirado para um tubo de 16 ml evaporado sob corrente de azoto à temperatura ambiente até à secura, adicionando depois 1 ml de *n*-hexano, vórtex 10 segundos e recolher este volume para vial de GC. O volume injetado foi de 1 µl de amostra.

Os esteres metílicos dos ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa, realizada em coluna (HP6890A, Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA), equipado com um detetor de ionização de chama e uma coluna capilar CP-Sil 88 (100 m; 0.25 mm i.d.; 0,20 mm de espessura capilar), (Chrompack, Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). As condições do cromatografo foram as seguintes:

temperatura do injetor 250 °C temperatura do detetor 280 °C; o gás de arraste utilizado foi hélio com um fluxo de 1,0 ml/min e *split ratio* de 1:30. A coluna foi aquecida inicialmente a 50 °C durante 4 minutos, e a temperatura foi programada para aumentar até 175 °C com um gradiente de 13 °C/min durante 20 minutos seguida de um gradiente de 4 °C/min até 275 °C durante 44 minutos.

Os FAME foram separados e quantificados por um método de adição de padrão interno. A sua identificação foi realizada comparando os tempos de retenção dos picos das amostras com os das misturas padrão de referência. Os ácidos gordos foram expressos como percentagem da soma dos ácidos gordos identificados (% peso).

A análise dos resultados apresentados no Quadro 5, mostra que o ácido gordo que se encontra em maior percentagem em todas as dietas é o 18:2 *n*-6 (ácido linoleico), destacando-se a dieta, Controlo com a percentagem mais elevada deste ácido gordo essencial. Em contraste, o ácido gordo em menor quantidade nos animais que consumiram a dieta, Controlo é o 14:0 (ácido mirístico), enquanto que nos outros grupos é o 17:0 (ácido margárico).

Quadro 5- Composição em ácidos gordos (% ácidos gordos totais) das dietas experimentais usadas para alimentação dos frangos em crescimento.

Ácidos Gordos	CONTROLO	MA	MAR	MAL
14:0	0,07	0,21	0,18	0,20
16:0	12,87	19,50	19,42	20,47
16:1c9	0,09	1,32	1,29	1,41
17:0	0,10	0,11	0,13	0,12
18:0	2,56	2,23	2,18	2,37
18:1c9	23,72	19,47	20,62	20,70
18:1c11	1,10	0,88	0,93	0,94
18:2n-6	52,41	43,11	45,34	43,20
18:3n-3	3,68	2,35	2,32	2,39

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima.

3.5 - Determinação do teor de colesterol total e vitamina E

Como podemos observar, pela análise dos resultados resumidos no Quadro 6, não houve diferenças significativas nas diferentes dietas. O β -caroteno teve uma menor expressão na dieta, Controlo, tendo o valor mais elevado na dieta MAL (lisoizima + alga). Em relação ao α -Tocoferol apresentou um valor mais elevado na dieta MA e mais baixo na dieta do grupo Controlo. O α -Tocotrienol teve valores superiores na dieta Controlo e menor na dieta MAL, enquanto os valores de γ -Tocoferol foram superiores no grupo Controlo e inferiores no tratamento MAL. Os valores de γ -Tocotrienol, foram superiores no grupo Controlo e inferiores na dieta MAR (enzima comercial Rovabio), enquanto o δ -Tocoferol apresentou valores superiores para o tratamento, Controlo e valores mais baixos na dieta MA.

Quadro 6-Efeito das dietas no teor de β -caroteno e vitamina E nas dietas experimentais.

	Controlo	MA	MAR	MAL
β -Caroteno ($\mu\text{g/g}$)	0,48	26,5	28,1	31,5
α -Tocoferol ($\mu\text{g/g}$)	18,3	24,5	24,2	23,9
α -Tocotrienol ($\mu\text{g/g}$)	3,50	3,23	2,71	2,52
γ -Tocoferol ($\mu\text{g/g}$)	9,24	6,65	6,43	5,35
γ -Tocotrienol ($\mu\text{g/g}$)	6,89	5,32	4,80	5,07
δ -Tocoferol ($\mu\text{g/g}$)	1,75	0,80	0,82	0,83

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima

A quantificação simultânea do colesterol total, tocoferóis e tocotrienóis na carne foi realizada conforme descrito por Prates *et al.*, (2006). Este método envolve a saponificação direta da carne fresca (0,75 g), e uma única extração com *n*-hexano, usando deteções de fluorescência (tocopheróis e tocotrienóis) e de fotodíodos no UV-visível (colesterol).

Foram pesadas cerca de 0,75 g de carne fresca, previamente picada, para 2 tubos de 16 ml (feito em duplicado). Adicionou-se 0,20 g de ácido ascórbico e 5,5 ml de solução de saponificação (KOH+H₂O), agitou-se de imediato por 10 segundos para evitar a aglomeração dos fragmentos da amostra. O ar dos tubos foi substituído por azoto e estes foram tapados cerca de 60 segundos. Agitou-se em vórtex até dissolver completamente o ácido ascórbico, seguido de aquecimento em banho-maria a 80 °C, durante 15 minutos, com agitação a 200 r.p.m. Os tubos foram arrefecidos em água fria durante 1 minuto, adicionou-se 1,5 ml de água destilada e 3 ml *n*-hexano e agitou-se vigorosamente no vórtex durante 2 minutos, sendo depois as amostras centrifugadas a 2500 g durante 5 minutos. A fase do *n*-hexano (superior) foi aspirada para tubos de 16 ml, já com sulfato de sódio anidro adicionado, e a reação agitada em vórtex 10 segundos. Uma alíquota da amostra foi filtrada por filtro de seringa hidrofóbico 0,45 μm para um frasco de âmbar de 1,5 ml para HPLC.

O valor de colesterol total, tocoferóis e tocotrienóis foram calculados em duplicado como já referido para cada amostra com base na técnica do padrão externo, a partir da área do pico da curva-padrão *versus* concentração.

3.6 - Determinação do teor em carotenoides totais

O teor de carotenoides totais foi realizado como descrito por Hynstova *et al.*, (2018).

Pesaram-se 10 mg de amostra (em triplicado) para tubo eppendorf (2 ml) e adicionamos 1 ml de acetona. Colocamos uma esfera metálica no interior do eppendorf e tapou-se com parafilm a tampa, seguidamente levamos o eppendorf ao Tissue Lyser II (Quiagen) durante 2 minutos em ciclos e 30 segundos ($4 \times$) à frequência de 25 Hz. Retirou-se o parafilm, e com o auxílio de um íman retiramos também a esfera metálica. Centrifugaram-se as amostras na centrífuga MiniSpin Plus da Eppendorf durante 5 minutos a 14.1 rcf. Transferiu-se o sobrenadante para um novo eppendorf, previamente identificado e descartou-se o pellet. Transferimos depois o sobrenadante para uma cuvete resistente à acetona e mediu-se as absorvâncias no espectrofotômetro UV/Visível a 5 comprimentos de onda ($\lambda = 470, 645, 653, 654, 662$ nm) utilizando acetona como branco. Efetuaram-se os cálculos segundo as seguintes equações para quantificar os pigmentos ($\mu\text{g/ml}$):

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 11.24 \times A_{662} - 2.04 \times A_{645}$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 20.13 \times A_{645} - 4.19 \times A_{662}$$

$$\text{Clorofilas Totais (Ca+b)} = 7.05 \times A_{662} + 18.09 \times A_{645}$$

$$\text{Carotenoides Totais (Cx+c)} = (1000 \times A_{470} - 1.90 \times Ca - 63.14 \times Cb) / 214$$

$$\text{Clorofilas e Carotenoides Totais} = (Ca+b) + (Cx+c)$$

$$\text{Feofitinas Totais} = (321.3 \times A_{653}) - (208.4 \times A_{654})$$

Os resultados finais foram expressos em mg por grama de carne.

3.7 - Determinação da oxidação lipídica da carne

Retirou-se aproximadamente 15 g de carne do peito e da coxa do lado esquerdo de cada animal. Esta foi picada e dividida em 4 porções, e mantida por 0, 2, 4 e 6 dias a 4 °C, exposta ao ar, em sacos de plástico. A oxidação da carne foi determinada no dia 0, 2, 4 e 6 pela técnica do ácido tiobarbitúrico de acordo com Grau *et al.*, (2000). Pesou-se, em duplicado, cerca de 1,5 g de carne fresca previamente descongelada para 2 tubos de 50 ml com tampa. Adicionou-se de seguida 1 ml de solução aquosa EDTA a 0,3 %, e a reação foi homogeneizada cuidadosamente. Seguidamente adicionaram-se 5 ml de BHT em *n*-hexano 0,8 %, homogeneizou-se com cuidado, e por fim adicionou-se 8 ml de TCA 5 %. De seguida a suspensão foi homogeneizada num Ultra-Turrax durante 30 segundos. A amostra foi centrifugada 5 minutos a 1400 g, descartando a fase superior (*n*-hexano),

tendo sido filtrado o volume restante por um filtro Whatman nº1 para um tubo graduado de 16 ml. O volume do filtrado foi ajustado a 10 ml com solução de TCA 5 % e agitando no vórtex durante 10 segundos. Retiraram-se 3 ml da mistura anterior para um tubo de vidro com tampa (16 ml) e adicionou-se 2 ml de TBA 0,8 %, tendo-se incubado a mistura no banho a 70° C durante 30 minutos, com pequena agitação. Os tubos foram arrefecidos em água ou gelo durante 5 minutos, medindo-se posteriormente as absorvências a 532 nm contra um branco (mistura de 3 ml TCA 5 % + 2 ml TBA 0,8 %). Os resultados finais foram expressos em miligramas de MDA (malondialdeído) por kg de carne.

3.8 - Análise estatística

A análise estatística foi efetuada recorrendo à análise de variância usando o procedimento General Linear Models do programa estatístico SAS (SAS, 2001). As médias com valor de F significativo ($P < 0,05$) foram comparadas usando o teste de Duncan. As diferenças entre médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. A unidade experimental utilizada foi a gaiola para os resultados da performance zootécnica e o animal para as análises laboratoriais.

4 - Resultados

4.1 - Avaliação da atividade enzimática dos conteúdos digestivos e dos regimes alimentares

A capacidade das principais enzimas dos vários suplementos enzimáticos para se manterem ativas durante a passagem no trato gastro intestinal dos animais foi monitorizada conforme referido na secção de material e métodos. Os resultados qualitativos foram avaliados através da observação da formação de halos em ensaios estabelecidos em placa (Figura 12). Os resultados globais encontrados estão resumidos nos quadros seguintes, encontrando-se divididos para cada uma das atividades enzimáticas medidas, xilanase (quadro 7), β -glucanase (quadro 8) e lisozima (quadro 9).

Quadro 7-Avaliação da atividade xilanásica dos conteúdos digestivos.

	Controlo	MA	MAR	MAL
Papo	-/-/-/-/+/-	-/-/-/-/-/-/-	-/-/-/-/-/+/-/-	-/+/-/+/-/-/-
Moela	-/-/-	-/-/-/-/-/-/-	-/-/-/-/-/-	-/-/-/-/-/-
Duodeno	-/-/-/-/-/-/-	-/-/-/-/-/-/-/-	-/-/-/+/-/+/-/-	-/-/-/-/-/-/-
Jejuno	-/-/-/-/-/-/-	+/-/-/-/+/-/-/-	-/-/-/-/-/-/-/-	-/-/+/-/+/-/+/-
Íleo	-/-/-/-/-/+/-	+/-/-/+/-/-/-/-	+/-/-/-/-/-/-/-	+/-/-/+/-/+/-/+
Ceco	-/+/-/+/-/+/-/+	+/-/+/-/+/-/+/-/+	+/-/+/-/+/-/+/-/+	+/-/+/-/+/-/+/-/+

A cada linha correspondem os resultados da atividade enzimática de cada região do tubo digestivo, 10 animais por tratamento. A atividade enzimática foi classificada em existente (+), e não existente (-).

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima.

No que diz respeito às xilanases, a atividade enzimática nos papos é pouco evidente em todos os tratamentos, tal como na moela e duodeno. No jejuno e íleo há alguma atividade, não sendo muito expressiva, enquanto no ceco existe uma elevada atividade, dado nos frangos ser um local onde se verificam elevadas fermentações microbianas.

Quadro 8-Avaliação da atividade glucanásica dos conteúdos digestivos.

	Controlo	MA	MAR	MAL
Papo	-/+ / +/+ / +	-/+ / +/+ / -/+	+ / + / + / - / + / + / +	+ / + / - / - / + / - / -
Moela	- / - / +	- / + / + / - / -	- / - / - / -	- / + / - / - / -
Duodeno	- / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / + / + / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -
Jejuno	- / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -
Íleo	- / - / - / + / + / - / - / - / -	- / - / - / + / + / - / - / -	- / - / - / - / + / - / - / - / -	- / - / - / - / + / - / - / - / -
Ceco	+ / + / + / + / + / + / + / +	+ / + / + / + / + / + / + / +	+ / + / + / + / + / + / + / +	+ / + / + / + / + / + / + / +

A cada linha correspondem os resultados da atividade enzimática de cada região do tubo digestivo, 10 animais por tratamento. A atividade enzimática foi classificada em existente (+), e não existente (-).

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima.

Os papos apresentaram atividade glucanásica em todas as dietas, com mais expressão nas dietas Controlo e MA (contém a microalga). Não houve evidências significativas de atividade enzimática na moela, duodeno, jejuno e íleo. Os cecos apresentaram atividade enzimática em todas as dietas, por ser um local de elevada fermentação microbiana.

Quadro 9-Avaliação da atividade da lisoizima nas amostras dos conteúdos digestivos.

	Controlo	MA	MAR	MAL
Papo	- / - / - / -	- / - / - / - / -	- / - / - / - / - / -	- / - / - / + / - / -
Moela	- / - / -	- / - / - / - / - / -	- / - / - / - / -	- / - / + / - / - / - / -
Duodeno	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / +
Jejuno	- / - / - / - / - / - / - / -	+ / + / + / + / - / + / + / + / +	+ / + / + / + / + / + / + / -	+ / + / + / + / + / + / + / +
Íleo	- / - / - / - / - / - / - / -	+ / + / + / + / + / + / + / +	+ / + / + / + / + / + / + / +	+ / + / + / - / + / + / + / + / +
Ceco	- / - / - / - / + / + / -	+ / - / + / + / + / +	+ / + / + / + / + / + / +	+ / + / + / + / + / + / + / +

A cada linha correspondem os resultados da atividade enzimática de cada região do tubo digestivo, 10 animais por tratamento. A atividade enzimática foi classificada em existente (+), e não existente (-).

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima.

Em relação à lisoizima, não se detetou atividade enzimática no papo, moela e duodeno. No jejuno e no íleo obtivemos atividade enzimática em todos os tratamentos, menos no controlo. Os cecos apresentaram atividade enzimática em todos os tratamentos, por ser um local de elevadas fermentações microbianas.

Figura 12-Exemplo da atividade enzimática basal do alimento, tendo o β -glucano (esquerda) e o *Micrococcus lysodeikticus* (direita) como substratos.



Verifica-se, atividade enzimática em todos os poços sendo esta mais evidente na dieta MA, isto para o β -glucano, enquanto para a atividade da lisozima é mais evidente na dieta MAL.

Figura 13-Exemplo da técnica utilizada para avaliar a atividade enzimática (xilanásica, glucanásica e lisozima) nos conteúdos digestivos dos animais.



Dieta-MAR-Xilanase

Dieta-MA-Glucanase

Dieta-MAL-Lisozima

4.2 - Performances zootécnicas

No que diz respeito às performances zootécnicas, os animais do grupo Controlo obtiveram melhores parâmetros produtivos relativamente aos grupos de animais alimentados a microalga *Arthrospira platensis*.(quadro 10)

Quadro 10-Efeito da dieta no período experimental, na evolução do peso (g), de frangos alimentados com dietas contendo microalgas e suplementadas com diferentes misturas enzimáticas.

	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
Dia 21	722,80	741,93	786,83	727,67	24,769	0,2625
Dia 28	1244,43	1198,07	1224,90	1136,93	32,301	0,1175
Dia 35	1802,43 ^b	1697,50 ^{ab}	1717,00 ^{ab}	1613,07 ^a	39,158	0,0158

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima. **a-b**- Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

4.3 - Qualidade nutricional dos lípidos da carne

No final do ensaio vários animais representativos de cada tratamento foram sacrificados e a qualidade da fração lipídica muscular avaliada.

4.3.1 - Lípidos totais

O teor de lípidos totais nos músculos (peito e coxa) dos frangos em estudo foi mais elevado na coxa (3,05 % - 3,60 %), do que no peito (1,29 % - 1,57 %), em todas as dietas analisadas (Quadro 14 e 15). A, carne do peito dos animais do tratamento MAR revelou possuir um valor superior em lípidos totais relativamente aos animais do tratamento MAL ($p < 0,05$)

Não se observaram diferenças na quantidade de lípidos na carne dos animais do tratamento controlo relativamente aos animais das dietas suplementadas só com a microalga e/ou microalga mais enzimas. Na coxa não se observaram diferenças na quantidade de lípidos dos animais dos diferentes tratamentos (Quadro 14 e 15).

4.3.2 - Ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos das dietas e dos músculos dos animais dos diferentes tratamentos foi determinada conforme referido na secção de material e métodos. Nos quadros seguintes apresentam-se os principais resultados obtidos.

Em relação à composição em ácidos gordos do peito existe uma grande homogeneidade, quando comparados os músculos dos animais dos vários tratamentos, com exceção de alguns ácidos gordos, (Quadro 11). Assim, observam-se diferenças significativas. na percentagem do ácido palmítico no musculo de animais que receberam a dieta Controlo relativamente aos animais que consumiram a dieta MAR. Relativamente aos ácidos gordos 17: 0, 17:1*c*9, 18:2 *n*-6, 18:3 *n*-6, 18:3 *n*-3, 20:3 *n*-6 os valores apresentados em animais do grupo Controlo são diferentes dos outros tratamentos, os quais são iguais entre si. Relativamente ao 18:1*c*11 o tratamento, Controlo é diferente dos valores apresentados pelo grupo MAL; verificando-se que para o ácido gordo 20:1*c*11 a carne do grupo Controlo e MA são diferentes entre si mas iguais aos grupos MAR e MAL. Finalmente, o ácido gordo 22:1 *n*-9 é diferente entre os animais Controlo e os MAR mas apresenta valores iguais aos outros tratamentos.

No que diz respeito aos somatórios parciais dos ácidos gordos, verificaram-se diferenças nos totais de SFA e *n*-3 PUFA, sendo que os animais que receberam as dietas, Controlo apresentam valores diferentes dos animais dos restantes grupos. Nas relações entre os ácidos gordos *n*-6/*n*-3 e PUFA/SFA o mesmo comportamento foi observado, ou seja, a carne do grupo Controlo é diferente da carne que foi obtida de animais alimentados com as outras dietas.

Quadro 11-Teores de lípidos totais (g/100g de carne), e composição em ácidos gordos (% ácidos gordos totais) do peito de frango.

	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
Lípidos totais g / 100 g carne	1,33ab	1,36ab	1,57b	1,29a	0,071	0,039
Composição em AG						
10:0	0,10	0,12	0,11	0,12	0,012	0,6786
12:0	0,03	0,03	0,03	0,04	0,007	0,9395
14:0	0,40	0,36	0,37	0,37	0,010	0,1598
14:1c9	0,08	0,07	0,08	0,08	0,006	0,7287
15:0	0,09	0,09	0,08	0,08	0,006	0,5705
DMA16:0	2,46	3,08	2,95	3,04	0,229	0,2056
16:0	19,94 ^a	20,83 ^{ac}	20,67 ^{ac}	21,31 ^c	0,253	0,0051
16:1c7	0,52	0,53	0,55	0,49	0,025	0,4140
16:1c9	3,16	3,40	3,76	3,75	0,222	0,1823
17:0	0,21 ^a	0,38 ^b	0,35 ^b	0,39 ^b	0,013	<0,0001
17:1c9	0,05 ^a	0,09 ^b	0,10 ^b	0,10 ^b	0,005	<0,0001
DMA18:0	0,61	0,71	0,73	0,69	0,056	0,4402
DMA18:1	0,63	0,64	0,59	0,63	0,048	0,9100
18:0	7,70	8,13	7,84	8,01	0,234	0,5919
18:1c9	26,38	24,88	24,85	24,94	0,761	0,4208
18:1c11	2,42 ^a	2,65 ^{ab}	2,70 ^{ab}	2,72 ^b	0,073	0,0235
18:2n-6	20,64 ^a	18,02 ^b	17,72 ^b	17,89 ^b	0,319	<0,0001
18:2t9t12	0,05	0,04	0,04	0,04	0,002	0,0724
18:3n-6	0,20 ^a	0,56 ^b	0,56 ^b	0,54 ^b	0,028	<0,0001
18:3n-3	1,04 ^a	0,65 ^b	0,66 ^b	0,66 ^b	0,034	<0,0001
20:0	0,06	0,06	0,07	0,06	0,008	0,5798
20:1c11	0,39 ^a	0,27 ^b	0,34 ^{ab}	0,33 ^{ab}	0,027	0,0258
20:2n-6	0,66	0,56	0,54	0,57	0,043	0,2108
20:3n-6	0,97 ^a	1,37 ^b	1,35 ^b	1,41 ^b	0,072	0,0003
20:4n-6	3,92	4,89	4,66	4,65	0,369	0,2838
20:3n-3	0,10	0,08	0,07	0,08	0,007	0,0663
20:5n-3	0,20	0,18	0,19	0,19	0,014	0,7134
22:0	0,05	0,05	0,05	0,06	0,005	0,4604
22:1n-9	0,12 ^a	0,10 ^{ab}	0,09 ^b	0,11 ^{ab}	0,007	0,0070
22:5n-3	0,63	0,61	0,59	0,58	0,048	0,8905
22:6n-3	0,39	0,47	0,46	0,47	0,043	0,4929
Outros	5,82	6,11	6,86	5,60	0,389	0,1344
Somatórios parciais dos ácidos gordos (g / 100 g AGT)						
SFA	28,57 ^a	30,05 ^b	29,59 ^b	30,44 ^b	0,247	<0,0001
MUFA	33,12	31,98	32,45	32,52	0,909	0,8501
PUFA	28,78	27,43	26,84	27,06	0,530	0,0605
DMA	3,69	4,43	4,28	4,36	0,311	0,3329
n-6 PUFA	26,39	25,39	24,83	25,04	0,468	0,1072
n-3 PUFA	2,35 ^a	1,98 ^b	1,97 ^b	1,97 ^b	0,078	0,0023
Índices nutricionais dos ácidos gordos						
n-6/n-3	11,26 ^a	13,02 ^b	12,73 ^b	12,77 ^b	0,338	0,0029
PUFA/SFA	1,01 ^a	0,91 ^b	0,91 ^b	0,89 ^b	0,02	0,0008

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA-**regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR-**regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL-**regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima - **a-b-c** Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

Relativamente aos ácidos gordos da coxa, cujos resultados se encontram resumidos no (quadro 12), verifica-se igualmente que genericamente os valores são muito homogéneos, com algumas exceções. Assim os ácidos gordos 14:0 e 18:4 *n*-3 apresentam valores diferentes no músculo dos animais que receberam a dieta MAR sendo os valores observados em animais de outros tratamentos iguais entre si. No que concerne aos ácidos gordos 14:1*c*-9, 16:0, 16:1*c*-9 a carne dos animais, Controlo é diferente da dos tratamentos MAR e MAL, mas idêntica à dieta MA. Nos ácidos gordos 17:0, 17:1*c*-9, 18:3 *n*-6, 18:3 *n*-3, o grupo Controlo é diferente dos outros 3 grupos. Finalmente, no ácido gordo 18:2 *n*-6 a composição do musculo dos animais, Controlo é diferente quando comparada com animais do tratamento MA e MAR, mas idêntica aos animais do grupo MAL.

Nos somatórios parciais de ácidos gordos os valores de SFA e *n*-3 PUFA foram diferentes quando comparados os valores dos Controlo com os restantes grupos de animais, enquanto os PUFA e os *n*-6 PUFA, o tratamento, Controlo é diferente do grupo MAR, mas ambos os tratamentos não apresentam diferenças relativamente aos grupos restantes. Nas relações *n*-6/*n*-3 e PUFA/SFA a dieta, Controlo é diferente da dos restantes grupos, tal como se verificou na carne do peito.

Quadro 12-Teores de lípidos totais (g/100g de carne), e composição em ácidos gordos (% ácidos gordos totais) da coxa de frango.

	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
Lípidos totais g / 100 g carne	3,45	3,05	3,56	3,60	0,301	0,560
Composição em AG						
10:0	0,03	0,03	0,02	0,02	0,003	0,5095
12:0	0,04	0,02	0,02	0,02	0,010	0,3596
14:0	0,40 ^a	0,41 ^a	0,45 ^b	0,43 ^a	0,010	0,0074
14:1c9	0,12 ^a	0,12 ^{ab}	0,15 ^b	0,14 ^b	0,008	0,0126
15:0	0,07	0,07	0,08	0,08	0,004	0,3450
DMA16:0	0,75	0,88	0,68	0,67	0,122	0,6072
16:0	20,86 ^a	22,05 ^{ab}	22,83 ^b	22,72 ^b	0,320	0,0003
16:1c7	0,49	0,55	0,52	0,53	0,020	0,2381
16:1c9	4,74 ^a	5,45 ^{ab}	5,98 ^b	6,01 ^b	0,260	0,0041
17:0	0,14 ^a	0,27 ^b	0,27 ^b	0,27 ^b	0,012	<0,0001
17:1c9	0,07 ^a	0,11 ^b	0,12 ^b	0,12 ^b	0,006	<0,0001
DMA18:0	0,21	0,23	0,20	0,18	0,030	0,6669
DMA18:1	0,16	0,17	0,11	0,12	0,028	0,3260
18:0	6,12	6,23	6,03	5,94	0,175	0,6871
18:1c9	32,86	32,52	33,04	33,04	0,684	0,9407
18:1c11	2,02	2,15	2,19	2,19	0,054	0,1038
18:2n-6	22,85 ^a	20,09 ^b	18,86 ^b	20,26 ^{ab}	0,694	0,0024
18:2t9t12	0,06	0,05	0,04	0,05	0,004	0,1980
18:3n-6	0,30 ^a	0,71 ^b	0,63 ^b	0,68 ^b	0,045	<0,0001
18:3n-3	1,43 ^a	1,04 ^b	0,97 ^b	1,07 ^b	0,058	<0,0001
18:4n-3	0,06 ^a	0,04 ^a	0,04 ^b	0,04 ^a	0,004	0,0187
20:0	0,14	0,08	0,09	0,11	0,030	0,5084
20:1c11	0,28	0,27	0,28	0,250	0,012	0,3310
20:2n-6	0,25	0,21	0,18	0,190	0,020	0,1627
20:3n-6	0,40	0,58	0,46	0,47	0,048	0,0712
20:4n-6	1,54	1,74	1,42	1,43	0,179	0,5715
20:3n-3	0,04	0,04	0,04	0,04	0,004	0,4691
20:5n-3	0,07	0,06	0,06	0,06	0,007	0,2192
22:0	0,04	0,04	0,03	0,04	0,006	0,3347
22:1n-9	0,08	0,08	0,09	0,08	0,012	0,9283
22:5n-3	0,23	0,20	0,17	0,18	0,024	0,2215
22:6n-3	0,15	0,18	0,15	0,15	0,019	0,6755
Outros	3,00	3,43	3,84	2,40	0,413	0,1117
Somatórios parciais dos ácidos gordos (g / 100 g AGT)						
SFA	27,84 ^a	29,19 ^b	29,81 ^b	29,63 ^b	0,326	0,0005
MUFA	40,66	41,26	42,35	42,37	0,832	0,3878
PUFA	27,39 ^a	24,93 ^{ab}	23,01 ^b	24,63 ^{ab}	0,884	0,0122
DMA	1,12	1,28	0,99	0,97	0,178	0,5912
n-6 PUFA	25,34 ^a	23,33 ^{ab}	21,56 ^b	23,04 ^{ab}	0,820	0,0227
n-3 PUFA	2,00 ^a	1,56 ^b	1,42 ^b	1,54 ^b	0,068	<0,0001
Índices nutricionais dos ácidos gordos						
n-6/n-3	12,75 ^a	14,96 ^b	15,61 ^b	15,01 ^b	0,330	<0,0001
PUFA/SFA	0,98 ^a	0,85 ^b	0,78 ^b	0,83 ^b	0,034	0,0011

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA-**regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR-**regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL-**regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima - **a-b** Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

4.3.3 - Teores de colesterol total e vitamina E

Os teores totais de colesterol e vitamina E das dietas e dos músculos do peito e da coxa foram determinados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com detetores de fluorescência e de díodos em série, tal conforme referido na secção de material e métodos.

Desta forma, verifica-se que a suplementação e a composição lipídica das dietas não afetaram o colesterol total para os músculos analisados. Como era esperado, a carne do peito apresentou níveis mais baixos de colesterol do que a carne da coxa (quadro 13 e 14), tendo esta maior quantidade de gordura devido a um maior nível de TAG. No geral, os dados sugerem que as diferentes dietas testadas não tiveram impacto nos níveis de colesterol da carne.

Assim, de forma resumida, verifica-se que os teores de colesterol encontrados nas dietas e nos músculos analisados está de acordo com outros estudos (Ayerza *et al.*, 2002; Ponte *et al.*, 2008; Ponte *et al.*, 2004b).

Quadro 13-Efeito do regime no teor de colesterol e vitamina E no peito de frango.

	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
Colesterol (mg/g)	0,62	0,67	0,68	0,62	0,039	0,5249
α -Tocoferol (μ g/g)	4,03 ^a	2,18 ^b	2,18 ^b	2,35 ^b	0,187	<0,0001
γ -Tocoferol (μ g/g)	0,62 ^a	0,27 ^b	0,28 ^b	0,29 ^b	0,033	<0,0001

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisozima. **a-b** Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

Quadro 14-Efeito do regime no teor de colesterol e vitamina E na coxa de frango.

	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
Colesterol (mg/g)	0,73	0,73	0,77	0,73	0,028	0,7446
α -Tocoferol (μ g /g)	7,33 ^a	3,65 ^b	3,29 ^b	4,33 ^b	0,294	<0,0001
α -Tocotrienol (μ g /g)	0,31	0,25	0,26	0,30	0,027	0,2962
γ -Tocoferol (μ g /g)	0,66 ^a	0,35 ^b	0,31 ^b	0,38 ^b	0,033	<0,0001
γ -Tocotrienol (μ g /g)	0,29	0,25	0,30	0,30	0,039	0,7670

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisozima. **a-b** Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

A análise mostrou que o teor de colesterol total no músculo do peito e da coxa não tiveram diferenças significativas quando comparados animais alimentados com diferentes dietas, enquanto na vitamina E (α -Tocoferol, γ -Tocoferol) já se observaram diferenças entre

animais do grupo Controlo relativamente aos animais que receberam tratamentos contendo a microalga (MA, MAR e MAL). A diferença que se registou foi o músculo da coxa conter α -Tocotrienol e γ -Tocotrienol (quadro 14) enquanto no peito (quadro 13) isso não se ter verificado. Curiosamente, o δ -tocotrienol e o γ -tocotrienol estão ausentes no músculo do peito ao contrário do músculo da coxa, onde estes constituintes foram identificados em quantidades muito pequenas. As dietas com a microalga e microalga mais Rovabio tiveram menores teores de α -tocoferol no peito e na coxa, bem como menor γ -tocoferol no musculo da coxa, do que no controle. As dietas não influenciaram os homólogos de vitamina E, resultando numa diminuição no tocoferol, o composto com ação antioxidante mais importante da carne.

4.3.4 - Teor total de carotenoides

Como podemos observar da análise nos quadros 15 e 16 não se registaram diferenças significativas entre o peito e a coxa de frango para o total de carotenoides, clorofilas A e B, e totais de clorofilas, carotenoides e feofitinas.

Quadro 15-Efeito do tratamento nos carotenoides do peito de frango.

Peito (mg/g carne)	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
Total carotenoides	0,652	0,808	0,864	0,858	0,064	0,084
Clorofila a	2,987	2,975	2,525	2,294	0,419	0,576
Clorofila b	5,388	5,754	4,688	4,593	0,751	0,648
Total clorofilas	8,375	8,729	7,213	6,887	1,153	0,622
Total clorofilas e total carotenoides	9,027	9,538	8,077	7,746	1,183	0,690
Total feofitinas	39,22	39,70	32,76	32,63	5,241	0,647

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima

Quadro 16-Efeito do tratamento nos carotenoides da coxa de frango.

Coxa(mg/g carne)	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
Total carotenoides	0,533	0,838	0,870	0,718	0,092	0,058
Clorofila a	3,042	3,531	4,512	2,982	0,653	0,332
Clorofila b	5,455	5,787	7,812	5,206	1,127	0,357
Total clorofilas	8,497	9,319	12,32	8,188	1,770	0,346
Total clorofilas e total carotenoides	9,028	10,16	12,67	8,906	1,788	0,425
Total feofitinas	38,97	39,90	55,13	36,37	8,063	0,358

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima

4.3.5 - Avaliação da oxidação lipídica da carne

Como podemos observar nos quadros 17. e 18, a estabilidade oxidativa das carnes de peito e coxa, após 2, 4 ou 6 dias de armazenamento a 4 °C não foi afetada significativamente. No entanto verifica-se uma maior suscetibilidade da carne da coxa à oxidação, o que pode resultar de um conteúdo lipídico superior (Betti *et al.*, 2009; Leskanich e Noble, 1997).

Quadro 17-Efeito do regime no TBA no peito (mg MDA/kg carne).

	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
TBA Dia 0	0,266	0,248	0,241	0,320	0,025	0,140
TBA Dia 2	0,390	0,274	0,356	0,346	0,099	0,866
TBA Dia 4	0,279	0,236	0,326	0,328	0,078	0,814
TBA Dia 6	0,398	0,266	0,423	0,370	0,117	0,790

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima.

Quadro 18-Efeito do regime no TBA na coxa (mg MDA/kg carne).

	Controlo	MA	MAR	MAL	SEM	P-value
TBA Dia 0	0,369	0,322	0,317	0,317	0,037	0,709
TBA Dia 2	0,434	0,521	0,491	0,545	0,067	0,676
TBA Dia 4	0,378	0,448	0,421	0,387	0,025	0,212
TBA Dia 6	0,559	0,613	0,429	0,516	0,066	0,266

Controlo- regime alimentar à base de milho e soja; **MA**-regime alimentar com 15% de microalgas; **MAR**-regime alimentar com 15% de microalgas+enzima comercial Rovabio Excel AP; **MAL**-regime alimentar com 15% de microalgas+lisoizima.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da utilização de CAZymes exógenas sobre a melhoria da eficiência da incorporação de microalgas em dietas à base de milho e bagaço de soja para frangos em crescimento. Para além de poderem contribuir para a riqueza em energia e proteína da dieta (Derner *et al.*, 2006; Aikawa *et al.*, 2013), as microalgas são importantes constituintes ricos em compostos bioativos (Aikawa *et al.*, 2013) que poderão melhorar a qualidade da carne (Rymer *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013; Madeira *et al.*, 2017). Assim, de forma genérica, pretendeu-se com este trabalho avaliar o efeito da incorporação de microalgas e da suplementação enzimática no desempenho produtivo das aves, tendo-se estimado igualmente eventuais impactos na qualidade da carne. A microalga utilizada neste trabalho foi a Spirulina (*Arthrospira platensis*), originária da China, e cultivada durante todo o ano. A Spirulina é uma microalga azul esverdeada de forma helicoidal, apresentando-se como um pó verde-escuro com sabor e odor característicos (ficha técnica da Spirulina, nº182-V2, 2015). Esta microalga é rica em aminoácidos essenciais e reconhecidamente constitui-se como uma fonte natural de vitamina B (ficha técnica da Spirulina, nº182-V2, 2015). A sua cor deve-se à presença de clorofila, mas também a um outro pigmento (a ficocianina), tendo este uma ação desintoxicante (ficha técnica da Spirulina, nº182-V2, 2015) e sendo autorizada para fins alimentares, com aplicação em rações e aquacultura.

As enzimas que degradam hidratos de carbono estruturais, neste trabalho genericamente designadas por CAZymes, são extensamente utilizadas para melhorar o valor nutritivo de dietas à base de cereais, nomeadamente as ricas em cevada, trigo, aveia e centeio (Choct, 2006). A presença de elevadas quantidades de (PNA) solúveis nestes cereais, concretamente os arabinoxilanos, no caso das dietas ricas em trigo e centeio (Bedford, 2000), e dos glucanos na cevada e aveia (Bedford, 2000), conduz a um aumento significativo da viscosidade do digesta, resultando numa diminuição da ingestão e da digestibilidade do alimento, por diminuir a capacidade das enzimas digestivas endógenas atacarem os seus respetivos substratos (Pettresson e Aman 1989; Leeson *et al.*, 1996; Leeson *et al.* 2000; e Wang *et al.*, 2005). Assim sendo, de uma forma genérica o desempenho produtivo dos animais fica comprometido pela conjugação destes dois fatores, diminuição da ingestão e da digestibilidade alimentar.

A suplementação de dietas à base de cereais com CAZymes, xilanase nas dietas contendo trigo e centeio e glucanases nas dietas ricas em cevada e aveia, conduz a uma despolimerização parcial dos PNA solúveis resultando numa diminuição da viscosidade do digesta e dos constrangimentos nutricionais referidos anteriormente (Choct, 1997). Assim, a redução da viscosidade resulta numa melhoria da eficácia catalítica do reportório das enzimas digestivas endógenas e numa melhor digestão e absorção de nutrientes, melhorando-se a digestibilidade da energia, proteína e de outros nutrientes, daqui resultando um melhor desempenho das aves. Igualmente, verifica-se que as enzimas podem contribuir para degradar parcialmente as paredes celulares das células contendo elevado teor em nutrientes eventualmente encapsulados, libertando-os e tornando-os passíveis de serem despolimerizados pelas enzimas digestivas (Bedford, 2008).

Em estudos anteriores procurou usar-se CAZymes para suplementar dietas com teores elevados de PNA estruturais (Fontes *et al.*, 2004; Ponte *et al.*, 2008). Genericamente estes trabalhos mostram que quando é requerido uma degradação extensa de constituintes estruturais da parede celular as CAZymes têm uma capacidade limitada para melhorar a utilização digestiva do substrato. Várias razões foram avançadas para explicar esta observação, nomeadamente, a baixa eficiência das enzimas, o baixo tempo de atuação proporcionado pelo rápido trajeto do digesta no trato gastro intestinal das aves ou uma desadequação do perfil das enzimas ao substrato natural presente no alimento (Fontes *et al.*, 2004; Ponte *et al.*, 2008). Continua por se conhecer o efeito das CAZymes na melhoria do valor nutritivo de dietas contendo microalgas. No caso concreto deste trabalho, foi utilizada uma mistura de enzimas comercial (Rovabio) em cuja composição enzimática predominam as endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), e as endo-1,3- β -glucanases (EC 3.2.1.6-), de origem bacteriana produzida por *Talaromyces versatilis* (anteriormente designado por *Penicillium funiculosum*). Este produto hidrolisa os pentosanos e β -glucanos das matérias primas vegetais, melhorando o valor nutricional dos alimentos que contêm diferentes tipos de cereais. Proporciona ainda uma redução da viscosidade do conteúdo intestinal permitindo uma ação enzimática mais eficaz sobre os conteúdos digestivos e uma melhor digestão e absorção de nutrientes, levando a uma melhor utilização da energia, e à melhoria, do desempenho produtivo das aves. Em relação ao uso da lisozima, e após vários ensaios *in vitro* onde se testaram cerca de 200 enzimas, verificou-se que esta enzima é que obteve os melhores resultados no que concerne à degradação das paredes celulares da microalga usada neste estudo (cujo principal

constituente é o peptidoglucano), Richmond, (2004). Também devido às suas propriedades bactericidas, esta enzima pode ser utilizada como conservante na indústria alimentar, (Gosnell *et al.*, 1975).

Uma das melhores formas de estudar a resposta dos frangos à suplementação enzimática (Cowieson *et al.*, 2008), é através do ganho de peso, uma vez que a carne é o fator de interesse económico na produção avícola.

Neste estudo verificou-se que a inclusão das microalgas, a uma taxa de incorporação de 15 %, teve um efeito negativo no desempenho produtivo dos animais. Numa tentativa de melhorar a utilização digestiva dos animais as dietas contendo microalgas foram suplementadas com dois preparados enzimáticos diferentes, um à base de CAZymes e outro à base de lisozima. Conforme referido em estudos anteriores, as CAZymes não potenciaram uma melhor utilização digestiva da dieta. As mesmas explicações avançadas anteriormente podem explicar esta observação (Fontes *et al.*, 2004; Ponte *et al.*, 2008). Em contraste, a inclusão de lisozima na dieta à base de microalgas reduziu o desempenho produtivo dos animais. Embora este resultado seja surpreendente, o que parece plausível é a possibilidade da quebra do envelope celular da microalga poder libertar lipopolissacáridos que possam influenciar negativamente o desempenho produtivo dos animais. A identificação destes constituintes não está feita.

Relativamente à atividade enzimática, no papo, apenas se detetou atividade para a enzima glucanase. Na moela e no duodeno não se detetou atividade enzimática para nenhuma das enzimas, e o jejuno e o íleo apresentaram atividade expressiva para a xilanase e para a lisozima com exceção da dieta controlo. Nos cegos todas as enzimas apresentaram atividade enzimática, o que reflete a presença do reportório das enzimas microbianas produzidas pelo microbiota que coloniza este compartimento digestivo.

Segundo Choct (1997), a presença de PNA solúveis na dieta faz aumentar o tempo de permanência dos conteúdos digestivos no intestino, o que leva a uma diminuição do oxigénio, levando ao desenvolvimento de uma microflora anaeróbia e a atividade fermentativa. Como neste estudo as dietas fornecidas apresentavam uma baixa concentração de PNA solúveis, a pouca evidência de atividade enzimática ao longo do tubo digestivo poderá indicar que pode não ter ocorrido fermentação considerável, manifestando a baixa atividade enzimática. A atividade enzimática que se observa nos

cegos deve-se à existência de fermentações microbianas de natureza endógena, tal como sugere (Leeson *et al.*, 2001).

Neste trabalho foram ainda avaliados os efeitos da inclusão de microalgas e enzimas na qualidade da carne do peito e da coxa. Esta diferença deve-se ao facto dos músculos da coxa terem mais fibras musculares vermelhas do que o músculo peitoral, as quais são mais ricas em triacilgliceróis do que as fibras brancas. A suplementação com a microalga e/ou microalga e enzimas afetou os AGT em ambas as carnes ($p>0,05$).

O ácido gordo predominante na carne de frango de todos os tratamentos foi o ácido oleico (18:1 ω 9), quer no peito quer na coxa, sendo superior nesta última.

O segundo ácido gordo mais abundante na carne foi o LA (18:2 n -6) em ambas as carnes estudadas, tendo a ver com a composição base da dieta. Apenas na dieta controlo, no entanto, a percentagem deste ácido gordo diminuiu com a incorporação da microalga e microalga mais enzima, nas dietas ($p<0,001$), sendo que a dieta com a enzima comercial Rovabio conduziu a valores mais baixos nas duas carnes analisadas. Estes resultados devem-se ao facto da dieta controlo ter mais ácido linoleico do que as dietas incorporadas de microalga, o que está de acordo com resultados de Komprda *et al* (2005) e Ribeiro *et al.*, (2008). O ácido gordo LA é o precursor do n -6 PUFA, inicialmente convertido em ácido araquidónico (AA) e depois convertido em ácido docosapentaenóico (DPA) ou eicosanóides (Schimitz and Ecker, 2008). O n -3 ALA é convertido em ácido estearidónico e ácido eicosatetraenoico (20:4 n -3) para depois este formar EPA. O EPA é posteriormente metabolizado em DHA ou eicosanóides (Schimitz and Ecker, 2008).

O ácido gordo ALA compete com o LA para desaturases e elongases comuns que convertem C18 PUFA nos derivados C20 e C22 (Emken *et al.*, 1994). Por essa razão, a dieta base influencia a conversão desses ácidos (Arterburn *et al.*, 2006) sendo fundamental manter uma proporção adequada de LA/ALA para garantir a metabolização do LNA.

Em relação ao ácido gordo 16:0 (ácido palmítico), as dietas tiveram influência nas percentagens obtidas para o peito e coxa. Apenas na dieta controlo, no entanto, a percentagem deste ácido gordo aumentou com a incorporação da microalga e microalga mais enzima, nas dietas ($p<0,0001$).

A adição da microalga, e microalga mais enzimas aumentou o total de SFA em relação à dieta controlo refletindo a composição de ácidos gordos das dietas.

No presente estudo o consumo das dietas com a microalga e microalga mais enzima influenciaram a percentagem de LA e ALA na carne de frango.

No somatório dos ácidos gordos saturados (SFA), apenas a dieta controlo é diferente das outras dietas, apresentando valores mais baixos, no peito e na coxa, tendo o peito valores superiores em relação à coxa o que indica que as dietas suplementadas com a microalga e microalga mais enzima favoreceram o ligeiro aumento destes, acontecendo a mesma situação nos PUFA, apresentando o peito valores superiores em relação à coxa, por ser considerada uma carne mais magra indo de acordo às recomendações nutricionais das dietas humanas. Para a percentagem de *n*-6 PUFA verificaram-se valores diferentes no peito e na coxa, ou seja, no peito os valores foram ligeiramente mais baixos do que na coxa. No peito os valores foram estatisticamente iguais com exceção da dieta controlo e que foi maior do que a dieta que continha a microalga mais a enzima comercial Rovabio. Este produto hidrolisa pentosanos e β -glucanos das matérias-primas vegetais, melhorando o valor nutricional dos alimentos que contêm diferentes tipos de cereais. Reduz ainda a viscosidade do conteúdo intestinal permitindo uma ação enzimática mais eficaz sobre os conteúdos digestivos e uma melhor digestão e absorção de nutrientes, levando a uma melhor utilização da energia por parte dos animais.

Relativamente à percentagem de *n*-3 PUFA, existem diferenças significativas entre os tratamentos quer no peito quer na coxa, tendo a dieta controlo originado valores mais elevados na carne do que os restantes tratamentos

O comportamento das razões entre a soma dos ácidos gordos saturados e polinsaturados (PUFA/SFA) e entre as séries *n*-6 e *n*-3 dos PUFA (*n*-6/*n*-3) é semelhante, a dieta controlo apresenta valores mais elevados para a razão PUFA/SFA e mais baixos para a razão *n*-6-*n*-3 relativamente às restantes dietas. Este facto reflete em larga medida a diferença no perfil de ácidos gordos das dietas.

As recomendações da OMS para a razão *n*-6/*n*-3 PUFA é de 1:1 a 2:1. Hoje em dia essa proporção nas dietas ocidentais varia de 10:1 a 25:1, indicando uma deficiência em *n*-3 PUFA em comparação com as dietas dos nossos ancestrais e para o qual o nosso padrão genético foi estabelecido (Simopoulos, 1999a).

Em consequência disso as autoridades de saúde aconselham a população a consumir mais ácidos gordos *n*-3, particularmente as de cadeia longa (EPA e DHA) os quais se encontram em alimentos de origem marinha (Riley, *et al.*, 2000). Esta recomendação resulta do facto destes ácidos gordos ajudarem a prevenir as doenças cardiovasculares (CVD) (Zhang *et al.*, 2010); a obesidade e alguns tipos de cancro.

Farrel (1998), concluiu que o consumo de ovos produzidos por aves suplementadas com óleo de peixe contribui para a ingestão de quase a dose diária recomendada de *n*-3 PUFA, mas esta ainda não foi precisamente determinada, porque estes ácidos gordos desempenham um amplo papel na saúde humana.

Relativamente ao teor de carotenoides, não se verificaram diferenças significativas entre os músculos do peito e da coxa. A estabilidade oxidativa da carne não foi afetada significativamente, ao contrário dos resultados obtidos por (Ribeiro *et al.*, 2013), em que a estabilidade oxidativa da carne do peito foi afetada pelas dietas ao fim de 2 e 6 dias de armazenamento em refrigeração, com a carne da dieta suplementada com DHA revelando uma instabilidade mais elevada quando comparada com as outras carnes. O mesmo sucedeu com a carne da coxa, logo a seguir ao abate, tendo a carne da coxa suplementada com DHA apresentado alguma diferença ao fim de 2 e 4 dias de armazenamento em relação às outras dietas.

No que respeita ao conteúdo em colesterol, não se observaram diferenças significativas entre as dietas. Relativamente ao perfil dos homólogos da vitamina E, registou-se apenas diferenças nos α e γ -tocoferóis em que se observou um valor superior para a dieta controlo em relação às outras dietas, quer no músculo do peito como da coxa.

O α -tocoferol foi o principal diterpeno, enquanto os outros homólogos de vitamina E se encontram presentes em menores quantidades. Este perfil de carne está de acordo com os resultados que se costumam encontrar na carne dos animais (Prates *et al.*, 2006). O β -caroteno na carne não foi detetado neste estudo, o que está de acordo com o estudo efetuado por Ribeiro *et al.*, (2013). Como as algas contêm elevadas concentrações de carotenoides, foram devidamente acondicionadas (protegidas da luz) e congeladas a -20 °C. Acredita-se que deste modo se mantêm estáveis durante o armazenamento como alegado pelos fabricantes (prazo de validade de 2 anos e 5 meses respetivamente), sendo improvável que ocorra alguma estabilidade oxidativa após o armazenamento (Ribeiro *et al.*, 2013).

No que diz respeito aos tocotrienóis, a única diferença encontrada foi a presença de α e γ Tocotrienóis no músculo da coxa. Este é considerado como tendo uma maior potência como antioxidante das membranas, tornando-se assim uma importante arma na prevenção das CVD e do cancro, bem como na proteção contra a oxidação do LDL. Estudos demonstraram que o tocotrienol γ e δ . podem ter uma atividade antioxidante até 60 vezes superior em comparação com o padrão de tocoferol (Serbinova *et al.*, 1991). A vitamina E age interrompendo a cadeia oxidativa dos lípidos assim como os processos subsequentes de auto-oxidação, pois é um potente sequestrador de radicais livres e protege os ácidos gordos polinsaturados, os fosfolípidos das membranas biológicas e as lipoproteínas plasmáticas.

CONCLUSÃO

A incorporação de 15% de *Arthosphira platensis* na dieta prejudicou os parâmetros zootécnicos dos frangos. A utilização da *Spirulina* não valorizou a qualidade nutricional da fração lipídica da carne de frango. A incorporação de enzimas exógenas não foi suficiente para atenuar os efeitos negativos na performance que resultaram da adição de microalgas na dieta. As enzimas exógenas parecem não ter melhorado a digestibilidade da microalga *Arthosphira platensis* na dieta de frangos de carne.

Mais estudos devem ser feitos com dietas incorporadas com esta e outras microalgas e em menores percentagens por serem muito importantes nas várias cadeias tróficas. São também necessários estudos da digestibilidade dos vários componentes das microalgas, bem como da composição das suas proteínas em aminoácidos essenciais, de modo a melhor compreender os resultados apresentados neste trabalho.

Para além disso, os seus custos de produção neste momento ainda são relativamente elevados, sendo de extrema importância desenvolver as tecnologias de produção adequadas para tornar a sua utilização mais eficiente, de modo a podermos vir a assumir as microalgas como alternativa aos produtos tradicionais à base de peixe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abudados, A.M. (2010). Enzyme supplementation of corn-soybean meal diets improves performance in broiler chicken. *International Journal of Poultry Science*, (pp.292-297).
- Abudados, A.M. (2012). Effect of enzyme supplementation to normal and low density broiler diets based on corn-soybean meal. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, (pp.139-142).
- Aikawa, S., Joseph A., Yamada R., Izumi Y., Yamagishi T., Matsuda F., Kawai H., Chang J., Hasunuma T., Kondo A. (2013). Direct conversion of Spirulina to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energy Environment. Science.*, 6, 1844-1849.
- Arterburn, L. M., Hall, E. B. & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Journal of. Clinical. Nutrition.*, 83, 1467-1476.
- Arnold, R., Scheller K.K., Arp S.C., Williams S.N.; Schaefer D.M. (1993). Dietary α -tocopheryl acetate enhances beef quality in Holstein and beef breed steers. *Journal of Food Science*, 58, 28.
- Austic, R., Mustafa, A., Jung, B., Gatrell, S., Lei, X, (2013). Potential and limitation of a new defatted diatom microalgal biomass in replacing soybean meal and corn in diets for broiler chickens. *Journal of. Agricultural. Food Chemistry* 31, 7341-7348.
- Ayerza, R., Coates, W., & Lauria, M. (2002). Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poultry. Science*, 81(6), 826-837.
- Azain, M.J. (2004). Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *Journal of. Animal Science.*, 82, 916-924.
- Bedford, M.R., Schulz, H. (1998). Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*, 11, 91-114.
- Bedford, M.R. (2000). Exogenous enzymes in monogastric nutrition- their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*; 86, 1-13.
- Bedford, M. (2008). Enzymes help feed remain profitable. *Feed Mix* 5, 21-23.
- Betti, M., Perez, T.I., Zuidhof, M.J. & Renema, R.A. (2009). Omega-3-enriched broiler meat: 3Fatty acid distribution between triacylglycerol and phospholipid classes. *Poultry. Science* 88, 1740-1754.
- Bezard, J., Blond, J.P., Bernard, A. & Clouet, P. (1994). The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reproduction, Nutrition and Development*, 34, 539-568.
- Borowitzka M.A. (1993) *Large-scale algal culture systems: The next generation*. In: Sargeant J., Washer S., Jones M. & Borowitzka M. (Eds.), 11th Australian Biotechnology Conference. Australian Biotechnology Association, Perth. (pp. 61-62).
- Bramley, P., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. Manios, Y., Roxborough, H., Shuch, W., Sheehy, P., Wagner, K. (2000)- Vitamin E. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 80 ,913-938.

- Breda, J. (2003) - Fundamentos de Alimentação, *Nutrição e Dietética*. Coimbra Mar da Palavra - Edições Lda. (pp. 21-25).
- Buckley, D., Morrissey, P. & Gray, J. (1995). Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, 73, 3122-3130.
- Carbó, M.C. (1995). Zootecnia-Bases de producción animal: *Avicultura clásica y complementaria*. Madrid: Mundi- Prensa Libros, S.A.
- Chen, J.L., Wen, J., Zhao, G.P., Zheng, M.Q. & Yang, N. (2005). Genetic parameter estimation for inosine-5-monophosphate and intramuscular fat contents and other meat quality in chicken muscle. *Yi Chuan*, 27, 898-902.
- Chizzolini, R., Zanardi, E., Dorigoni, V. & Ghidini, S. (1999). Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 119-128.
- Choct, M. (2006). Enzymes for feed industry: past, present and future. *World's Poultry and Science Journal*, 62, 5-16.
- Choct, M. (1997). Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance; *Feed Milling International*; June: (pp. 13-26).
- Cowieson, A.J., Ravindran, V., Selle, P.H. (2008). Influence of dietary phytic acid and source of microbial phytase on ileal endogenous amino acid flows in broiler chickens. *Poultry Science* 87, 2287-2299.
- Cowieson, A.J., Bedford, M.R., Ravindran, V. (2010). Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. *British Poultry Science* 51, 246-257.
- Derner, R.B., Ohse S., Villela M., Carvalho S.M., Fett R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Santa Maria, 36, 1959-1967.
- Descalzo, A., Insani, E., Biolatto, A., Sancho, A., Garcia, P., Pensel, N. & Josifovich, J. (2005). Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science* 70, 35-44.
- Dune, P. (2009). Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *meat*, 81, 28-45.
- Emken, E.A., Adlof, R.O. & Gulley, R.M. (1994). Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –Lipids and lipid metabolism*, 1213, 277-288.
- Ficha técnica da Spirulina, (2015) nº182-V2.
- Field, T. G. (2004). *Scientific farm animal production: an introduction to animal science* (8th ed.). New Jersey: Pearson Education, Incorporation.
- Fisinin, V. (2014). Report: *Use of the drug LF-lysozyme in mixed fodder for broiler chickens*. State scientific institution All-Russian research and technology poultry institute of the Russian agricultural academy. Russia, Sergiev Posad. (pp. 1-10).

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology. Chemistry.*, 226, 497-509.

Fontes, C.M.G. A, Ponte, P.I.P., Reis, T.C., Soares, M.C., Gama, L.T., Dias, F.M.V., Ferreira, L.M.A. (2004). A family 6 carbohydrate-binding module potentiates the efficiency of a recombinant xylanase used to supplement cereal-based diets for poultry. *British Poultry Science*, 45, 648-656.

Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, change during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science* 62, 309-321.

Graziano, J., Hatta., Flynn, M., Johnson, E., Krinsky, N., Ridker, P., Hennekens, C. & Frei, B. (1995). Supplementation with β -carotene in vivo and in vitro does not inhibit low density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 112, 187-195.

Gray, J.I., Gomaa, E.A., & Buckley, D.J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science* 43, 111-123.

German, B. & Dillard, J. (2006). Composition, structure and absorption of milk lipids: A source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46, 57-92.

Givens, D.I. (2005). *The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease*. Proceedings of the Nutrition Society, 64, 395-402.

Givens, D. & Gibbs, R.A. (2008). *Current intakes of EPA and DHA in European population and the potential of animal-derived foods to increase them*. Proceedings of the Nutrition Society, 67, 273-280.

Gong, M., (2014). Efficacy of lysozyme as an alternative to antibiotics for broiler chickens. (pp. 29-7). Dalhousie University.

Gonzalez-Esquerre & Leeson (2000). –Effects of menhaden oil and flaxseed in broiler diets on sensory quality and lipid composition of poultry meat. *PubMed*.

Gosnell, W.W., Kroger M. & Katz, Friedrich (1975). Improvements on the agar plate method to determine Lysozyme. *Journal of Milk and Food Technology*, 38, 457-460

Gould, N.R., & Siegal, H.S. (1985). Serum lipoproteins in chickens after administration of adrenocorticotropin or exposure to high temperature. *Poultry Science*, 64, 567-574.

Grau, A., F. Guardiola., J. Boatella., M.D. Baucells, & R. Codony. (2000). Evaluation of lipid ultraviolet absorption as a parameter to measure lipid oxidation in dark chicken meat. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48, 4128-4135.

Guo-Bin, C., Li-Li, L., Xue-Yu, Z Ke-hua, W., Rong, C., DE-Quin, L. & Guo-Hong, C. (2010). Development rule of intramuscular fat content in chicken. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 297-298.

Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W. (1996). Zupancic, S.; Production of fungal xylanases; *Bioresource Technology*; 58, 137-161.

http://www.Scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos_2.html

Hynstova, V., Sterbova D., Klejdus B., Hedbavny, J., Huska D., Adam V. (2018). Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using high performance thin layer chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 108-118.

Indukern Portugal-Matérias-primas para a Indústria - ficha técnica do produto nº 122, (2015).

Jakobson, K., Engberg, R., Anderson, J., Jensen, S., Lauridsen, R., Henckel, R., Bertelsen, G., Skibsted, L., & Jensen, C. (1995). Supplementation of broiler diets with all-rac- α - or a mixture of natural source RRR- α ; γ ; δ -tocopherol acetate. 1. Effect on vitamin E status of broilers in vivo and at slaughter. *Poultry Science*, 74, 1984-1994.

Kanner, J. (1992). Mechanism of nonenzymic lipid peroxidation in muscle foods. In A. J. St Angelo (Ed.), *Lipid oxidation in food. ACS Symposium Series 500*, Washington, DC. (pp 55-73).

Kattak, F. M., Pasha, T. N., Hayat, Z., Mahmud, A. (2006). Enzymes in poultry nutrition. *Journal of Animal Science*. 16, 1-7.

King, M. (2011). Introduction to cholesterol metabolism. Disponível em <http://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol.html>. Atualizado em 27 de junho de 2011. Acedido a 15 de julho de 2011.

Komprda, T., Zelenka, J., Fajmonova, E., Fialova, M. & Kladroba, D. (2005). Arachidonic acid and long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid contents in meat of selected poultry and fish species in relation to dietary fat sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6804-6812.

Kris- Etherton, Yu-P.S., Zhao G, Etherton T, Naglack M, Jonnalagadda S. (2015). *Journal of Clinical Nutrition*. 69, 632-46.

Larbier, M. & Leclercq, B. (1991). Nutrition et Alimentation des Volailles. INRA.

Lauridsen, C., Jensen, S., Skibsted, L., & Bertelsen, G. (2000) –Influence of supranutritional vitamin E and copper on α -tocopherol deposition and susceptibility to lipid oxidation of porcine membranous fractions of M. Psoas major and M. Longissimus dorsi. *Meat Science*, 54, 377-384.

Leeson, S., Caston, L.; Summers, J.D. (1996). Broiler response to diet energy. *Poultry Science*. 75, 529-535.

Leeson, S. (2000). *Is feed efficiency still a useful measure of broiler performance?* Department of Animal and Poultry Science; University of Guelph; Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs; Canada.

Leeson, S., Summers, J.D. (2001). Scott's nutrition of the chicken (4th ed.). Canada: University Books.

Liu, D., Guo, Y., Wang, Z., Yuan, J, (2010). Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. *Avian Pathology* 39, 17-24.

Liu, Q., Lanari, M., Shaefer, D. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science*, 73, 3131-3140.

- Lopes,A. (2009). *Efeito do Sistema de produção e do sexo na qualidade da carne de peru*. Dissertação de mestrado,em Produção Animal. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.
- López-Ferrer, S., Baucells, M.D., Barroeta, A.C., & Grashorn, M.A. (2001). *n*-3 Enrichment of chicken meat.1. Use of very long-chain fatty acids in chicken diets and their influence on meat quality: Fish oil. *Poultry Science*. 80, 741-752.
- Lopez-Garcia, E., Schulze, M.B., Manson, J.E., Meigs, J.B., Albert, C.M., Rifai, N., Willet, W.C.& Hu, F.B. (2004). Consumption of *n*-3 fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *Journal of Nutrition*, 134, 1806-1811.
- Lum, K., Kim, J., Lei, X., (2013). Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4, (p. 53).
- Machlin, L. (1991). *Vitamin E*. In: *Handbook of Vitamins*. 2 ed. New York: Marcel Dekker. Chapter 1, (pp. 99-144).
- Madeira, Marta., Cardoso Carlos.,Lopes Paula., Coelho Diogo.,Afonso Claudia., Bandarra Narcisa., Prates José (2017). Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review.
- Mateus, G.G., Blas, C., Rebollar, P.G. (2010). Tablas FEDNA de composition y valor nutritive de alimentos para la fabrication de piensos compuestos (3ª ed.). Madrid: Fundacion Espanõla para el Desarrollo de la Nutrition Animal.
- Mc Donald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., (1995). *Animal Nutrition* (5 th ed.) Longman, (pp. 503-505).
- Mc Donald, P., R.A.Edwards, J.F.D. Greenhalgh, and C.A.Morgan (2002). *Animal Nutrition*. (6th ed.) Person Education Limited, Halow, England.
- Marquardt, R.R., Brenes, A., Zhang, Z., Boros, D. (1996). Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Animal Feed Science Technology* 60, 321-330.
- Mavromichalis, I. (2012). Mixed or single enzymes for non-starch carbohydrates? All About Feed, (pp. 25-26).
- Mooney, J.W.; Hirschler, E.M.; Kennedy, A.K.; Sams, A.R.; & Van Elswyk, M.E. (1998). Lipid and flavor quality of stored breast meat from broilers fed marine algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 134-140.
- Mora, O., Romano, J., González, E., Ruiz, F., Shimada, A. (2000). Low cleavage activity of 15,15- dioxygenase convert beta-carotene to retinol in cattle compared with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Journal of. Vitamin. Nutrition. Research*. 70, 199-205.
- Morgan, J., Pickering, F., Everitt, G. (1969). Factors affecting yellow fat colour in cattle. *Proceedings of the Nutrition Society. Animal Production*. 29, 164-175.
- Morrissey, P.A., Buckley, D.J., Sheehy, P.J.A., & Monahan, F.J. (1994). Vitamin E and meat quality. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 289-295.
- Morrissey, P., Sheehy, P., Galvin, K., Kerry & Buckley, D. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, Vol. 49 (Supplement I), (pp. 73-86).

- Mountney, P. (1988). *Poultry Meat and Egg Production*. Avi Book.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2004). Lehninger, *Principles of Biochemistry* (4th ed.). W.H. Freeman.
- Nitsan, Z., Mokady, S., & Sukenik, A. (1999). Enrichment of Poultry Products with *n*-3 Fatty Acids by Dietary Supplementation with the Alga *Nannochloropsis* and Mantur Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5127-5132.
- OCDE 2016 - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico.
- OCDE-FAO 2016-2025 - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico, e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura.
- Oddy, V.H., Harper, G.S., Greenwood, P.L. & Mcdonagh, M.B. (2001). Nutritional and development effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 921-942.
- O'Sullivan, A., O'Sullivan, K., Galvin, K., Moloney, A.P., Troy, D.J. & Kerry, J.P. (2004). Influence of concentrate composition and forage type on retail packaged beef quality. *Journal of Animal Science*. ;82, 2384-2391.
- Paloheimo, M., Piironen, J., Vehmaanpera (2010). J. Xylanases and Cellulases as Feed Aititives. In Enzymes. In M.R. Bedford & G.G. Partridge (ed.), *Farm Nutrition* (2nd ed.). CABI.
- Palmquist, D. L. (2009). Omega-3 fatty acids in metabolismo, health, and nutrition and for modified animal product foods. *The professional animal scientist*, 25, 207-249.
- Pettersson, D. & Aman, P. (1989). Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat. *British. Journal. Nutrition.*, 62, 139-149.
- Ponte, P.I.P., Mendes, I., Quaresma, M., Aguiar, M.N., Lemos, J.P., Ferreira, L.M.A. Ferreira, M.A.C. Soares, C.M.Alfaia, J.A.M. Prates, C.M.G.A. Fontes (2004). Cholesterol levels and sensory characteristics of meat from broilers consuming moderate to high levels of alfafa. *Poultry Science*, 83, 810-814.
- Ponte, P.I. P.; Alves, S.P.; Bessa, R.J. B.; Ferreira, L.M.A.; Gama, L.T.; Brás, J. L.; Fontes C. M., Prates J.A.(2008). Influence of pasture intake on the fatty acid composition, and cholesterol, tocopherols, and tocotrienols content in meat from free-range broilers. *Poultry. Science*. 87, 80-88.
- Pratiwi, N., Murray, P.J. & Taylor D.G. (2006). Total cholesterol concentrations of the muscles in castrated Boer goats. *Small Ruminant Research*, 64, 77-81.
- Prates, J. A. M., Quaresma, M.A.G., Bessa, R. J.B., Fontes, C. M.G. A., & Alfaia, C. M. P. M. (2006)– Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and b-carotene in Barrosã-PDO veal. *Food Chemistry*, 94, 469-477.
- Poureslami, R., Raes, K., Turchini, G. M., Huyghbaert, G. & De Smet, S. (2010). Effect of diet, sex and age on fatty acid metabolism in broiler chickens: *n*-3 and *n*-6 PUFA. *British Journal of Nutrition*, 104, 189-197.
- Quaresma, M., Trigo Rodrigues, I., Pereira Silva, Santos, N., Breda, J., Bessa, R. (2008). Vitamin E in the Montado's wildboar meat: the conjugation of the omnivorous feeding behavior and therichness of Montado. *Paper presented at the Role of Science in the Growing Demand for Red Meat, Cape Town, South Africa*.

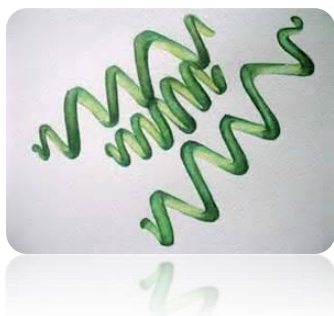
- Raes, K., De Smet, S., & Demeyer, D. (2001). Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids. *Animal science papers and reports*, 73, 253-260.
- Ramalho, R. (2010). A Carne: A influência da idade de abate na qualidade da carne. Disponível em: <http://carnenossa.blogspot.com/2010/2011/influencia-da-idade-de-abate-nma.html>. Acedido a 15 de abril de 2011.
- Ramos, O. (2008). *Efeito combinado da raça e do sistema de produção na qualidade nutricional da fração lipídica da carne de borrego e de cabrito*. Dissertação de Mestrado em Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade de Lisboa.
- Ravindran, V. (2012). Poultry feed availability and nutrition in developing countries. Poultry Development Review. FAO. Acedido a 26 de Abril de 2013, disponível em: www.fao.org/ag/againfo/themes/en/poultry/AP_nutrition.html
- Rebole, A., Rodriguez, M. L., Ortiz, L. T., Alzueta, C., Centeno, C., Viveiros, A.; Brenes A, Arija, I (2006). Effect of dietary high-oleic acid sunflower seed, palm oil and vitamin E supplementation on broiler performance, fatty acid composition and oxidation susceptibility of meat. *British Poultry Science*, 47, 581-591.
- Ribeiro, T., Ponte, P. I. Guerreiro, C. I. D., Santos, H.M., Falcão, L., Freire, J.P.B., Ferreira, L.M.A., Prates, J.A.M., Fontes, C.M.G.A., Lordelo, M.M.(2008). A family 11 carbohydrate-binding module (CBM) improves the efficacy of a recombinant cellulase used to supplement barley-based diets for broilers at lower dosage rates. *British Poultry Science*, 49, 600-608.
- Ribeiro, T., Lordelo, M.M., Alves, S.P., Bessa, R.J.B., Costa, P., Lemos, J.P.C., Ferreira, L.M.A., Fontes, C.M.G.A., Prates, J.A.M. (2013). Direct supplementation of diet is the most efficient way of enriching broiler meat with *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *British Poultry Science*, 54, 753-765.
- Richmond, A. (2004). Handbook of: Microalgal culture biotechnology and applied phycolgy. *Blackwell publishing*. (p. 265).
- Riley, P.A., Enser, G.R. Nute, and J.D.Wood. (2000). Effects of dietary linseed on nutritional value and other quality aspects of pig muscle and adipocit tissue. *Animal Science*. 71, 483-500.
- Roche, H.M., Gibney, M. J. (1999). Long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids and triacylglycerol metabolism in the postprandial state. *PubMed* 34, 259-265.
- Rosenkranz, F.D. (1993). Freeze drying. In vacuum products. West Sussex: Edwards High Vacuum International. (pp. 201-215).
- Rymer, C & Givens, D. (2005). *n*-3 fatty acids enrichment of edible tissue of poultry: a review. *Lipids*, 40, 121-130.
- Rymer, C.; Gibbs, R.A.; & Givens, D.I. (2010). Comparison of algal and fish sources on the oxidative stability of poultry meat and its enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*.; 89, 150-159.

- Reynoso, C., Mora, O., Nieves, V., Shimada A. (2004). B-Carotene and lutein in forage and bovine adipose tissue in two tropical regions of Mexico. *Animal Feed Science and Technology* 113, 183-190.
- Ruiz, J.A., Guerrero, L., Arnau, J., Guardia, M.D, Esteve-Garcia E. (2001). Descriptive sensory analysis of meat from broilers fed diets containing vitamin E or beta-carotene as antioxidants and different supplemental fats. *Poultry Science*, 80, 976-982.
- Sahoo, N.R., Kumar, Bhusan, B., Bhattacharya. T.K, Dayal, S., Sahoo M. (2012). Lysozyme in Livestock: A guide to selection for disease resistance: a review. *Journal of Animal. Science. Advances.*, 2, 347-360.
- Sanosaka, M., Minashima, T., Suzuki, K., Watanabe, K., Ohwada, S., Hagino, A. (2008). A combination of octanoate and oleate promotes in vitro differentiation of porcine intramuscular adipocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 149, 285-292.
- Scragg, A.H. (1988). *Biotechnology for Engineers, Biological Systems in Technological Processes*. Ellis Horwood Limited.
- Schmitz, G. & Ecker, J. (2008). The opposing effects of *n*-3 and *n*-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 47, 147-155.
- Serbinova E, Kagan V, Han D & O'Packer L. (1991). *Free Radical Biology and Medicine*, 10, 263-75.
- Siebert, B. & Kruk, Z. (2004). β -carotene and oxidative desaturation of fatty acids: a plausible explanation of the conflicting responses of coronary heart disease to β -carotene? *Medical hypotheses*. 62, 950-953.
- Smith, J. E. (1996). *Biotechnology* (3rd ed.) Cambridge University Press.
- Simopoulos, A.P. (1997). Omega-3 fatty acids in the prevention-management of cardiovascular disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75, 234-239.
- Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 70, 560- 569.
- Simopoulos, A. P (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- Slominski, B.A. (2011). Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science* 90, 2003-2023.
- Strachan, D., Yang, A., Dillon, R. (1993). Effect of grain feeding on fat colour and the other carcass characteristics in previously grass-fed *Bos indicus* steers. *Aust. Journal of Experimental. Agriculture*. 33, 269-273.
- Teixeira, Lgia (2013). *Efeito da Suplementação de Enzimas Exógenas em Regimes Alimentares  base de Milho e Trigo nos ndices Zootécnicos de Frangos de Carne*. Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia-Universidade de Lisboa.
- Traber, M., Cohn, W. & Muller, D. (1992). Absorption, transport and delivery to tissues. In: *Vitamin E in health and disease*. Packer, L, Fuchs, J. (ed), New York, Marcel Dekker, (pp. 35-53).

- Verstegen, M.W. A., Poel, A.F.B. (2009). Grains in Nutrition for Farm Animals. XXV Curso de Especialization. FEDNA.
- Wang,Z.R., Qiao, S.Y., Lu, Q., Li, D.F.(2005). Effects of enzyme supplementation on performance, nutriente digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. *Poultry Sciense*, 84, 875-881.
- West, M.L. Corzo, A., Dozier, W.A., Blair, M.E., Kidd, M.T. (2007). Assessment of dietary rovabio excel in practical United States broiler diets. *Journal of. Applied. Poultry. Research.* 16, 313-321.
- Who Technical Report Series, 916 (2004). Special issue-*Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases:background papers of the joint WHO/FAO expert consultation* Geneva:World Health Organization.
- Wood, J., Richardson R., Nute G., Fisher A., Campo M., Kasapidou, E., Sheard, P. & Enser M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science* 66, 21-32.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard,P.R., Richardson,R.I., Hughes, S.I. & Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343-358.
- Yang, A., Larsen, T.W., Tume, R.K. (1992). Caratenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aust. Journal of Agriculture Research* 43, 1809-1817.
- Yang, A., Brewster, M.J., Lanari, M.C., Tume, R.K., (2002). Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture and grain-fed cattle. *Meat Science.* 60, 35-40.
- Yoshida, M., Hoshii, H. (1980). Nutritive value of *Spirulina*, green algae, for poultry feed. *Japan Poultry Science.* 17, 27-30.
- Yoshida, Y., Niki, E., Noquchi N. (2002). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. National Center for Biotechnology Information. 123, 63-75.
- Yu, J.Y.L., Campbell, L.D., & Marquardt, R.R. (1976). Immunological and compositional patterns of lipoproteins in chickens (*Gallus domesticus*) plasma. *Poultry Science*, 55, 1626-1631.
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H.,Lee, E.J., & Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86, 15-31.
- Zanella, I., Sakomura, N.K., Silversides, F.G., Figueiredo, A. & Pack, M. (1999). Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science*, 78, 581-568.
- Zou, J., Zheng P., Zhang K., Ding X. & Bai, S. (2013). Effects of exogenous enzymes and dietary energy on performance and digestive physiology of broilers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4, 14.

ANEXO

Ficha técnica da Spirulina



Spirulina

Spirulina is a blue-green microalgae, cyanobacteria rich in essential amino-acids. Its shape is helical as a spring. Its color is due to chlorophyll but also to another pigment: the phycocyanin which creates more and more interest due to its detoxifying action. Spirulina, natural source of vitamin B, is listed as authorized algae for food and could be incorporated in numerous formulas. It is also interesting for feed and aquaculture usage.

Characteristics

Source (latin name)	<i>Spirulina platensis (Gomont)</i>
Family	Pseudanabaenaceae
Used part	Whole algae
Solvent	None
Equivalence	10 - 12 : 1
Carrier / Additive	None
Geographical origin	China
Culture type	Cultivated
Harvest type	Manual
Harvesting period	All year

Physical and chemical properties

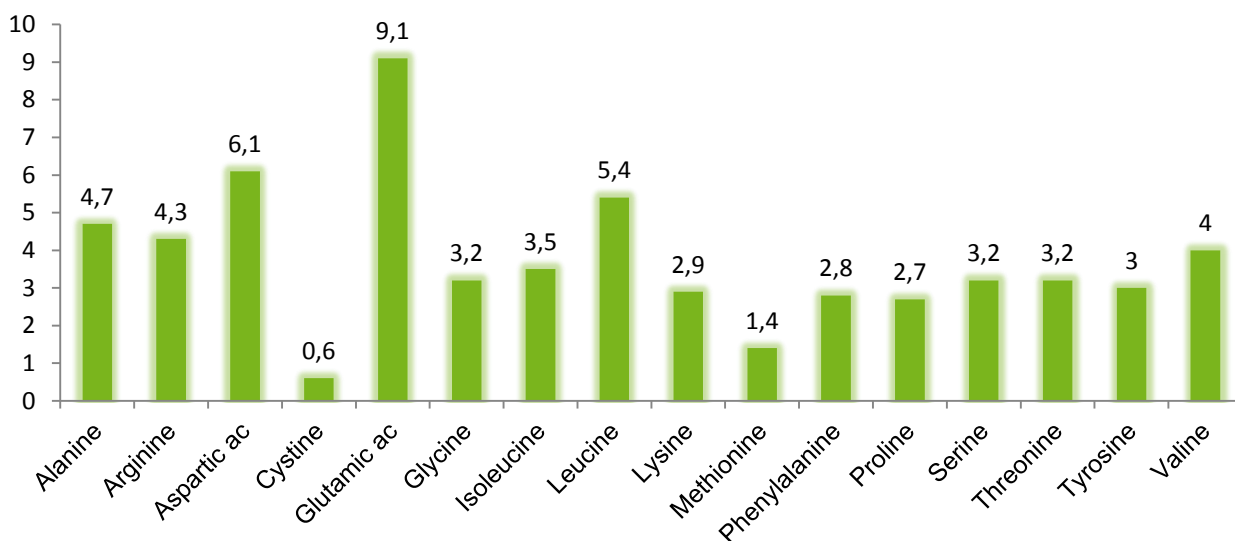
Appearance	Powder
Color	Dark green
Taste and odor	Characteristic
Particle size	80 mesh
Moisture	≤ 8.0 %
Ashes	≤ 10.0 %

Average Composition

Spirulina	100 %
-----------	-------



Amino-acids profile - % of total amino-acids



Minerals (indicative value)

Calcium (Ca)	1 400 mg / 100 g
Phosphorus (P)	900 mg / 100 g
Iron (Fe)	500 ppm
Zinc (Zn)	3.0 mg / 100g
Potassium (K)	1 600 mg/100g
Sodium (Na)	600 mg / 100 g
Magnesium (Mg)	400 mg / 100 g

Vitamins (indicative value)

Vitamin B1	4.5 mg/100 g
Vitamin B2	4.0 mg/100 g
Vitamin B6	0.80 mg/100 g



Pigments (indicative value)

Carotene	0.1 - 0.15 %
Phycocyanin	5.0 - 15.0 %
Chlorophyll	1.0 - 1.5 %
Total carotenoids	0.2 - 0.35 %

Nutritional values

Data	Values (g/100 g of product)	Data	Values (g/100 g of product)
Carbohydrates	15.0 - 25.0	Fat	5.0 - 7.0
Proteins	> 55.0		

GMO and Ionization

GMO

This product is GMO free and is not produced from GMO according to the decrees 1829/2003 and 1830/2003.

Ionization

We, SOPROPÊCHE, guarantee that the spirulina we deliver did not undergo any gamma radiation treatment and does not contain any ingredient treated by gamma radiation.

Nanoparticles

To the best of our knowledge, this product doesn't contain nanoparticles according to European regulation 1169/2011.

Microbiological analysis

Criteria	CFU / g
Total germs	< 50 000
Yeasts and molds	< 500
Faecal coliforms	< 10
E. Coli	negative
S.aureus	negative
Salmonella (/25 g)	negative



Undesirable substances

Heavy metals	ppm
Inorganic arsenic (As)	< 3.0
Mercury (Hg)	< 0.1
Cadmium (Cd)	< 1.0
Lead (Pb)	< 3.0
Pesticides	ppm
Conform to European regulation 396/2005	



Allergens – according to European regulation 1169/2011 and its amendments

		Cross contamination		
Allergens	Direct incorporation in the product	Presence in the product line	Presence in the production workshop	Presence in the production site
Cereals containing gluten and products thereof (1)	NO	NO	NO	NO
Crustaceans and products thereof	NO	NO	NO	NO
Molluscs and products thereof	NO	NO	NO	NO
Eggs and products thereof	NO	NO	NO	NO
Fishes and products thereof	NO	NO	NO	NO
Peanuts and products thereof	NO	NO	NO	NO
Soybeans and products thereof	NO	NO	NO	NO
Milk and products thereof (including lactose)	NO	NO	NO	NO
Nuts and products thereof (2)	NO	NO	NO	NO
Celery and products thereof	NO	NO	NO	NO
Mustard and products thereof	NO	NO	NO	NO
Sesame seeds and products thereof	NO	NO	NO	NO
Lupine and products thereof	NO	NO	NO	NO
Sulphur dioxide and sulphite (if > 10ppm of SO ₂) specify quantity	NO	NO	NO	NO

(1) Wheat, rye, barley, oats, spelted, kamut or their hybridized strains.

(2) Cashew, hazelnut, Brazil nuts, pecans, macadamia, pistachio, Queensland nuts, almonds.

Also applies to all products derived from these oils.



Packaging

25 kg cardboard drum
500 kg pallet 100 x 120

Shelf life / Storage

36 months in unopened original packaging.

Store in a dry and cool place.

Note

This technical paper has been drafted in order to help compounders in their work. This information here above reported is reliable but has only an indicative value. It cannot engage our company beyond guarantees mentioned in contracts.

