

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



Efeito da incorporação de *Arthrospira platensis* na dieta dos frangos isoladamente ou combinada com enzimas exógenas no desempenho zootécnico dos animais e na qualidade da sua carne

VERENA MACIEL DA COSTA

ORIENTADOR (A):

Doutor José António Mestre Prates

COORIENTADOR (A):

Doutora Cristina Maria Riscado
Pereira Mateus Alfaia

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



Efeito da incorporação de *Arthrospira platensis* na dieta dos frangos isoladamente ou combinada com enzimas exógenas no desempenho zootécnico dos animais e na qualidade da sua carne

VERENA MACIEL DA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI

PRESIDENTE

Doutora Maria João dos Ramos
Fraqueza

VOGAIS

Doutor José António Mestre Prates
Doutora Susana Paula Almeida
Alves

ORIENTADOR (A):

Doutor José António Mestre Prates

COORIENTADOR (A):

Doutora Cristina Maria Riscado
Pereira Mateus Alfaia

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Verena Maciel da Costa

Título da Tese ou Dissertação: Efeito da incorporação de *Arthrospira platensis* na dieta dos frangos isoladamente ou combinada com enzimas exógenas no desempenho zootécnico dos animais e na qualidade da sua carne

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2023

Designação do curso de
Mestrado ou de
Doutoramento: Mestrado em Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 11 de dezembro de 2023

Assinatura: Verena Maciel da Costa

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. José Prates pela sua disponibilidade e acolhimento durante a realização deste trabalho. Obrigada por ter aceitado me orientar.

À minha coorientadora Profa. Dra. Cristina Alfaia pelos ensinamentos repassados nas técnicas laboratoriais e pela sua disponibilidade e acolhimento.

À toda equipa do laboratório de bioquímica, cuja disponibilidade e empenho foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela paciência no ensinamento de diversas técnicas.

Agradecimento especial a Dra. Mônica Costa e Me. Maria Spínola, por toda a disponibilidade, ensinamento das técnicas laboratoriais e parceria dentro do laboratório.

Ao Sr. Nuno Mota, cuja gentileza e acolhimento foram fundamentais no meu primeiro ano de mestrado.

À minha amada família que embarca em todos os meus sonhos. Em especial a minha mãe que luta arduamente ao meu lado por tudo aquilo que eu desejo alcançar na vida.

Ao meu amor, teria sido impossível concluir esse ciclo sem todo o teu apoio, dedicação, parceria e motivação.

E, por fim, agradeço a mim. Por ter tido a coragem de imigrar e ter persistido inclusive nos momentos mais desafiadores.

A todos meu mais sincero respeito e admiração.

Resumo

Efeito da incorporação de *Arthrospira platensis* na dieta dos frangos isoladamente ou combinada com enzimas exógenas no desempenho zootécnico dos animais e na qualidade da sua carne.

Este estudo avalia o efeito da alimentação prolongada (do 7º ao 35º dia) com um elevado nível de inclusão (15%) de *Arthrospira platensis*, vulgarmente conhecida como espirulina, em combinação com enzimas (principalmente peptidases), no desempenho zootécnico e qualidade da carne de frangos. O ensaio envolveu 120 frangos, da linhagem Ross 308, machos, que foram alojados em 40 gaiolas, cada uma continha no máximo com três frangos. Após adaptação de sete dias com uma dieta à base de milho, as aves receberam uma das seguintes quatro dietas, por um período de 28 dias: 1) uma mistura dieta à base de milho e soja no grupo controlo (CON); 2) a dieta base com incorporação de 15% de espirulina (SP); 3) a dieta base com incorporação de 15% de espirulina suplementada com 0,025% de enzima comercial VemoZyme® P (SPV); 4) dieta base com incorporação de 15% de espirulina suplementada com 0,10% de pancreatina suína (SPP). De acordo com os resultados obtidos, o grupo controlo apresentou maior peso corporal ($p < 0,001$), maior ganho de peso corporal ($p < 0,001$) e menor índice de conversão alimentar ($p < 0,001$) do 7º ao 21º dia, em comparação com os grupos alimentados com espirulina. O peito e a coxa de frangos alimentados com dietas à base de espirulina, apresentaram valores significativamente superiores de n-3 PUFA ($p < 0,001$), todavia a razão n-6/n-3 PUFA ($p < 0,001$) e os níveis de α -tocoferol ($p < 0,001$) diminuíram em relação ao grupo controlo. O teor de colesterol total também diminuiu ($p < 0,001$) na carne do peito nos grupos que foram alimentados com dietas incorporadas com espirulina. Em conclusão, a inclusão de 15% de espirulina na dieta de frangos de carne durante um período prolongado, tanto isoladamente como em combinação com enzimas exógenas, diminuiu o desempenho zootécnico dos frangos mas melhorou a qualidade nutricional da carne.

Palavras-chave: *Arthrospira platensis*, enzima alimentar, frango de carne, qualidade da carne.

Abstract

Effect of incorporating *Arthrospira platensis* into the chicken diet alone or combined with exogenous enzymes on the zootechnical performance of the animals and the quality of their meat.

This study assessed the effect of prolonged feeding (from the 7th to the 35th day) with a high level of inclusion (15%) of *Arthrospira platensis*, commonly known as spirulina, in combination with enzymes (mainly peptidases), on growth performance and quality of broiler meat. The experiment involved 120 male Ross 308 chickens, which were housed in 40 cages, each housing a maximum of three chickens. After acclimatization for seven days to a corn-based diet, birds received one of the following four diets for a period of 28 days: 1) a mixture of corn and soy in the control group (CON); 2) a mixture incorporating 15% spirulina (SP); 3) a mixture of 15% spirulina supplemented with 0.025% commercial enzyme VemoZyme® P (SPV); 4) a mixture rich in 15% spirulina supplemented with 0.10% porcine pancreatin (SPP). According to the results obtained, the control group presented greater body weight ($p < 0,001$), greater body weight gain ($p < 0,001$) and lower feed conversion ratio ($p < 0,001$) from the 7th to the 21st day, compared to the groups fed with spirulina. The breast and thigh of chickens fed spirulina-based diets showed significantly higher values of n-3 PUFA ($p < 0,001$), however the n-6/n-3 PUFA ratio ($p < 0,001$) and the levels of α -tocopherol ($p < 0,001$) decreased compared to the control group. Total cholesterol content also decreased ($p < 0,001$) in breast meat in groups that were fed a diet containing spirulina. In conclusion, the inclusion of 15% spirulina in the diet of broiler chickens for a prolonged period, both alone and in combination with exogenous enzymes, decreased the zootechnical performance of the chickens but improved the nutritional quality of the meat.

Keywords: *Arthrospira platensis*, feed enzyme, broiler chickens, meat quality

Índice geral

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas	xi
Introdução	1
1. Revisão Bibliográfica	2
1.1. Indústria avícola na atualidade.....	2
1.1.1. Produção e consumo.....	2
1.1.2. Características da carne de frango.....	4
1.1.3. Desenvolvimento da nutrição de frangos.....	6
1.2. Microalgas como fonte alimentar e de sustentabilidade	7
1.3. Espirulina, taxonomia, composição bioquímica e valor nutricional.....	8
1.3.1. Digestibilidade da espirulina e a utilização de enzimas.....	10
1.3.2. Benefícios da utilização de espirulina na alimentação de frangos ...	11
2. Objetivos.....	13
3. Material e métodos	13
3.1. Maneio dos animais, alimentação e preparação das amostras.....	13
3.2. Determinação da oxidação lipídica na carne	18
3.3. Determinação do colesterol total e vitamina E	19
3.4. Determinação dos lípidos totais.....	20
3.5. Determinação do perfil de ácidos gordos	21

3.6. Análise estatística	22
4. Resultados	23
4.1. Desempenho zootécnico.....	23
4.2. Avaliação da oxidação lipídica da carne	24
4.3. Avaliação do colesterol total e vitamina E	25
4.4. Composição de lípidos e ácidos gordos na carne	27
5. Discussão	30
6. Conclusões	34
7. Referências bibliográficas	35

Lista de figuras

Figura 1. Participação dos continentes na produção de carne de frango	2
Figura 2. Produção de carne de frango em Portugal	3
Figura 3. Aspeto da dieta suplementada com espirulina	12
Figura 4. Gaiolas utilizadas no ensaio	14
Figura 5. Preparação e acondicionamento das amostras	18

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição química da <i>A. platensis</i>	9
Tabela 2. Composição das dietas para frangos de carne do 7 ^o ao 14 ^o dia. ...	15
Tabela 3. Composição das dietas para frango de carne do 14 ^o ao 35 ^o dia	15
Tabela 4. Efeito das dietas no ganho de peso corporal, ingestão média diária da dieta e índice de conversão alimentar.	23
Tabela 5. Estabilidade oxidativa da carne de peito de frango avaliada pelas substâncias reativas ao TBA	24
Tabela 6. Perfil dos diterpenos da vitamina E na carne de frango	26
Tabela 7. Teor de colesterol total na carne de frango	26
Tabela 8. Teor de lípidos totais e composição de ácidos gordos na carne de frango.....	28

Lista de abreviaturas

AA- ácido araquidónico

AG- ácidos gordos totais

ALA- ácido α -linolénico

BHT- hidroxitolueno butilado

cm- centímetro

CON - dieta controlo à base de milho e farelo de soja

DHA- ácido docosaehexaenóico

DPA- ácido docosapentaenóico

EDA- ácido eicosadienóico

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

EFSA- Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

EPA- ácido eicosapentaenóico

EUA- Estados Unidos da América

FAME- ésteres metílicos de ácidos gordos

FAO- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FAOSTAT- banco de dados estatísticos corporativos da FAO

FIP-U- unidade de atividade enzimática

g- grama

GC- cromatografia gasosa

GLA- ácido gama-linoleico

HCl- ácido clorídrico

hPa- hectopascal (unidade de pressão)

HPLC- cromatografia líquida de alta resolução

IC- índice de conversão

ISA - Instituto Superior de Agronomia

K₂CO₃ - carbonato de potássio

kg- quilograma

LA- ácido linoleico

LDL- lipoproteínas de baixa densidade

m- metro

M- molar

MDA- malondialdeído

min- minutos

ml- mililitros

MS- matéria seca

MUFA- ácido gordo monoinsaturado

nm- nanómetro

°C - graus celsius

OECD- Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico

p/v- razão peso: volume

ppm- partes por milhão

PUFA- ácido gordo polinsaturado

PV- peso vivo

rpm- rotações por minuto

seg.- segundos

SFA- ácido gordo saturado

SP - dieta com incorporação de 15 % de espirulina

SPP - dieta com incorporação de 15% de espirulina suplementada com 0,10% de extrato de pancreatina suína

SPV- dieta com incorporação de 15 % de espirulina suplementada com 0,025% da mistura enzimática comercial VemoZyme® P

TBA- ácido 2-tiobarbitúrico

TCA- ácido tricloroacético

UE- União Europeia

UNICEF- Fundo das Nações Unidas

UV- radiação ultravioleta

µl- microlitro

µg- micrograma

Introdução

Os objetivos da agricultura e avicultura moderna perpassam a produção em condições económicas e sustentáveis, compatíveis com o bem-estar animal e com garantia de segurança ao consumidor. Porém, fornecer alimentos de alta qualidade para a crescente população mundial com recursos naturais limitados é um desafio para a indústria avícola.

Nas últimas décadas, a produção avícola passou por avanços notáveis para se adaptar aos desafios emergentes e às mudanças no consumo e nas expectativas do consumidor. Entretanto, esses avanços refletem a necessidade de um sistema de produção de proteína animal que considere os aspetos sociais, económicos e ambientais da sustentabilidade (Castro et al., 2023).

Inclui-se nesse aspeto, a necessidade de explorar novas fontes de alimento a serem incluídas na dieta animal e na formulação de rações, além das convencionais milho e soja, visto que o uso em larga escala desses alimentos convencionais, aumenta a competição entre a utilização na alimentação humana e animal (Mishra et al., 2023).

Essa necessidade de adaptação destaca o aspeto dinâmico da indústria avícola e o seu esforço contínuo para produzir uma fonte de proteína segura, económica, condizente com a preservação do ambiente e aliada ao bem-estar animal.

Na vanguarda do processo de investigação de novas fontes alimentares, encontram-se as microalgas. Podem ser incluídas na alimentação animal de maneira segura e são adequadas para beneficiar o estado de saúde e a qualidade dos produtos de frangos de carne (Zampiga et al., 2023). São conhecidas por apresentarem uma composição química que lhes confere alto valor nutricional. Espécies como a *Arthrospira platensis*, vulgarmente conhecida como espirulina, podem apresentar até 70% da sua biomassa em conteúdo proteico (Torres-Tiji et al., 2020).

Entretanto, a digestibilidade e bioacessibilidade dos seus componentes, tornam-se um desafio devido a natureza resiliente da sua parede celular (Böcker et al., 2020). Esse problema pode ser mitigado ao utilizar enzimas exógenas para aumentar a biodisponibilidade de proteínas e outros constituintes das microalgas.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da incorporação de espirulina nas dietas de frango de carne, isoladamente ou em combinação com enzimas exógenas (comercial VemoZyme® P ou pancreatina suína) no desempenho zootécnico das aves e na qualidade da sua carne.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Indústria avícola na atualidade

1.1.1. Produção e consumo

Os frangos de carne e as galinhas poedeiras fornecem a maior parte dos produtos avícolas destinados ao consumo humano. A seleção genética elevou drasticamente a produtividade e a eficiência, conduzindo a obtenção de uma proteína animal económica e de alta qualidade para humanos (Korver, 2023).

No ano de 2021, a produção mundial total de carne de frango, alcançou o valor aproximado de 121 milhões de toneladas de carne, sendo que o continente europeu foi responsável por 16,4% desse total e os continentes americanos foram responsáveis pela maior parcela da produção com 42% do total produzido (Figura 1). Os três maiores produtores de carne de frango são os Estados Unidos, a China e o Brasil, com 20,6, 14,7 e 14,6 milhões de toneladas, respetivamente (FAOSTAT 2023).

Média entre os anos 2011-2021

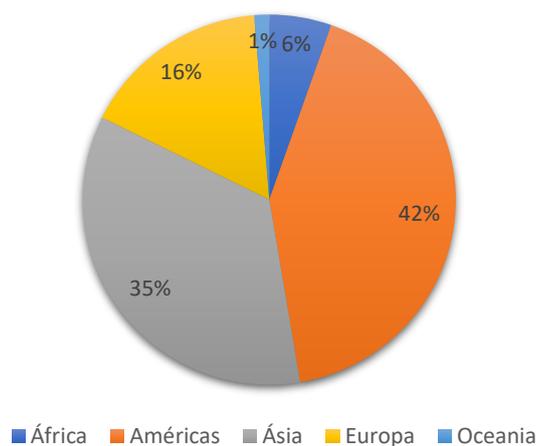


Figura 1. Participação dos continentes na produção de carne de frango

No mesmo ano, o continente europeu atingiu uma produção de aproximadamente 19,5 milhões de toneladas de carne de frango, sendo os países membros da União Europeia (UE) responsáveis pela produção de 10,7 milhões de toneladas. Em Portugal (Figura 2), a produção no ano de 2021 alcançou a média de 300 mil toneladas de carne (FAOSTAT, 2023).

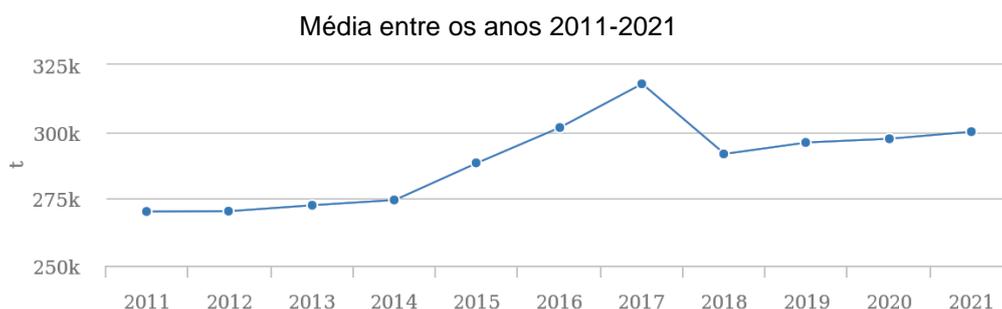


Figura 2. Produção de carne de frango em Portugal

A produção global de carne será impulsionada principalmente pelo crescimento na produção de carne de aves. Mundialmente, o consumo de aves, suínos, bovinos e ovinos deverá crescer 15%, 11%, 10% e 15%, respetivamente, até 2032. Espera-se que a carne de aves represente 41% da proteína consumida, em 2032, seguidas pelas carnes suína, bovina e ovina (OECD-FAO, 2023).

Numa base *per capita* o consumo global de carne de aves em 2022 esteve na média de 14,9 kg/ano/pessoa, sendo a carne de frango a mais consumida no mundo. Israel assumiu a liderança com um consumo médio de 65,4 kg/ano/pessoa, seguido dos EUA com 50,9 kg/ano/pessoa e Malásia com 50,1 kg/ano/pessoa (OECD-FAO, 2023).

Este consumo deverá aumentar 2% até 2032, principalmente aliado ao aumento do consumo de carne de aves. Há vários fatores que concernem, em especial, o menor preço das carnes de aves quando em comparação com outros tipos de carne e a combinação saudável de proteínas e baixo teor de gordura. Além disso, existe uma tendência crescente entre os consumidores de se tornarem cada vez mais sensíveis ao bem-estar animal e às questões ambientais. Nesse sentido, as produções avícolas apresentam a menor pegada de carbono (OECD-FAO, 2023).

O aumento do consumo de aves na última década foi impulsionado pelo aumento do consumo na Ásia, particularmente na China, Índia, Indonésia, Paquistão e Filipinas. Essas tendências continuarão, contudo, prevê-se que o consumo cresça rapidamente noutras regiões, incluindo o Brasil, a África Subsariana e os EUA. Refletir-se-á o papel significativo e crescente da introdução de carne de aves nas dietas em todo o mundo (OECD-FAO, 2023).

Tais mudanças no consumo e produção também refletem a dinâmica da indústria avícola que, constantemente, adapta-se aos desafios emergentes. Para isso, incluem-se os aspetos da genética, da sustentabilidade, da disponibilidade de ingredientes, do mercado e da cadeia de suprimentos, assim como, de mão de obra e automação de processos. Importante ressaltar que um dos grandes desafios para a indústria avícola é

atender às mudanças nas expectativas e percepções do consumidor (Castro et al., 2023). Há uma elevada pressão na indústria e no retalhista para oferecerem aos consumidores, alternativas alimentares que sejam coniventes com o bem-estar animal e a sustentabilidade (Lusk, 2018).

1.1.2. Características da carne de frango

A produção avícola continua a desempenhar um papel crescente no fornecimento de proteína animal segura, nutritiva e acessível à crescente população global devido ao seu ciclo de vida mais curto e à elevada eficiência alimentar quando comparada com outras espécies pecuárias (Castro et al., 2023). Além disso, a carne das aves equipara-se favoravelmente a outros produtos de origem animal, principalmente em termos de conteúdo proteico, de aminoácidos essenciais, de micronutrientes e de calorias (Korver, 2023).

Todavia, a depender da estirpe ou do músculo a ser analisado, estas proporções dos macronutrientes diferem, tal qual acontece com outros micronutrientes, como vitaminas, ácidos gordos ou elementos minerais. Certos fatores, como a idade, sexo, método de manejo, dieta, também colaboram para as discrepantes proporções dos elementos constituintes (Mlaga et al., 2022).

A carne de frango é constituída por 60-80% de água e tem um alto teor proteico em torno dos 23–25% no peito e 18% na coxa. Os principais aminoácidos são glutamina, asparagina, lisina, leucina, arginina e alanina. A composição em aminoácidos é relativamente estável, todavia, algumas variações podem ocorrer devido a modulação da ingestão de aminoácidos nas dietas para frangos (Baéza et al., 2021).

A fração mais variável da composição nutricional é a dos lípidos, o teor médio de gordura é de 1,3% no peito e 4,5% na coxa. Sendo os triacilgliceróis, os mais abundantes na sua composição lipídica, com uma média de 0,7% no peito e 3% na coxa de frango. O teor de fosfolípidos é de 0,6% no peito e 0,8% na coxa (Baéza et al., 2021).

Os ácidos gordos (AG) na carne de frango, consistem aproximadamente em 1/3 de ácidos gordos saturados (SFA), 1/3 de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e 1/3 de ácidos gordos polinsaturados (PUFA), na sua composição geral. O ácido oleico é o principal MUFA (5/6), seguido do ácido palmitoleico (1/6). Os principais PUFA, geralmente, são os ácidos linoleicos e araquidónicos. O principal fator variante na composição de AG na carne de frango é a composição de AG da dieta (Baéza et al., 2021).

A carne de frango tem diferentes níveis de colesterol, considerado o mais importante dos esteróis animais, dependente do músculo analisado, sendo de

aproximadamente 199 mg para a coxa sem pele e 115 mg para o peito sem pele. Estes valores são determinados para cada 100 g do alimento. Outros autores descrevem diferentes níveis de colesterol na carne de frango, variando de 30 a 120 mg/100 g (Baéza et al., 2021).

Os óleos de palma aumentam as proporções de cadeia curta e ácidos gordos saturados. A gordura animal enriquece os depósitos lipídicos do frango com ácidos palmítico e esteárico. Por outro lado, com óleos vegetais, as proporções de PUFA com 18 átomos de carbono aumentam. Já os óleos marinhos aumentam significativamente as proporções de PUFA de cadeia longa (Baéza et al., 2021).

O uso de óleos de peixe ricos em n-3 PUFA é uma maneira eficaz de garantir a ingestão diária de AG na dieta de frangos. Entretanto, os óleos de peixe podem ser substituídos pela suplementação por microalgas, assim como também é possível utilizar óleos de linhaça e colza (Baéza et al., 2021).

O conteúdo mineral, principalmente de cálcio, fósforo e potássio, da carne de aves é em média de 1,1%. Esse valor é pouco afetado pela alimentação ou por fatores de criação, desde que a ingestão desses minerais seja suficiente para suportar as necessidades do animal. A carne de aves também contém diferentes micronutrientes como vitaminas, pigmentos carotenoides e oligoelementos, cuja composição será dependente da ingestão diária nas dietas de frangos (Michalczuk et al., 2017).

Os antioxidantes influenciam na capacidade de retenção de água na carne de frango, quando se eleva a quantidade de selênio fornecida na dieta de 0,15 a 0,600 ppm, há redução na perda de suculência após o cozimento da carne (Oliveira et al., 2014). A suplementação alimentar com 40 ou 80 ppm de zinco também aumenta a capacidade de retenção de água em comparação àqueles que não são suplementados.

No entanto, as propriedades intrínsecas da carne de frango podem evoluir para a ocorrência dos processos de oxidação lipídica e proteica, o que implica diretamente na sua qualidade. A estabilidade oxidativa depende do tipo de músculo e da espécie das aves. A coxa de frango apresenta maior teor lipídico do que o peito e, portanto, são mais suscetíveis à oxidação (Baéza et al., 2021).

A estabilidade oxidativa é igualmente influenciada pela alimentação fornecida aos frangos, pois reflete no conteúdo lipídico, níveis de PUFA e antioxidantes presentes na carne, assim como pelo método de conservação da carne fresca (Cortinas et al., 2005). Todavia, o uso de antioxidantes na alimentação limita a suscetibilidade à oxidação da carne, a suplementação com vitamina E, por exemplo, pode limitar a formação de produtos de oxidação do colesterol (Baéza et al., 2021).

1.1.3. Desenvolvimento da nutrição de frangos

Nos últimos anos, os elevados custos da alimentação e da mão-de-obra têm constituído desafios significativos para os produtores de carne em todo o mundo. Os custos da alimentação representam uma parcela significativa do custo total da produção de carne. Atender às necessidades de proteína nas dietas das aves contribui consideravelmente para os altos custos de alimentação.

A maior parte das necessidades proteicas da dieta de um animal é fornecido por fontes de proteína vegetal. Em todo o mundo, tradicionalmente, as fontes de energia mais comumente utilizadas são as providas pelo milho e a soja. No entanto, cereais como o trigo, sorgo e outras culturas oleaginosas também são usadas em formulações de rações em todo o mundo. O farelo de soja é uma das fontes de proteína preferidas no fabrico de rações para aves, e o seu conteúdo proteico varia entre 40-48% a depender do processo de extração (Beski et al., 2015).

O alto teor de proteínas é o principal atrativo para o uso de oleaginosas na alimentação animal, a fim de maximizar a produção pecuária. Visto que, é um nutriente necessário para a síntese dos tecidos, reprodução, homeostase. Deficiências proteicas podem resultar em perda de peso, diminuição da produção e má desempenho no crescimento (Fawcett et al., 2022).

A digestibilidade de dietas à base de milho e farelo de soja é restrita a cerca de 80% para frangos de carne. Esse fator é devido, principalmente, a presença de polissacarídeos não amiláceos no milho e na soja. As frações de fibra nestes ingredientes alimentares são insolúveis por natureza e, portanto, a viscosidade não é um problema para frangos alimentados com dietas a base de milho e farelo de soja (Rao et al., 2021).

No entanto, o aumento previsto na produção de alimentos para animais está a aumentar a discussão quanto as questões ambientais, económicas e sociais relacionadas à produção, processamento e transporte da soja (Zalles et al., 2019; Song et al., 2021). Estas preocupações com a sustentabilidade estão a impulsionar a identificação de fontes alternativas de proteínas nas dietas de aves, sem comprometer o desempenho zootécnico e do estado de saúde (Zampiga et al., 2023).

Há uma tendência na indústria avícola e no desenvolvimento nutricional de aves que consiste no uso de ingredientes naturais como fontes alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento ou outros produtos químicos. As microalgas, por exemplo, são alimentos naturais de alto valor nutricional e que, portanto, poderão ser ingredientes promissores nas dietas de frangos (El-Hady e El Ghalid, 2018; Zampiga et al., 2023).

1.2. Microalgas como fonte alimentar e de sustentabilidade

A fome global em 2022 permaneceu muito acima dos níveis pré-pandêmicos. A proporção da população mundial que enfrenta a fome crônica em 2022 foi de cerca de 9,2% em comparação aos 7,9% em 2019. Depois de aumentar acentuadamente em 2020 devido à pandemia, estima-se que a fome afetou entre 691 e 783 milhões de pessoas no mundo em 2022. Sendo que a componente mais importante da fome é falta de ingestão calórica e proteica apropriada (UNICEF, 2023).

Para alimentar os atuais 735 milhões de pessoas que passam fome e os 2 mil milhões de pessoas adicionais esperados até 2050, é necessária uma mudança profunda no sistema alimentar e agrícola global. Transformar os sistemas alimentares, investir em práticas agrícolas sustentáveis e mitigar o impacto da pandemia na nutrição são imperativos no combate à fome (United Nations, 2023).

Concomitantemente, espera-se que a população mundial aumente para 9,7 mil milhões em 2050 (United Nations, 2023) e que, juntamente com o aumento do padrão de vida e a urbanização, gerem um recrudescimento no consumo de ovos e carne nas próximas décadas. Assim sendo, assume-se uma maior procura por ingredientes para fabrico de rações, especialmente do farelo de soja, comumente utilizado na formulação de rações para aves, suínos e bovinos (Pootthachaya et al., 2023). Contudo a escassez de recursos convencionais como milho e a soja, aliada ao aumento drástico no valor das *commodities*, corroboram com a necessidade de encontrar novas fontes alternativas de proteínas. Nesse sentido, tornam-se as microalgas, potenciais ingredientes sustentáveis para uso em rações (Mishra et al., 2023).

Che et al. (2022) afirmaram que as microalgas são a fonte mais promissora de novos produtos alimentares. As microalgas são microrganismos fotossintetizantes que vêm demonstrando similaridades quanto às frações lipídicas e proteicas, quando comparadas às culturas oleaginosas. Podem fornecer maiores rendimentos por área e maiores taxas de fixação de CO₂ (Fawcett et al., 2022). Têm sido exploradas na indústria para produção de biodiesel, suplementos dietéticos, rações para animais, cosméticos, produtos farmacêuticos e no tratamento de águas residuais (Madeira et al., 2017; Molazadeh et al., 2019).

Na UE, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) afirma que os alimentos que foram significativamente consumidos no território da UE antes de maio de 1997 são considerados seguros ao serem consumidos e, qualquer outro alimento, à exceção dos geneticamente modificados (GMO), após esse período, são rotulados como *novel food* (EFSA, 2023). O regulamento (UE) 2015/2283 do Parlamento Europeu garante que os novos alimentos devem ser submetidos a procedimentos para proteger

a saúde pública. De acordo com a regulamentação de 1997, a UE incluiu algumas espécies de microalgas na lista de alimentos autorizados para mercado dentro da UE, dentre elas a *Arthrospira platensis*. Essa microalga foi também considerada segura para consumo em países como Canadá, China, Índia e Japão (Torres-Tiji et al., 2020).

A biomassa de microalgas oferece diversas oportunidades para o crescimento sustentável de diversas indústrias, o que torna sua utilização relevante para o desenvolvimento sustentável. Podem ser encontradas numa grande variedade de ambientes aquáticos que contém nutrientes inorgânicos (como carbono, nitrogênio, fósforo e outros oligoelementos) e luminosidade (Oliveira et al., 2022).

Além disso, possui alto rendimento de biomassa por área de produção e têm a capacidade de ser cultivada em terras não aráveis usando água potável ou não e, também, em águas mais salinas, o que a torna atrativa para utilização em projetos sustentáveis de larga escala (Torres-Tiji et al., 2020). São preferíveis para a economia circular, pois não necessitam de compostos ou processos complicados, requerem nutrientes leves e essenciais e podem ser cultivados, também, em águas residuais (Singh and Mishra 2021).

As microalgas são um substituto promissor para as oleaginosas, como a soja, e podem contribuir para diminuição da expansão da atividade agrícola tradicional, pois não necessitam de terra arável, remediando e/ou mitigando os impactos ambientais oriundos de outras indústrias (Correa et al., 2020; Fawcett et al., 2022).

As microalgas têm potencial para serem uma solução sustentável para a alimentação humana e animal, mas é necessário maior estudo e investigação para colocar estes organismos na rota principal da produção de alimentos (Torres-Tiji et al., 2020).

1.3. Espirulina, taxonomia, composição bioquímica e valor nutricional

A espirulina é uma cianobactéria filamentosa multicelular. Stanier e Van Niel (1962) classificaram a espirulina como uma alga sob o reino procarionte. De entre os seus géneros, estão a *Arthrospira* e *Spirulina*, sendo a *Arthrospira maxima* e *Arthrospira platensis* as mais conhecidas pelos seus benefícios para a saúde e das primeiras a serem originalmente exploradas como fonte alimentar. Essas espécies também foram categorizadas no género *Spirulina* o que, do ponto de vista científico, afirma a existência de diferenças, porém gera discordâncias quanto à correta taxonomia (Alagawany et al., 2021). O que se sabe é que ambas foram originalmente e são mais comumente chamadas de espirulina. Dessa forma, mantém-se essa referência para a espécie utilizada nesta investigação, a *Arthrospira platensis*.

A espirulina é uma microalga azul-esverdeada que cresce nas águas doces (pH alcalino entre 7 e 8) da África, Ásia e América do Sul. É considerada multifacetada pelos benefícios que apresenta tanto para a saúde humana quanto para a saúde animal. Incluiu ficobiliproteínas, a exemplo da ficocianina, com concentração proteica que varia entre 55-65%, além de minerais, vitaminas, aminoácidos e ácidos gordos essenciais. A espirulina contém tiamina, riboflavina, piridoxina, vitamina B12, vitamina C, carotenoides, cálcio, ferro e antioxidantes (Abd El-Hady et al., 2022).

As microalgas contêm PUFA e proteínas excepcionalmente elevados. Os PUFA mais abundantes são o ácido docosahexaenóico (DHA), ácido linoleico (LA), ácido alfa-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido araquidônico (AA). *A. platensis* contém vários pigmentos como xantofila, clorofila, equinenona, β -caroteno, zeaxantina, mixoxantofila, diatoxantina e cantaxantina. El-Moataaz et al. (2019) apresentaram valores médios da composição química da espirulina o que ressalta o excepcional valor nutricional da mesma (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química da *A. platensis*

Elemento	Conteúdo em <i>A. platensis</i>
Composição aproximada (%)	
Proteínas	56,8
Hidratos de carbono	13,6
Cinzas	10,1
Lípidos	8,33
Humidade	6,98
Fibras	4,25
Vitaminas (mg/100 g)	
Compostos fenólicos	997
Flavonoides	711
β -caroteno	70,0
Vitamina E	60,0
Antioxidante totais	39,2
Niacina	12,2
Riboflavina	3,70
Vitamina B1	3,00
Minerais (mg/100 g)	
Ca	364
P	123
Zn	2,60
Fe	12,4

Na	217
K	170

Devido o seu alto valor proteico, a espirulina é bem apelativa com fonte alimentar, visto que, tem o potencial de substituir os derivados de oleaginosas na alimentação animal, pois as microalgas sintetizam todos os aminoácidos essenciais em grandes quantidades, a exemplo da metionina e lisina, dois dos aminoácidos mais limitantes nas dietas dos animais, a exemplo, dos ruminantes.

Para que as microalgas sejam consideradas como potenciais novas fontes de ingredientes, é crucial o entendimento do fator nutricional e da sua composição (Torres-Tiji et al., 2020). As condições de cultura, fase de crescimento e estado fisiológico dessas microalgas, influenciam diretamente na sua composição bioquímica. Portanto, para ter acesso ao valor nutricional da espirulina, também de suas vitaminas, minerais e bioativos, deve-se determinar e/ou modificar a biodisponibilidade de sua biomassa (Niccolai et al., 2019).

1.3.1. Digestibilidade da espirulina e a utilização de enzimas

Apesar do perfil rico em nutrientes da espirulina, um problema a ser enfrentado ao utilizar microalgas como alimento é a sua parede celular robusta e a resiliência dos seus complexos proteína-pigmento, conhecidos como ficocianinas, que estão ligados às membranas tilacoides das microalgas, e que restringem o acesso das enzimas digestivas aos componentes celulares (Janczyk et al., 2005).

Por esta razão, a informação sobre a digestibilidade da biomassa das microalgas é de extrema importância. Modelos de digestão *in vitro* são amplamente utilizados para o estudo das mudanças estruturais, de digestibilidade e de libertação de componentes alimentares sob condições gastrointestinais simuladas (Niccolai et al., 2019). As enzimas digestivas mais utilizadas (pancreatina, pepsina, tripsina, quimiotripsina, peptidase, α -amilase e lípase) advém de coelhos, podem ter origem suína, humana ou derivarem de sais biliares e mucina (Hur et al., 2011). São enzimas exógenas amplamente utilizadas em nutrição animal, pois promovem o aumento da conversão alimentar e melhoram o acesso das enzimas endógenas aos substratos.

Niccolai et al. (2019) investigaram num modelo *in vitro*, a digestibilidade de 12 biomassas de microalgas determinada por um método enzimático ao usar pepsina e pancreatina. A *A. platensis* atingiu uma taxa de 81% de digestibilidade da proteína bruta, sendo maior do que a encontrada em alimentos como feijão, aveia e trigo (78%, 72% e 77%, respetivamente). Além disso, Costa et al. (2023) confirmaram o efeito benéfico da

pancreatina, especialmente quando precedida de um pré-tratamento de extrusão, na hidrólise de proteínas potencialmente associadas a ficocianinas.

Contudo, as proteínas libertadas da biomassa da espirulina podem sofrer um processo de gelificação, o que pode resultar no aumento da viscosidade da digesta e, conseqüentemente, aprisionar outros nutrientes, o que limita a sua absorção em animais monogástricos. Os autores Pestana et al. (2020) notaram um aumento na viscosidade da digesta, o que causou um declínio no crescimento em frangos alimentados com um nível elevado de espirulina (15% da dieta) suplementada com lisozima. No entanto, sugeriram que a utilização da enzima pode ter causado a ruptura da parede celular da espirulina no intestino de frangos (Coelho et al., 2020).

Embora o papel benéfico das enzimas exógenas na melhoria do valor nutricional das dietas de aves seja de conhecimento de muitos investigadores, ainda permanece uma lacuna significativa quanto à compreensão do impacto *in vivo* no aumento da bioacessibilidade das proteínas da espirulina para animais monogástricos. Existe uma escassez de investigações que avaliem a combinação de períodos de alimentação de longa duração com elevados níveis de inclusão desta microalga.

1.3.2. Benefícios da utilização de espirulina na alimentação de frangos

A espirulina é considerada um dos mais ricos nutrientes orgânicos, fonte natural de antioxidantes e de componentes que a torna uma boa alternativa a ser usada na composição da dieta animal e avícola em todo o mundo. O uso de *A. platensis* na alimentação (figura 3) apresenta diversos benefícios como os efeitos imunoestimulantes, propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Abdel-Moneim et al., 2022).



Figura 3. Aspeto da dieta suplementada com espirulina

Mullenix et al. (2021) observaram que a inclusão de 10% de espirulina em dietas com baixo teor de proteína, reduziu as citocinas inflamatórias em circulação, bem como a translocação bacteriana para o fígado. Os efeitos dos compostos naturais presentes na espirulina têm atraído a atenção de investigadores nos últimos anos. Esse interesse recrudescerá à medida que a proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e o aumento da conscientização dos consumidores sobre o risco do uso excessivo de antimicrobianos na produção de frangos de carne, fazem-se evidentes na atualidade (Abdel-Moneim et al., 2022).

A utilização de antimicrobianos na alimentação animal gera melhorias na taxa de conversão alimentar e ganho de peso corporal, entretanto, são benefícios que na atualidade são ignorados, na medida que reduzem a microflora intestinal e promovem o aumento do desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos, levando à proibição da utilização de antimicrobianos em muitos países. Os promotores naturais usados na alimentação de aves são preferíveis na manutenção da saúde e segurança humana (Abd El-Hady et al., 2022).

Além desses fatores, a combinação de alguns compostos naturais da espirulina, poderia melhorar o desempenho da produção de frangos de carne, sob estresse térmico, por meio dos seus efeitos sinérgicos. A alta temperatura é o fator abiótico que potencialmente contribui para a redução da produtividade e lucro na indústria avícola. Kolluri et al. (2022) alegaram que a incorporação da espirulina em água potável fornecida diariamente a frangos de carne, contribuiu para o efeito imunomodulador, anti-inflamatório e, portanto, para a melhoria dos atributos de saúde e bem-estar em frangos criados durante a época do verão, sem comprometer a produção.

Zampiga et al. (2023) afirmaram que uma potencial estratégia para utilização de microalgas na alimentação de frangos de carne seria o fornecimento nas primeiras fases

do ciclo de criação das aves, quando dietas com alta concentração de proteína bruta devem ser fornecidas para atender as elevadas necessidades de proteínas e aminoácidos aos animais com capacidade de ingestão da dieta ainda limitada.

Contudo, ainda é necessário que mais investigações ocorram para que os efeitos da utilização das microalgas, na nutrição de frangos de carne, sejam mais conclusivos.

2. Objetivos

O objetivo geral do presente estudo consistiu em avaliar o impacto da incorporação de 15% de espirulina nas dietas de frango de carne no período dos 7 aos 35 dias, na performance zootécnica dos animais e na qualidade da sua carne. Adicionalmente, pretende-se avaliar se as incorporações de enzimas exógenas (VemoZyme® P ou a pancreatina suína) potenciam ou revertem os eventuais efeitos obtidos.

Os objetivos específicos consistem em avaliar os efeitos da incorporação da microalga e das enzimas exógenas sobre: o desempenho zootécnico dos animais, a oxidação lipídica da carne, os teores de colesterol e de vitamina E da carne, o teor de lípidos totais e a composição em ácidos gordos da carne.

3. Material e métodos

Os procedimentos experimentais em animais realizados neste estudo foram conduzidos em conformidade com as diretrizes e regulamentos éticos. Os protocolos seguidos foram aprovados pela Comissão de Ética do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) e da Comissão Nacional para a Proteção dos Animais Utilizados para fins Científicos da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Além disso, o estudo respeitou os princípios e as diretrizes específicas definidas na legislação da União Europeia (Diretiva 2010/63/UE) relativa à utilização de animais em investigação científica, assim como os princípios da Comissão de Bem-estar Animal do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa (ORBEA/ISA) cujo estudo foi registado com o seguinte número de protocolo 0421/000/000/2022.

3.1. Maneio dos animais, alimentação e preparação das amostras

O ensaio teve a duração de 35 dias, os animais foram alojados no Instituto Superior de Agronomia (ISA). Um total de 120 pintos machos da linhagem Ross 308, com um dia de idade, foram aleatoriamente alojados em 40 gaiolas com piso de arame (66 cm x 66 cm x 66 cm de dimensão), cada gaiola continha no máximo três animais. A seleção das

aves foi feita com base no peso vivo (PV), com o intuito de obter a maior homogeneidade possível entre os animais. As aves foram criadas numa sala ambientalmente controlada e com iluminação adequada seguindo práticas de criação padrão. A temperatura ambiente (27-28 °C) e a ventilação foram monitorizadas continuamente durante todo o período do estudo (do dia 1 ao dia 35).



Figura 4. Gaiolas utilizadas no ensaio

Cada tipo de dieta (n=10) era fornecido a 10 gaiolas que alojavam os frangos. A quantidade de alimento adicionado e a mortalidade foram registadas diariamente, o peso corporal e o consumo alimentar foram documentados semanalmente. Após a terceira semana, a alimentação foi distribuída duas vezes ao dia, independentemente da ingestão. A partir dos registos diários e semanais, foram calculados o consumo alimentar, o índice de conversão (IC), o ganho de peso médio diário e a mortalidade.

Durante os primeiros 7 dias, as aves tiveram acesso *ad libitum* a uma dieta à base de milho. Do 7º ao 35º dia, as aves foram distribuídas aleatoriamente a uma das quatro dietas experimentais: 1) dieta controlo à base de milho e farelo de soja (CON); 2) dieta com 15% de espirulina em pó (Allmicroalgae, Pataias, Portugal) (SP); 3) dieta com 15% de espirulina em pó suplementada com 0,025% da mistura enzimática comercial VemoZyme® P (VEMO, Sofia, Bulgária) (SPV); e 4) dieta com 15% de espirulina em pó suplementada com 0,10% de extrato de pancreatina suína (Merck, Darmstadt, Alemanha) (SPP).

A mistura enzimática comercial, VemoZyme® P, apresentou atividade proteolítica de 15.000 unidades de tirosina e atividade de amilase de 400 unidades, conforme declarado pelo fabricante. O extrato de pancreatina suína continha 350 FIP-U/g de protease, 6.000 FIP-U/g de lipase e 7.500 FIP-U/g de amilase. Todas as dietas foram formuladas para serem isocalóricas e preparadas no ISA para atender às exigências nutricionais definidas pelo NRC (1994). As amostras da dieta foram analisadas quanto

a matéria seca (MS) e as composições das dietas inicial e de crescimento são fornecidas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2. Composição das dietas para frangos de carne do 7^o ao 14^o dia.

Item	Microalga	Dietas			
	Espirulina	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹
Ingredientes, %					
Milho	-	50,9	58,3	58,3	58,3
Farelo de soja	-	41,8	23,2	23,2	23,2
Óleo de girassol	-	3,40	0	0	0
Cloreto de Sódio	-	0,400	0,400	0,400	0,400
Carbonato de cálcio	-	1,15	1,47	1,47	1,47
Fosfato dicálcico	-	1,80	1,10	1,10	1,10
DL-metionina	-	0,150	0,050	0,050	0,050
L-Lisina	-	0	0,060	0,060	0,060
Premix vitamínico-mineral ²	-	0,400	0,400	0,400	0,400
Espirulina em pó	-	0	15,0	15,0	15,0
VemoZyme [®] P	-	0	0	0,025	0
Pancreatina Suína	-	0	0	0	0,100
Conteúdo de nutrientes					
Energia bruta, MJ/kg MS	18,7	19,1	18,5	18,3	18,2
Proteína Bruta, % MS	52,5	25,5	25,5	26,0	25,7
Gordura bruta, % MS	6,56	6,65	3,87	4,10	3,98
Cinzas, % MS	21,6	7,14	8,93	8,76	8,54

¹ CON: dieta base de milho/soja, no grupo controlo; SP: dieta base com 15% espirulina; SPV: dieta base com 15% espirulina + 0.025% VemoZyme[®] P; SPP: dieta base com 15% espirulina + 0.10% Pancreatina suína.

²O Premix fornecia o seguinte por quilograma de dieta: ácido pantoténico 10 mg, vitamina D₃ 2.400 UI, cianocobalamina 0,02 mg, ácido fólico 1 mg, vitamina K₃ 2 mg, ácido nicotínico 25 mg; vitamina B₆ 2 mg, vitamina A 10.000 UI, vitamina B₁ 2 mg, vitamina E 30 mg, vitamina B₂ 4 mg, Cu 8 mg, Fe 50 mg, I 0,7 mg, Mn 60 mg, Se 0,18 mg, Zn 40 mg.

Tabela 3. Composição das dietas para frango de carne do 14^o ao 35^o dia

Item	Microalga	Dietas			
	Espirulina	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹
Ingredientes, %					
Milho	-	55,6	62,2	62,2	62,2
Farelo de soja	-	36,9	18,6	18,6	18,6

Óleo de girassol	-	4,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	-	0,300	0,400	0,400	0,400
Carbonato de cálcio	-	1,08	1,39	1,39	1,39
Fosfato dicálcico	-	1,60	0,900	0,900	0,900
DL-metionina	-	0,120	0,030	0,030	0,030
L-Lisina	-	0	0,050	0,050	0,050
Premix vitamínico-mineral ²	-	0,400	0,400	0,400	0,400
Espirulina em pó	-	0	15,0	15,0	15,0
VemoZyme [®] P	-	0	0	0,025	0
Pancreatina suína	-	0	0	0	0,100
Conteúdo de nutrientes					
Energia bruta, MJ/kg MS	18,7	19,1	18,5	18,5	18,4
Proteína bruta, % MS	52,5	23,6	23,5	23,1	23,3
Gordura bruta, % MS	6,56	7,88	5,19	5,30	5,14
Cinzas, % MS	21,6	6,41	8,21	8,27	8,19
Cálcio, % MS	1,20	1,42	1,87	2,21	2,01
Fósforo, % MS	0,001	0,710	0,593	0,700	0,660
Sódio, % MS	4,51	0,299	0,860	1,03	0,946
Perfil de ácidos gordos, %					
14:0	0,432	0,072	0,078	0,119	0,113
16:0	39,7	9,90	16,1	16,2	15,9
16:1c9	4,95	0,133	0,796	0,797	0,776
17:0	0,410	0,065	0,105	0,122	0,123
17:1c9	1,88	0,035	0,215	0,222	0,221
18:0	1,75	3,05	3,19	2,56	2,58
18:1c9	6,34	31,8	27,1	26,7	27,4
18:2n-6	17,8	51,1	45,4	46,3	45,9
18:3n-3	15,8	1,27	3,36	3,43	3,46
20:0	0,189	0,379	0,415	0,426	0,431
20:1c11	0,9106	0,160	0,204	0,206	0,215
22:0	0,247	0,580	0,383	0,391	0,393
Perfil de diterpenos, µg/g					
α-Tocoferol	29,5	58,1	57,3	51,1	47,5
α-Tocotrienol	-	4,37	4,36	3,77	4,29
β -Tocoferol		0,512	0,360	0,367	0,342
γ-Tocoferol + β-Tocotrienol	-	7,74	6,96	7,46	6,81
γ-Tocotrienol	-	10,9	10,1	10,6	10,2
δ-Tocoferol	-	0,904	0,752	0,687	0,751
Pigmentos, µg/g MS					

β-Caroteno	294	1,34	115	121	107
Clorofila a ³	1600	13,3	504	517	538
Clorofila b ⁴	1404	26,8	74,0	67,0	70,9
Total clorofila ⁵	3004	40,0	578	584	608
Total carotenoides ⁶	447	2,17	152	154	161
Total clorofila e carotenoides ⁷	3450	42,2	730	738	769
Minerais, mg/kg MS					
Macrominerais					
Cálcio (Ca)	12010	14202	18735	22143	20110
Magnésio (Mg)	8894	1955	1526	1912	1869
Potássio (K)	3230	11961	10587	11501	11161
Enxofre (S)	67,5	2929	3098	3537	3261
Total	69405	41135	48476	56403	52458
Microminerais					
Cobre (Cu)	946	13,2	15,3	16,7	18,4
Ferro (Fe)	129528	156	241	317	284
Magnésio (Mn)	1123	71,0	79,0	96,0	92,3
Zinco (Zn)	99,0	89,3	76,8	93,6	89,3
Total	131697	329	412	523	484
Total macro e microminerais	201101	41464	48888	56926	52942

¹ CON: dieta base de milho/soja, no grupo controlo; SP: dieta base com 15% espirulina; SPV: dieta base com 15% espirulina + 0.025% VemoZyme® P; SPP: dieta base com 15% espirulina + 0.10% Pancreatina suína.

MS – matéria seca;

²O premix fornecia o seguinte por quilograma de dieta: ácido pantoténico 10 mg, vitamina D₃ 2.400 UI, cianocobalamina 0,02 mg, ácido fólico 1 mg, vitamina K₃ 2 mg, ácido nicotínico 25 mg; vitamina B₆ 2 mg, vitamina A 10.000 UI, vitamina B₁ 2 mg, vitamina E 30 mg, vitamina B₂ 4 mg, Cu 8 mg, Fe 50 mg, I 0,7 mg, Mn 60 mg, Se 0,18 mg, Zn 40 mg.

³ Ca: Clorofila a = $11.24 \times A_{662} \text{ nm} - 2.04 \times A_{645} \text{ nm}$.

⁴ Cb: Clorofila b = $20.13 \times A_{645} \text{ nm} - 4.19 \times A_{662} \text{ nm}$.

⁵ Ca + b: Total Clorofila = $7.05 \times A_{662} \text{ nm} + 18.09 \times A_{645} \text{ nm}$.

⁶ Cx + c: Totais carotenoides = $(1000 \times A_{470} \text{ nm} - 1.90 \times Ca - 63.14 \times Cb) / 214$.

⁷ Ccc: Total Clorofila and carotenoides = $(Ca + b) + (Cx + c)$.

No dia 35, 40 aves foram abatidas por meio de insensibilização pelo sistema de eletronarcose. Após o abate foram recolhidas amostras de sangue, músculos da coxa e peito, aparelho digestivo a partir do papo, moela, duodeno, jejuno, íleo, ceco, pâncreas e fígado, e o conteúdo dos órgãos. Todos os órgãos foram pesados e o duodeno, jejuno,

Íleo e ceco foram medidos. Os músculos foram cortados em pequenos pedaços e as amostras foram distribuídas em papelotes de alumínio, embalados a vácuo (Figura 5) e armazenadas em refrigeração e/ou ultracongelação até posterior análise.



Figura 5. Preparação e acondicionamento das amostras

3.2. Determinação da oxidação lipídica na carne

A carne picada do peito esquerdo de cada frango foi dividida em quatro porções e acondicionadas em sacos plásticos. Estas porções foram armazenadas a 4°C durante 0 e 8 dias. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicador de oxidação lipídica, foi medida no dia 0 e no dia 8. Pesou-se, em duplicado, cerca de 1,5 g de carne fresca previamente descongelada para 2 tubos Falcon de 50 ml com tampa. Adicionou-se 1 ml de solução aquosa de EDTA 0,3%, e a amostra foi homogeneizada cuidadosamente. Em seguida, acrescentou-se 5 ml de BHT em *n*-hexano a 0,8 %, homogeneizou-se com cuidado, e por fim, adicionou-se 8 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 5 %. Logo depois, a suspensão foi homogeneizada com Ultra-Turrax durante 30 segundos a 19000-20000 rpm. Centrifugou-se o homogeneizado durante 5 minutos a 1400 g, a seguir, descartou-se a fase superior (*n*-hexano), e o volume restante foi filtrado 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 a 5 % e agitado no vórtex durante 10 segundos. Imediatamente, retirou-se 3 ml de cada amostra da mistura anterior para um tubo de vidro com tampa (16 ml) e adicionou-se 2 ml de TBA a 0,8 %, posteriormente foi incubado no banho a 70° C durante 30 minutos, com pequena agitação. Os tubos foram arrefecidos em água fria durante 5 minutos, medindo-se depois as absorvências a 532 nm contra o branco (mistura de 3 ml TCA 5 % + 2 ml TBA 0,8 %).

O método espectrofotométrico descrito por Mercier et al. (2004) foi utilizado para analisar a capacidade do malondialdeído, um produto da oxidação lipídica, de formar um cromogéneo de cor rosa que absorve luz a 532 nm. As medidas foram realizadas utilizando espectrofotómetro UV/visível (Genesys 150, ThermoScientific, Madison, EUA). Para quantificação de TBARS, foi preparada uma curva de calibração utilizando o padrão externo 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Fluka, Neu Ulm, Alemanha) como precursor do malondialdeído. Os resultados são expressos em miligramas de malondialdeído por quilograma de carne.

3.3. Determinação do colesterol total e vitamina E

A determinação de colesterol total e de vitamina E na carne fresca seguiu o protocolo descrito por Prates et al. (2006), com detalhes específicos fornecidos por Pestana et al. (2020), Alfaia et al. (2021) e Costa et al. (2022). As medições foram realizadas em duplicado e as concentrações foram calculadas com base na técnica de padrão externo utilizando uma curva padrão de área de pico *versus* concentração.

Foram pesadas cerca de 0,75 g de carne fresca, previamente picada, para 2 tubos de 16 ml. Adicionou-se 0,20 g de ácido ascórbico e 5,5 ml de solução de saponificação (KOH+H₂O+etanol), agitou-se de imediato por 10 segundos no vórtex para evitar a aglomeração dos fragmentos da amostra. Logo em seguida, o ar dos tubos foi substituído por azoto durante 30 segundos. Em seguida, agitou-se em vórtex até dissolver completamente o ácido ascórbico, logo depois os tubos foram aquecidos em banho-maria a 80 °C, durante 15 minutos, com agitação a 200 rpm. Os tubos foram arrefecidos em água fria durante 1 minuto, acrescentou-se 1,5 ml de água destilada e 3 ml de *n*-hexano e agitou-se vigorosamente no vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2500 *g* durante 5 minutos. A fase orgânica (superior) foi aspirada para tubos de 16 ml, já previamente com sulfato de sódio anidro adicionado, logo a amostra foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Uma alíquota da amostra foi filtrada por meio do filtro de seringa hidrofóbico 0,45 µm para um frasco de âmbar de 1,5 ml para ser analisada por HPLC.

A análise simultânea do colesterol total e vitamina E das amostras foi realizada por HPLC (HP1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) em fase normal utilizando uma coluna de sílica (Zorbax RX-Sil, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.) e dois detetores, o detetor de fotodíodos UV/Vis (para a análise do colesterol ao comprimento de onda de 202 nm) e o detetor de fluorescência (análise de vitamina E com o comprimento de onda de excitação de 295 nm e de emissão de 325 nm). Como fase móvel utilizou-se 1% isopropanol em *n*-hexano, v/v e o fluxo de 1 ml/min. A duração

e a temperatura da análise foram de 20 minutos e 20°C, respetivamente. O teor de colesterol total e tocoferóis na carne foi calculado, em duplicado, com base no método do padrão externo, a partir do método externo usando uma curva padrão (área do pico *versus* concentração).

3.4. Determinação dos lípidos totais

O teor de matéria seca (MS) das carnes do peito e coxa foi determinado seguindo o método descrito por Rosenkranz (1993). As amostras liofilizadas foram obtidas utilizando um liofilizador (Labogene, CoolSafe, Lillerod, Dinamarca) a -60 °C e 2,0 hPa. O processo de liofilização consistiu na pesagem de cerca de 20,00 g de músculo, foram colocados em copo de plástico e congelados durante 24 horas a -18 °C. De seguida as tomas do ensaio foram colocadas no liofilizador até atingirem peso constante. Após a liofilização, as amostras foram armazenadas em exsicadores até posterior análise.

Para determinar os lípidos totais nas amostras de carne, bem como na dieta, os músculos liofilizados do peito e da coxa foram submetidos à extração lipídica de acordo com o procedimento descrito por Folch e Stanley (1957). O procedimento foi desenvolvido com amostras duplicadas. Os balões de rotoevaporador (IKA HB10 Basic), na véspera da realização da análise, foram previamente tarados e colocados sem tampas na estufa Struers (Fabr. El. A.B Helios) a uma temperatura de 70 °C. Posteriormente, os balões foram retirados da estufa e colocados num exsicador (com sílica gel ativada) e pesados uma hora depois, registando-se os valores. Logo depois, foram novamente colocados no exsicador até posterior utilização.

No dia seguinte, pesou-se 0,150 g de músculo para o tubo de vidro de 16 ml, foi adicionado 1,5 ml de metanol e deixou humedecer durante cinco minutos. Em seguida, o tubo foi agitado no vórtex durante 10 segundos e colocado em banho-maria ultrassónico (Grant, modelo MXB14; Grant Instruments, Cambridge, Inglaterra) durante cinco minutos a 30 °C, foi necessário agitar os tubos regularmente na metade do tempo.

Sequencialmente, começaram-se as extrações. Primeiro foi adicionado 3 ml de diclorometano, agitou-se no vórtex (10 seg.) e, logo depois, novamente ao ultrassom durante 10 min/30 °C. Logo os tubos foram retirados do ultrassom e centrifugados para separar a fase sólida (10 minutos a 2500 rpm), o máximo de solvente foi filtrado para outro tubo de 16 ml por meio da utilização de um filtro normal.

Na segunda extração, foi adicionado à fase sólida 4,5 ml de diclorometano: metanol (2:1), agitou-se no vórtex (10 seg.) e, logo depois, novamente ao ultrassom durante 10 min/30 °C. Logo os tubos foram retirados do ultrassom e centrifugados para separar a

fase sólida (5 minutos a 2500 rpm), o máximo de solvente foi filtrado para outro tubo de 16 ml por meio da utilização de um filtro normal.

Na terceira extração, foi adicionado à fase sólida 4,5 ml de diclorometano: metanol (2:1), agitou-se no vórtex (10 seg.) e, logo depois, novamente ao ultrassom durante 5 min a 30 °C. Logo os tubos foram retirados do ultrassom e centrifugados para separar a fase sólida (10 minutos a 2500 rpm), o máximo de solvente foi escoado para outro tubo de 16 ml por meio da utilização de um filtro normal. Foi adicionado ao filtrado 2,7 ml de solução de cloreto de potássio 0,8%, agitou-se no vórtex (10 seg.) e foi colocado para centrifugar (5 minutos a 2500 rpm). Retirou-se a parte inferior com pipeta de Pasteur, passando por um filtro separador de fases que foi previamente humedecido com diclorometano, para os balões previamente tarados, como descrito anteriormente.

Os erlenmeyers foram levados ao evaporador rotativo a 40 °C, em seguida a evaporação total da amostra, os balões foram colocados em estufa a 40 °C durante duas horas. Em seguida foram postos no exsiccador e foram pesados após uma hora, esse passo foi repetido até que não houvesse variação no peso. A determinação do teor de lípidos foi efetuada de acordo com a seguinte relação:

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

$$\Delta M = M2 - M1$$

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 %.

3.5. Determinação do perfil de ácidos gordos

A transesterificação combinada dos ácidos gordos totais foi desenvolvida segundo o método descrito por Raes e Demeyer (2001). A composição de ácidos gordos dos músculos do peito e da coxa foi determinada pela conversão do resíduo de ácido gordo em ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME). Esta conversão foi realizada utilizando um procedimento combinado de transesterificação básica e ácida.

Primeiramente, dissolveu-se o resíduo contido nos balões da etapa anterior (3.4) em 1 ml de tolueno seco, agitou-se no vórtex até total diluição e transferiu-se o conteúdo para tubos de 16 ml. Em seguida, adicionou-se 100 µl do padrão interno (FAME C21:0

10 mg/ml) em *n*-hexano (de grau cromatográfico) para obter uma concentração final de 1 mg/ml. Posteriormente, acrescentou-se 3 ml de solução de metóxido de sódio 0,5 M, agitou-se no vórtex e, logo depois foi colocado em banho a 50 °C durante 10 minutos, deixando depois arrefecer à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 2 ml de HCL/metanol, agitou-se no vórtex e, logo depois foi colocado em banho a 50 °C durante 15 minutos, deixando depois arrefecer à temperatura ambiente. No fim da reação, acrescentou-se 2 ml de K₂CO₃ 6% e agitou-se no vórtex 10 segundos.

Extraiu-se com 3 ml de *n*-hexano, em seguida, vórtex durante 10 segundos e centrifugação (2500 rpm, 1439 g, 5 min). Logo depois, recolheu-se os sobrenadantes para tubos de 16 ml, previamente adicionados com 0,5 g de sulfato de sódio anidro e carvão ativado no caso de amostras fortemente pigmentadas. As amostras com carvão ficaram em repouso durante 15 minutos. Em seguida, agitou-se no vórtex novamente, e fez-se uma centrifugação rápida (2500 rpm – 1439 g, 5 min) e aspirou-se o solvente para tubos de 16 ml. Esses foram evaporados sob corrente de azoto a 37 °C até a secura, ao resíduo foi adicionado 1 ml de *n*-hexano e, em seguida, aspirado para vial de GC.

A análise dos FAME foi realizada seguindo o método descrito por Pestana et al. (2020). Para a análise foi empregue cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo gasoso (HP7890A, Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA), equipado com detetor de ionização de chama e uma coluna capilar SupelcowaxTM¹⁰ (30 m; 0,20 mm i.d. e 0,20 mm de espessura capilar), (Supelco Inc., Bellefonte, PA).. A temperatura do injetor e do detetor foram ajustadas em 250°C e 280°C, respetivamente. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1,0 ml/min, e *split* de 1:20. A temperatura do forno do cromatógrafo a gás foi programada da seguinte forma: uma temperatura inicial de 50°C foi mantida por 4 minutos, seguida de um aumento de 13°C/min até 175°C (mantida por 20 minutos), e depois um aumento de 4°C/min até 275°C (mantida por 44 minutos).

A quantificação dos FAME foi conseguida utilizando éster metílico do ácido heneicosanóico (21:0) como padrão interno e a conversão das áreas relativas dos picos em percentagens em peso. A composição de ácidos gordos resultante foi expressa como uma percentagem do total de ácidos gordos.

3.6. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o modelo *Generalized Linear Mixed* (GLM) do programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) para a maioria das variáveis. Porém, para os valores de TBARS, foi empregue o procedimento de medidas repetidas no tempo (PROC MIXED) do SAS. A gaiola serviu como unidade experimental para

consumo médio diário da dieta e conversão alimentar. Para determinar diferenças estatísticas entre as dietas, foi realizado um teste de comparações múltiplas significativas utilizando a opção PDIFF, que foi ajustada pelo método de Tukey-Kramer. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para indicar diferenças entre grupos.

4. Resultados

4.1. Desempenho zootécnico

A Tabela 5 mostra que os animais alimentados com as dietas incorporadas com 15% de espirulina, do 7º ao 35º dia, apresentaram diminuição do peso corporal comparativamente ao grupo controlo ($p < 0,001$). O padrão persistiu durante todo o período de tratamento (dias 14, 21, 28 e 35), no qual os frangos alimentados com dietas suplementadas com espirulina apresentaram menores ganhos de peso corporal e menor ingestão média diária da dieta.

Tabela 4. Efeito das dietas no ganho de peso corporal, ingestão média diária da dieta e índice de conversão alimentar.

Item	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>
Peso corporal, g						
dia 7	129	135	128	125	6,29	0,726
dia 14	346 ^a	269 ^b	252 ^b	258 ^b	13,4	<0,001
dia 21	670 ^a	446 ^b	427 ^b	444 ^b	24,1	<0,001
dia 28	1003 ^a	673 ^b	657 ^b	697 ^b	38,0	<0,001
dia 35	1450 ^a	982 ^b	986 ^b	1005 ^b	51,2	<0,001
Ganho de peso corporal, g						
dia 7 - 14	31,0 ^a	19,2 ^b	17,8 ^b	19,1 ^b	1,25	<0,001
dia 14 - 21	46,3 ^a	25,3 ^b	24,9 ^b	26,4 ^b	1,87	<0,001
dia 21 - 28	50,9 ^a	32,4 ^b	32,8 ^b	36,1 ^b	2,64	<0,001
dia 28 - 35	70,7 ^a	51,5 ^b	55,0 ^b	58,1 ^{ab}	3,57	0,003
dia 7 - 35	48,9 ^a	31,4 ^b	31,8 ^b	34,1 ^b	1,80	<0,001
Ingestão média diária da dieta, g/gaiola						
dia 7 - 14	114 ^a	93,8 ^b	90,2 ^b	89,6 ^b	2,67	<0,001
dia 14 - 21	197 ^a	132 ^b	136 ^b	140 ^b	6,09	<0,001
dia 21 - 28	257 ^a	173 ^b	181 ^b	184 ^b	9,57	<0,001
dia 28 - 35	322 ^a	234 ^b	246 ^b	256 ^b	13,4	<0,001
dia 7 - 35	889 ^a	633 ^b	653 ^b	670 ^b	29,2	<0,001
Índice de conversão alimentar						

dia 7 - 14	1,23 ^b	1,58 ^a	1,65 ^a	1,61 ^a	0,031	<0,001
dia 14 - 21	1,51 ^b	1,73 ^a	1,69 ^a	1,73 ^a	0,044	<0,001
dia 21 - 28	1,66	1,70	1,70	1,75	0,061	0,780
dia 28 - 35	1,69	1,78	1,85	1,78	0,068	0,447
dia 7 - 35	1,51 ^b	1,71 ^a	1,74 ^a	1,73 ^a	0,039	0,001

¹ CON: dieta base de milho/soja, no grupo controlo; SP: dieta base com 15% espirulina; SPV: dieta base com 15% espirulina + 0.025% VemoZyme® P; SPP: dieta base com 15% espirulina + 0.10% Pancreatina suína.

^{a-b}- Letras diferentes dentro da mesma linha indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$).

SEM, erro padrão da média

No entanto, a taxa de conversão alimentar, apresentou valores mais elevados para os grupos alimentados com espirulina, independentemente da suplementação enzimática, em comparação com o grupo controlo ($p=0,001$). No entanto, esta tendência foi interrompida entre os dias 21-28 e 28-35, onde não foram observadas diferenças significativas na taxa de conversão alimentar entre os quatro tipos de dieta.

4.2. Avaliação da oxidação lipídica da carne

A Tabela 6 apresenta os resultados sobre a estabilidade oxidativa da carne de peito de frango, em relação às dietas experimentais (CON, SP, SPV e SPP) durante dois períodos (dia 0 e dia 8). A estabilidade oxidativa é avaliada pela medição de substâncias reativas ao TBA, especificamente os níveis de MDA. Vale ressaltar que não foi encontrada interação significativa entre a dieta e o período. Tanto no dia 0 como no dia 8, os níveis de MDA em todos os tratamentos não mostraram diferenças significativas ($p>0,05$).

Tabela 5. Estabilidade oxidativa da carne de peito de frango avaliada pelas substâncias reativas ao TBA

	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>		
Malondialdeído (mg/kg)								
dia 0	0,17	0,18	0,14	0,15	0,021	Dieta 0,137	Período	Dieta*Período
dia 8	0,31	0,27	0,56	0,30	0,087		<0,001	0,059

¹ CON: dieta base de milho/soja, no grupo controlo; SP: dieta base com 15% espirulina; SPV: dieta base com 15% espirulina + 0.025% VemoZyme® P; SPP: dieta base com 15% espirulina + 0.10% Pancreatina suína.

SEM, erro padrão da média

No entanto, uma notável exceção foi observada nos frangos alimentados com a dieta SPV, a qual mostrou um aumento acentuado nos níveis de MDA entre o dia 0 e o dia 8 ($p < 0,001$). Isto indica que a carne proveniente deste grupo está menos protegida contra a oxidação ao fim de oito dias.

4.3. Avaliação do colesterol total e vitamina E

A Tabela 7 mostra o impacto das diferentes dietas experimentais no perfil de diterpenos na carne de frangos de carne e a Tabela 8 mostra o teor de colesterol. Os dados indicam uma diminuição acentuada nos níveis de diterpenos, especificamente α -tocoferol e γ -tocoferol+ β -tocotrienol, nas carnes de peito e coxa de frangos alimentados com dietas à base de espirulina quando comparados ao grupo controlo ($p < 0,001$).

Tabela 6. Perfil dos diterpenos da vitamina E na carne de frango

Item	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>
Carne do peito						Carne da coxa						
Diterpenos, µg/g												
α-Tocoferol	10,5 ^a	2,20 ^b	2,53 ^b	2,00 ^b	0,426	<0,001	9,63 ^a	3,80 ^b	4,41 ^b	3,61 ^b	0,428	<0,001
γ-Tocoferol+β-Tocotrienol	0,11 ^a	0,051 ^b	0,056 ^b	0,046 ^b	0,0098	<0,001	0,114 ^a	0,060 ^{bc}	0,075 ^b	0,056 ^c	0,005	<0,001
α-Tocotrienol	0,13	0,24	0,16	0,18	0,063	0,663	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-Tocoferol	0,026 ^a	0,018 ^b	0,018 ^b	0,018 ^b	0,0011	<0,001	nd	nd	nd	nd	nd	nd

¹ CON: dieta base de milho/soja, no grupo controlo; SP: dieta base com 15% espirulina; SPV: dieta base com 15% espirulina + 0.025% VemoZyme® P; SPP: dieta base com 15% espirulina + 0.10% Pancreatina suína.

^{a-b-c} - Letras diferentes dentro de uma mesma linha indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$).

SEM, erro padrão da média/ nd- não detetado

Tabela 7. Teor de colesterol total na carne de frango

Item	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>
Carne do peito						Carne da coxa						
Colesterol, mg/g	0,790 ^a	0,610 ^b	0,670 ^b	0,620 ^b	0,025	<0,001	0,762	0,809	0,766	0,820	0,043	0,683

¹ CON: dieta base de milho/soja, no grupo controlo; SP: dieta base com 15% espirulina; SPV: dieta base com 15% espirulina + 0.025% VemoZyme® P; SPP: dieta base com 15% espirulina + 0.10% Pancreatina suína.

^{a-b-c} - Letras diferentes dentro de uma mesma linha indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$).

SEM, erro padrão da média

1

2 Para além disso, os diterpenos menores, α -tocotrienol e β -tocoferol, foram
3 apenas detetados na carne do peito. Os teores de colesterol total no peito dos frangos
4 alimentados com espirulina foram significativamente menores do que aqueles
5 alimentados com a dieta controlo ($p < 0,001$). Entretanto, a diferença não foi
6 estatisticamente significativa na carne da coxa entre os quatro tipos de dietas.

7 **4.4. Composição de lípidos e ácidos gordos na carne**

8 A Tabela 9 apresenta o teor de lípidos totais e perfil de ácidos gordos do peito e
9 da coxa de frango. Os teores totais de lípidos no peito de frangos alimentados com
10 espirulina, foram significativamente menores do que aqueles alimentados com a dieta
11 controlo ($p < 0,001$). Entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa na carne
12 da coxa ($p = 0,061$).

13 Para o perfil de ácidos gordos no peito de frango, houve aumento significativo
14 ($p < 0,001$) na composição de diversos ácidos gordos (16:0, 17:0, 14:1c9, 16:1c9, 17:1c9,
15 18:1c11, 20:3n-6, 20:4n-6, 20:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3), de ácidos gordos
16 saturados ($p < 0,001$) e de n-3 PUFA ($p < 0,001$) nos frangos alimentados com espirulina.
17 Todavia, a inclusão da espirulina levou ao decréscimo na composição do teor total de
18 PUFA ($p = 0,001$), de n-6 PUFA ($p < 0,001$), da proporção entre n-6/n-3 PUFA ($p < 0,001$)
19 e da proporção entre PUFA/SFA ($p < 0,001$). Uma observação interessante foi a
20 tendência de diminuição do conteúdo de 18:3n-6 (GLA) com as dietas SP ou SPP, e um
21 aumento com a dieta SPV ($p = 0,046$). As dietas SPV e SPP também aumentaram
22 significativamente os conteúdos de 18:3n-3 (ALA) ($p = 0,033$) e 20:2n-6 (EDA) ($p = 0,002$),
23 respetivamente.

24 Da mesma forma, para a coxa, os frangos alimentados com espirulina exibiram
25 composição maior de certos ácidos gordos (16:0, 17:0, 14:1c9, 16:1c9, 17:1c9, 18:1c11,
26 18:3n-3 e n-3 PUFA) em comparação com o grupo controlo ($p < 0,001$). No entanto, o
27 conteúdo de 18:2n-6 (LA) ($p = 0,003$), de 18:3n-6 (GLA) ($p = 0,001$) e a proporção entre n-
28 6/n-3 ($p = 0,022$), foram significativamente menores nos grupos alimentados com
29 espirulina. Houve uma diminuição significativa no teor total de PUFA ($p = 0,049$) com a
30 inclusão de 15% de espirulina. A carne da coxa de frangos alimentados com SP e SPV
31 apresentou maior teor de 22:6n-3 (DHA) ($p = 0,003$), de SFA ($p = 0,008$), e uma relação
32 PUFA/SFA ($p = 0,005$) significativamente menor do que o grupo controlo. A composição
33 de 20:5n-3 (EPA) ($p = 0,005$), foi significativamente aumentada pelas dietas SP e SPP,
34 enquanto a dieta SPV reduziu significativamente a percentagem de n-6 PUFA ($p = 0,022$).

Tabela 8. Teor de lípidos totais e composição de ácidos gordos na carne de frango

Item	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>	CON ¹	SP ¹	SPV ¹	SPP ¹	SEM	<i>p-value</i>
Carne do peito						Carne da coxa						
Lípidos totais, g/100 g	1,35 ^a	0,819 ^b	0,952 ^b	0,881 ^b	0,079	<0,001	2,90	2,32	2,39	2,45	0,162	0,061
Composição de AG, g/100 g												
12:0	0,022	0,037	0,030	0,028	0,004	0,067	0,021	0,023	0,023	0,028	0,002	0,076
14:0	0,333	0,368	0,374	0,346	0,017	0,300	0,419 ^b	0,492 ^{ab}	0,496 ^a	0,455 ^{ab}	0,020	0,036
14:1c9	0,048 ^b	0,064 ^a	0,060 ^a	0,068 ^a	0,017	0,006	0,062 ^b	0,096 ^a	0,099 ^a	0,092 ^a	0,006	0,001
15:0	0,078 ^b	0,101 ^{ab}	0,098 ^{ab}	0,115 ^a	0,006	0,034	0,084 ^b	0,113 ^a	0,102 ^{ab}	0,115 ^a	0,007	0,018
16:0	16,6 ^b	20,7 ^a	21,0 ^a	20,8 ^a	0,286	<0,001	18,4 ^b	22,1 ^a	22,1 ^a	21,1 ^a	0,683	0,002
16:1c7	0,445	0,551	0,525	0,586	0,036	0,058	0,542 ^b	0,741 ^a	0,715 ^a	0,709 ^a	0,037	0,002
16:1c9	1,43 ^b	2,18 ^a	2,32 ^a	2,14 ^a	0,172	0,003	2,28 ^b	3,90 ^a	4,05 ^a	3,77 ^a	0,244	<0,001
17:0	0,158 ^b	0,251 ^a	0,246 ^a	0,253 ^a	0,011	<0,001	0,170 ^b	0,273 ^a	0,290 ^a	0,263 ^a	0,018	0,000
17:1c9	0,052 ^b	0,086 ^a	0,086 ^a	0,089 ^a	0,004	<0,001	0,063 ^a	0,110 ^b	0,105 ^b	0,077 ^a	0,007	<0,001
18:0	9,10	9,76	9,35	9,72	0,240	0,183	8,05	8,11	7,84	7,72	0,271	0,722
18:1c9	31,4 ^a	26,7 ^b	27,5 ^b	26,0 ^b	0,828	0,000	35,8	34,4	35,1	34,7	0,914	0,714
18:1c11	1,45 ^b	2,51 ^a	2,53 ^a	2,62 ^a	0,077	<0,001	1,39 ^b	2,02 ^a	2,09 ^a	1,99 ^a	0,074	<0,001
18:2n-6	29,1 ^a	21,5 ^b	21,7 ^b	21,9 ^b	0,484	<0,001	27,3 ^a	20,8 ^b	20,2 ^b	21,5 ^b	1,37	0,003
18:3n-6	0,092	0,074	0,100	0,067	0,009	0,046	0,072 ^a	0,056 ^b	0,047 ^b	0,061 ^b	0,004	0,001
18:3n-3	0,454 ^b	0,556 ^{ab}	0,577 ^a	0,555 ^{ab}	0,031	0,033	0,465 ^b	0,746 ^a	0,722 ^a	0,747 ^a	0,049	0,000
20:0	0,100	0,114	0,110	0,110	0,006	0,359	0,098	0,091	0,089	0,093	0,005	0,636

20:1c11	0,258 ^b	0,327 ^{ab}	0,351 ^{ab}	0,382 ^a	0,027	0,019	0,268	0,275	0,298	0,287	0,013	0,381
20:2n-6	0,426 ^b	0,500 ^b	0,504 ^b	0,651 ^a	0,038	0,002	0,230	0,193	0,185	0,209	0,019	0,357
20:3n-6	0,675 ^b	1,28 ^a	1,24 ^a	1,38 ^a	0,063	<0,001	0,383	0,520	0,503	0,508	0,040	0,069
20:4n-6	4,48 ^b	6,69 ^a	6,05 ^a	7,00 ^a	0,364	<0,001	1,86	2,36	2,16	2,24	0,260	0,572
20:3n-3	0,018 ^c	0,047 ^b	0,046 ^b	0,062 ^a	0,004	<0,001	0,017	0,026	0,023	0,027	0,003	0,133
20:5n-3	0,036 ^b	0,144 ^a	0,133 ^a	0,160 ^a	0,012	<0,001	0,023 ^b	0,054 ^a	0,041 ^{ab}	0,045 ^a	0,006	0,005
22:0	0,073 ^b	0,099 ^a	0,086 ^{ab}	0,097 ^{ab}	0,006	0,029	0,047	0,040	0,034	0,041	0,003	0,058
22:1n-9	0,029	0,038	0,046	0,045	0,005	0,060	0,035	0,063	0,073	0,040	0,014	0,194
22:5n-3	0,217 ^b	0,601 ^a	0,540 ^a	0,631 ^a	0,037	<0,001	0,044	0,056	0,053	0,058	0,005	0,208
22:6n-3	0,154 ^b	0,464 ^a	0,417 ^a	0,462 ^a	0,029	<0,001	0,092 ^b	0,254 ^a	0,204 ^a	0,198 ^{ab}	0,029	0,003
Outros	2,63	4,02	3,73	3,52	0,409	0,111	0,063 ^b	0,163 ^a	0,163 ^a	0,149 ^a	0,021	0,004
Soma parcial de ácidos gordos												
SFA	26,5 ^b	31,7 ^a	31,5 ^a	31,6 ^a	0,379	<0,001	27,4 ^b	31,3 ^a	31,0 ^a	29,9 ^{ab}	0,831	0,008
MUFA	35,2	32,4	33,5	32,0	0,992	0,130	40,5	41,6	42,5	41,7	1,19	0,682
PUFA	35,7 ^a	31,9 ^b	31,3 ^b	32,9 ^b	0,738	0,001	30,5	25,1	24,3	25,7	1,64	0,049
n-6 PUFA	34,8 ^a	30,1 ^b	29,6 ^b	31,0 ^b	0,704	<0,001	29,8 ^a	23,9 ^{ab}	23,1 ^b	24,5 ^{ab}	1,60	0,022
n-3 PUFA	0,880 ^b	1,81 ^a	1,72 ^a	1,87 ^a	0,053	<0,001	0,661 ^b	1,24 ^a	1,15 ^a	1,17 ^a	0,079	<0,001
Proporção nutricional												
n-6/n-3	39,9 ^a	16,8 ^b	17,3 ^b	16,6 ^b	0,611	<0,001	44,4 ^a	19,7 ^b	20,5 ^b	22,1 ^b	1,71	<0,001
PUFA/SFA	1,35 ^a	1,01 ^b	1,00 ^b	1,04 ^b	0,029	<0,001	1,16 ^b	0,807 ^a	0,790 ^a	0,872 ^{ab}	0,077	0,005

¹ CON: dieta base de milho/soja, no grupo controlo; SP: dieta base com 15% espirulina; SPV: dieta base com 15% espirulina + 0.025% VemoZyme® P; SPP: dieta base com 15% espirulina + 0.10% Pancreatina suína.

^{a-b-c} - Letras diferentes dentro de uma mesma linha indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$). SEM, erro padrão da média

SFA = 12:0+14:0+15:0+16:0+17:0+18:0+20:0+22:0

MUFA = 14:1c9+ 16:1c7+16:1c9+17:1c9+18:1c9+18:1c11+20:1c11+22:1n-9

PUFA = 18:2n-6+18:3n-6+18:3n-3+18:4n-3+20:2n-6+20:3n-6+20:4n-6+20:3n-3+20:5n-3+22:5n-3+22:6n-3

n-3 PUFA = 18:3n-3+18:4n-3+20:3n-3+20:5n-3+22:5n-3+22:6n-3

n-6 PUFA= 18:2n-6+18:3n-6+20:2n-6+20:3n-6+20:4n-6.

5. Discussão

A presença de complexos proteicos e pigmentares ligados à membrana tilacoide (Böcker et al., 2020; Buecker et al., 2022) da espirulina, associada à recalcitrância da parede celular da microalga, dificultam a hidrólise das proteínas das algas. Essas características, comprometem a bioacessibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes (Spínola et al., 2022). Para mitigar esse problema e aprimorar a bioacessibilidade dos nutrientes das microalgas na carne de frangos, este estudo avaliou a atividade de duas misturas enzimáticas comerciais nas dietas enriquecidas com espirulina.

Uma das misturas enzimáticas contém peptidase e α -amilase (VemoZyme[®] P) e a outra contém peptidases pancreáticas, lipase e amilase (pancreatina suína). Apesar das informações pouco disponíveis sobre a função e aplicabilidade da VemoZyme[®] P na nutrição de aves, outras enzimas do mesmo fabricante, nomeadamente VemoZyme[®] F (uma fitase) e VemoZyme[®] Plus (uma preparação enzimática complexa incluindo carboidrases), foram utilizadas com sucesso nas dietas para galinhas poedeiras e frangos de carne, respetivamente (Saleh et al., 2021; Georgieva et al., 2010).

Prevê-se que a pancreatina, como uma mistura enzimática diversificada, ajude frangos de carne com trato digestivo imaturo a lidar com mudanças dietéticas, à exemplo, da transição de uma dieta controlo para uma dieta enriquecida com espirulina. Notavelmente, estudos anteriores empregaram misturas de pancreatina em dietas para frangos de carne, demonstrando resultados positivos para a digestibilidade da gordura (Al-Marzooqi e Leeson, 1999). No entanto, os efeitos desta mistura na degradação de proteínas de algas ainda não foram explorados.

A espirulina é frequentemente utilizada como suplemento ou ingrediente em dietas de aves, com níveis de incorporação que variam entre 0,25% e 20% (Spínola et al., 2023). Valente et al. (2020) sugeriram que a incorporação de microalgas abaixo de 15% pode aumentar a qualidade da carne sem comprometer o desempenho. Essa evidência também foi comprovada por Park et al. (2018), que comprovaram o efeito benéfico da espirulina no ganho de peso corporal e na taxa de conversão alimentar, em dietas suplementadas com níveis até 1,0% de espirulina. Abdel-Moneim et al. (2022) alegaram que o peso corporal e o ganho de peso corporal foram maiores em dietas de frangos contendo 6% de espirulina, quando comparadas às dietas sem a microalga.

Neste estudo, os grupos de frangos alimentados com espirulina, apresentaram peso corporal e ganho de peso corporal significativamente mais baixos, porém níveis de conversão alimentar maiores quando em comparação ao grupo controle. Essas descobertas ecoam os resultados de Pestana et al. (2020) num ensaio envolvendo o mesmo nível de inclusão de espirulina (15%), todavia durante metade do período, ou seja, do 21º ao 35º dia. Evans et al. (2015) também encontraram resultados que evidenciam que altas incorporações de espirulina (21%) na dieta de aves, implicam taxas produtivas menores, porém os mesmos autores, afirmaram que em dietas adicionadas até 16% de espirulina, alcançavam-se parâmetros estatisticamente semelhantes às dietas de aves alimentadas sem a inclusão da espirulina.

Os presentes resultados podem ser atribuídos ao aumento da viscosidade da digesta no trato digestivo, particularmente no íleo, conforme sugerido por Pestana et al. (2020). A viscosidade aumentada pode influenciar significativamente a digestibilidade, biodisponibilidade e acessibilidade dos nutrientes, levando ao comprometimento do crescimento e desempenho animal (Johnson e Gee, 1986).

As discrepâncias entre os vários estudos publicados podem resultar de fatores como diversas condições de cultivo da espirulina, níveis variáveis de inclusão nas dietas e composição nutricional (Bonos et al., 2016). Fries-Craft et al. (2023) alegaram que novos ingredientes podem melhorar a saúde das aves, todavia, esse benefício e a funcionalidade desses ingredientes podem variar entre as diferentes formulações da dieta basal, os autores enfatizaram a necessidade de comparar os efeitos dos ingredientes alimentares em vários tipos de formulações.

É notório que alguns estudos vêm diversificando a forma de administração e inclusão da espirulina, até mesmo na hidratação das aves. Kolluri et al. (2022) avaliaram o efeito da ingestão oral da espirulina por meio da água de utilização diária e matinal dos frangos, e os benefícios foram evidentes, quando se trata dos efeitos imunomoduladores e imunoestimulantes, auxiliando para melhorias no bem-estar de frangos de carne.

Diante desta necessidade de investigar as microalgas, como ingrediente, em diferentes formulações, muitos estudos elaboram dietas com a utilização de enzimas exógenas, de diferentes tipos e concentrações. Curiosamente, em nosso estudo, a suplementação enzimática na dieta não reverteu a diminuição do crescimento associada à incorporação de espirulina. Entretanto, a adição de pancreatina mitigou ligeiramente o impacto negativo no ganho de peso corporal entre o 28º e 35º dia. O aumento na viscosidade da digesta, causado por níveis elevados das proteínas da espirulina na dieta, poderá ter aprisionado as enzimas e inibido a sua atividade nos nutrientes da dieta, um fenômeno que merece uma investigação mais aprofundada.

A substituição de dietas à base de milho por espirulina requer uma análise bastante cautelosa. O maior teor de PUFA da microalga poderia contribuir para a oxidação lipídica, o que corrobora negativamente na qualidade da carne (Neumann et al., 2017; Gkarane et al., 2020). Além disso, os níveis de PUFA influenciam diretamente na oxidação lipídica (Cortinas et al., 2005). Dessa forma, a carne da coxa, mais gorda do que a carne do peito, estaria mais propensa à atividade oxidativa (Leskanich e Noble, 1997; Betti et al., 2009).

Níveis de TBARS superiores a 0,8 mg/kg podem indicar rancidez oxidativa e afetar negativamente a aceitabilidade da carne devido a alteração do sabor, atributo muito valorizado pelos consumidores (O`Neil et al., 1998; Bonos et al., 2016). Neste estudo, os níveis de TBARS no peito de frango variaram entre 0,14 e 0,56 mg/kg, significativamente abaixo dos valores que poderão indicar rancidez.

A espirulina é uma microalga conhecida pelo seu alto teor de antioxidantes como os tocoferóis (Soni et al., 2017), que podem proteger os lípidos da oxidação (Long et al., 2018). Os nossos resultados indicam que os níveis de vitamina E quer no peito quer na coxa podem refletir a capacidade antioxidante da espirulina em aumentar a estabilidade oxidativa da carne de frango.

Na coxa, o teor de α -tocoferol e γ -tocoferol+ β -tocotrienol nos frangos alimentados com espirulina, foi maior do que no peito, provavelmente devido ao maior teor de gordura da coxa (Ribeiro et al., 2013). Dos diterpenos da vitamina E, o α -tocoferol foi encontrado nas concentrações mais elevadas, enquanto os outros homólogos estavam presentes em níveis mais baixos, consistentes com valores típicos em frangos de carne (Ponte et al., 2008; Ribeiro et al., 2013). Portanto, os resultados deste estudo indicam que a incorporação de 15% de espirulina na dieta pode aumentar a função antioxidante da carne de frango. Esse resultado também foi alcançado por Park et al. (2018) que relataram aumento da atividade antioxidante em frangos alimentados com dietas contendo espirulina, devido a composição química dessa microalga.

As carnes do peito e da coxa são reconhecidas como carnes magras devido ao seu baixo teor de gordura, que geralmente é inferior a 5% (*Food Advisory Committee*, 1990, Baéza et al., 2021). Neste estudo, esses critérios foram ratificados, pois o teor de lípidos totais variou entre 0,82% a 1,4% no peito e entre 2,3% a 2,9% na coxa. A coxa de frango apresentou maior teor de colesterol do que o peito, superando os valores relatados por Pestana et al. (2020). No entanto, a introdução da espirulina culminou na diminuição dos valores de colesterol na carne de peito.

As dietas elaboradas com a espirulina levaram ao aumento, em ambos os tipos de carne, do teor de alguns ácidos gordos. Esse resultado condiz com o apresentado anteriormente por Cortinas et al. (2004) e Botsoglou et al. (2002). Os ácidos gordos mais

abundantes e que apresentaram maior percentagem nas carnes de frangos alimentados com a espirulina, foram o ácido palmítico (16:0), como ácido gordo saturado (SFA), o ácido palmitoleico (16:1c9) como ácido gordo monoinsaturado, o ácido α -linolénico (18:3n-3) foi o mais abundante dos n-3 PUFA e o ácido araquidónico (20:4n-6) dos n-6 PUFA.

A incorporação da espirulina nas dietas de frangos elevou o teor de AG, no geral, em ambos os tipos de carne quando comparados ao grupo controlo. Na carne do peito e da coxa houve predominância do ácido palmítico (16:0) como SFA. Os SFA são mais resistentes à oxidação e são mais facilmente depositados nas carnes (Long et al. 2018).

Como PUFA de cadeia longa (LC-PUFA) o teor de ácido araquidónico (20:4n-6) foi o maior na composição das carnes de frangos alimentados com as dietas adicionadas de espirulina, provavelmente resultante da conversão do ácido linoleico (Martins et al., 2014). Além disso, o teor de ácido linoleico (18:2n-6) foi reduzido no peito e na coxa de frangos alimentados com dietas contendo espirulina.

O fornecimento da dieta SPV, resultou no recrudescimento do ácido α -linolénico (18:3n-3) nas carnes do peito e da coxa. Dessa forma, houve melhorias nos níveis de n-3 PUFA em frangos alimentados com dietas adicionadas de espirulina e de enzimas exógenas.

É crucial garantir uma proporção adequada de ácido linoleico e ácido α -linolénico na dieta para obter uma conversão eficiente do ácido α -linolénico em ácido eicosapentaenóico benéfico (20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (22:6n-3) (Griffin, 2008). Neste estudo, foi observado um aumento nos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico na carne de peito e coxa de frangos alimentados com espirulina. Isto sugere uma possível conversão do ácido α -linolénico nestes LC-PUFA, uma vez que não foram detetados na microalga.

Além disso, a diminuição do total de PUFA na carne de peito e uma tendência de diminuição na carne da coxa, podem sugerir um aumento na síntese de novos ácidos gordos, facilitada pela ação das enzimas dessaturases e elongases, que convertem os PUFA essenciais em LC-PUFA (Barceló-Coblijn e Murphy, 2009). Além da percentagem de LC-PUFA, a composição de ácidos gordos das carnes do peito e coxa foi consistente com as dietas, conforme relatado por outros estudos (Ribeiro et al., 2013; Ribeiro et al., 2014). A adição de VemoZyme[®] P e pancreatina suína não alterou o perfil de ácidos gordos.

A incorporação da espirulina na dieta poderia colmatar esta necessidade (FAO, 2008; Soni et al., 2017). Os PUFA desempenham papéis essenciais em funções como a produção e metabolismo de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (FAO, 2008; Simoupoulos, 2008). As diretrizes dietéticas recomendam uma proporção de PUFA/SFA

em dietas humanas acima de 0,45 e uma proporção n-6/n-3 não superior a 4,0 (Burghardt et al. 2010). Neste estudo, a diretriz para a proporção PUFA/SFA foi atendida, mas a proporção n-6/n-3 nas carnes de peito e coxa em todos os tratamentos dietéticos excedeu significativamente os níveis recomendados.

6. Conclusões

Este estudo revelou que a incorporação elevada de espirulina (15%) por um longo período (do 7.^o ao 35.^o dia), com ou sem a adição de enzimas exógenas, interferiu negativamente no desempenho zootécnico de frangos a partir do 7.^o dia. Contudo, de forma curiosa, a conversão alimentar não foi afetada pela inclusão da microalga na dieta dos 21 aos 35 dias. Além disso, a incorporação da espirulina parece ter contribuído para a melhoria da qualidade da carne, reduzindo o teor de colesterol no peito e melhorando os níveis de antioxidantes e n-3 PUFA no peito e na coxa. Embora as razões para a ocorrência de menor desempenho no ganho de peso corporal em aves alimentadas com espirulina não sejam totalmente compreendidas, parece crucial investigar a biodisponibilidade dos nutrientes dessa microalga.

Todavia, a espirulina e as microalgas, em geral, apresentam-se como uma fonte alimentar sustentável, alternativa às culturas de soja e/ou cereais tradicionalmente utilizadas na nutrição de frangos. Vários estudos já confirmaram os seus efeitos benéficos na saúde de aves, esses muitas vezes atribuídos ao conteúdo das ficocianinas e de antioxidantes, principalmente no que diz respeito ao aumento dos efeitos imunomodulador e imunoestimulante. No entanto, investigações adicionais são necessárias para confirmar que a espirulina pode ser uma excelente escolha em referência aos níveis produtivos na avicultura de carne.

7. Referências bibliográficas

- Abd El-Hady, A. M., & El-Ghalid, O. A. H. (2018). Spirulina platensis Algae (SPA): a novel poultry feed additive. Effect of SPA supplementation in broiler chicken diets on productive performance, lipid profile and calcium-phosphorus metabolism. *World's Poult. Sci. J*, 7498, 1-7.
- Abd El-Hady, A. M., Elghalid, O. A., Elnaggar, A. S., & Abd El-khalek, E. (2022). Growth performance and physiological status evaluation of Spirulina platensis algae supplementation in broiler chicken diet. *Livestock Science*, 263, 105009.
- Abdel-Moneim, A. M. E., Shehata, A. M., Selim, D. A., El-Saadony, M. T., Mesalam, N. M., & Saleh, A. A. (2022). Spirulina platensis and biosynthesized selenium nanoparticles improve performance, antioxidant status, humoral immunity and dietary and ileal microbial populations of heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology*, 104, 103195.
- Alagawany, M., Taha, A. E., Noreldin, A., El-Tarabily, K. A., & Abd El-Hack, M. E. (2021). Nutritional applications of species of Spirulina and Chlorella in farmed fish: A review. *Aquaculture*, 542, 736841.
- Alfaia, C. M., Pestana, J. M., Rodrigues, M., Coelho, D., Aires, M. J., Ribeiro, D. M., ... & Prates, J. A. M. (2021). Influence of dietary Chlorella vulgaris and carbohydrate-active enzymes on growth performance, meat quality and lipid composition of broiler chickens. *Poultry science*, 100(2), 926-937.
- Al-Marzooqi, W., & Leeson, S. (1999). Evaluation of dietary supplements of lipase, detergent, and crude porcine pancreas on fat utilization by young broiler chicks. *Poultry science*, 78(11), 1561-1566.
- Baéza, E., Guillier, L., & Petracci, M. (2021). Review: production factors affecting poultry carcass and meat quality attributes. *Animal* 2022; 16: 100331.
- Barceló-Coblijn, G., & Murphy, E. J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in lipid research*, 48(6), 355-374.
- Beski, S. S., Swick, R. A., & Iji, P. A. (2015). Specialized protein products in broiler chicken nutrition: A review. *Animal Nutrition*, 1(2), 47-53.
- Betti, M., Schneider, B. L., Wismer, W. V., Carney, V. L., Zuidhof, M. J., & Renema, R. A. (2009). Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance. *Poultry Science*, 88(5), 1085-1095.
- Böcker, L., Hostettler, T., Diener, M., Eder, S., Demuth, T., Adamcik, J., ... & Mathys, A. (2020). Time-temperature-resolved functional and structural changes of phycocyanin extracted from Arthrospira platensis/Spirulina. *Food chemistry*, 316, 126374.
- Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Nikolakakis, I., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2016). Spirulina as a functional ingredient in broiler chicken diets. *South African Journal of Animal Science*, 46(1), 94-102.
- Botsoglou, N. A., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Fletouris, D. J., & Spais, A. B. (2002). Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *British poultry science*, 43(2), 223-230.
- Buecker, S., Grossmann, L., Loeffler, M., Leeb, E., & Weiss, J. (2022). Thermal and acidic denaturation of phycocyanin from Arthrospira platensis: Effects of complexation with λ -carrageenan on blue color stability. *Food Chemistry*, 380, 132157.
- Castro, F. L. S., Chai, L., Arango, J., Owens, C. M., Smith, P. A., Reichelt, S., ... & Menconi, A. (2023). Poultry industry paradigms: connecting the dots. *Journal of Applied Poultry Research*, 32(1), 100310.
- Chen, C., Tang, T., Shi, Q., Zhou, Z., & Fan, J. (2022). The potential and challenge of microalgae as promising future food sources. *Trends in Food Science & Technology*.

- Coelho, D., Lopes, P. A., Cardoso, V., Ponte, P., Brás, J., Madeira, M. S., ... & Prates, J. A. (2020). A two-enzyme constituted mixture to improve the degradation of *Arthrospira platensis* microalga cell wall for monogastric diets. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 104(1), 310-321.
- Correa, D. F., Beyer, H. L., Possingham, H. P., García-Ulloa, J., Ghazoul, J., & Schenk, P. M. (2020). Freeing land from biofuel production through microalgal cultivation in the Neotropical region. *Environmental Research Letters*, 15(9), 094094.
- Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., & Baucells, M. D. (2005). Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid oxidation. *Poultry science*, 84(1), 48-55.
- Cortinas, L., Villaverde, C., Galobart, J., Baucells, M. D., Codony, R., & Barroeta, A. C. (2004). Fatty acid content in chicken thigh and breast as affected by dietary polyunsaturation level. *Poultry Science*, 83(7), 1155-1164.
- Costa, M. M., Pestana, J. M., Osório, D., Alfaia, C. M., Martins, C. F., Mourato, M., ... & Prates, J. A. (2022). Effect of dietary *Laminaria digitata* with carbohydrases on broiler production performance and meat quality, lipid profile, and mineral composition. *Animals*, 12(8), 1007.
- Costa, M. M., Spínola, M. P., & Prates, J. A. (2023). Combination of Mechanical/Physical Pretreatments with Trypsin or Pancreatin on *Arthrospira platensis* Protein Degradation. *Agriculture*, 13(1), 198.
- EFSA, European Food Safety Authority. Novel food. 2023, accessed 2023 sept 20. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/novel-food>
- El-Moataaz, S., Ismael, H., & Aborhyem, S. (2019). Assessment of chemical composition of *Spirulina platensis* and its effect on fasting blood glucose and lipid profile in diabetic Rats. *Journal of High Institute of Public Health*, 49(3), 199-211.
- Europeu, P., & da União Europeia, C. (2015). REGULAMENTO (UE) 2015/2283 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, de 25 de novembro de 2015, relativo a novos alimentos, que altera o Regulamento (UE) no 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho e que revoga o Regulamento (CE) no 258/97 do Parlamento E. *Jornal Oficial da União Europeia*, 1-22.
- Evans, A. M., Smith, D. L., & Moritz, J. S. (2015). Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance. *Journal of applied poultry research*, 24(2), 206-214.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2023, accessed 2023 Sept 20. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Fawcett, C. A., Senhorinho, G. N., Laamanen, C. A., & Scott, J. A. (2022). Microalgae as an alternative to oil crops for edible oils and animal feed. *Algal Research*, 64, 102663.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509
- Food Advisory Committee. (1990). Report on review of food labelling and advertising, Her Majesty's Stationery Office, London.
- Fries-Craft, K., Arsenault, R. J., & Bobeck, E. A. (2023). Basal diet composition contributes to differential performance, intestinal health, and immunological responses to a microalgae-based feed ingredient in broiler chickens. *Poultry Science*, 102(1), 102235.
- Georgieva, V., Chobanova, S., Ganchev, G., Manolov, I., Jarkov, D., Lalev, M., & Stoianov, D. (2010). Effect of addition of multienzyme preparation VemoZyme® Plus on productive and slaughter parameters and meat composition of broiler chickens, fed wheat-corn-soybean meal diets. *Agricultural Science and Technology*, 2(4), 197-201.
- Gkarane, V., Ciulu, M., Altmann, B. A., Schmitt, A. O., & Mörlein, D. (2020). The effect of algae or insect supplementation as alternative protein sources on the volatile profile of chicken meat. *Foods*, 9(9), 1235.

- Griffin, B. A. (2008). How relevant is the ratio of dietary n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids to cardiovascular disease risk? Evidence from the OPTILIP study. *Current opinion in lipidology*, 19(1), 57-62.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food chemistry*, 125(1), 1-12.
- Janczyk, P., Wolf, C., & Souffrant, W. B. (2005). Evaluation of nutritional value and safety of the green microalgae *Chlorella vulgaris* treated with novel processing methods. *Arch Zootech*, 8, 132-147.
- Johnson, I. T., & Gee, J. M. (1986). Gastrointestinal adaptation in response to soluble non-available polysaccharides in the rat. *British Journal of Nutrition*, 55(3), 497-505.
- Joint, F. A. O., & Consultation, W. E. (2008). Fats and fatty acids in human nutrition. *Report of an expert consultation*, 10, 14.
- Kolluri, G., Marappan, G., Yadav, A. S., Kumar, A., Mariappan, A. K., Tyagi, J. S., ... & Govinthasamy, P. (2022). Effects of Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a drinking water supplement during cyclical chronic heat stress on broiler chickens: Assessing algal composition, production, stress, health and immune-biochemical indices. *Journal of Thermal Biology*, 103, 103100.
- Korver, D. R. (2023). Current challenges in poultry nutrition, health, and welfare. *animal*, 100755.
- Leskanich, C. O., & Noble, R. C. (1997). Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. *World's Poultry Science Journal*, 53(2), 155-183.
- Long, S. F., Kang, S., Wang, Q. Q., Xu, Y. T., Pan, L., Hu, J. X., ... & Piao, X. S. (2018). Dietary supplementation with DHA-rich microalgae improves performance, serum composition, carcass trait, antioxidant status, and fatty acid profile of broilers. *Poultry science*, 97(6), 1881-1890.
- Lusk, J. L. (2018). Consumer preferences for and beliefs about slow growth chicken. *Poultry science*, 97(12), 4159-4166.
- Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., & Prates, J. A. (2017). Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, 205, 111-121.
- Martins, S. V., Alfaia, C. M., Lopes, P. A., & Prates, J. A. M. (2014). Dietary sources and health implications of arachidonic acid. *Arachidonic Acid-Sources, Biosynthesis and Health Effects*, 29-82.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renerre, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat science*, 66(2), 467-473.
- Michalczyk, M., Zdanowska-Sąsiadek, Ż., Damaziak, K., & Niemiec, J. (2017). Influence of indoor and outdoor systems on meat quality of slow-growing chickens. *CyTA-Journal of Food*, 15(1), 15-20.
- Mishra, P., Das, R., Chaudhary, A., Mishra, B., & Jha, R. (2023). Effects of microalgae, with or without xylanase supplementation, on growth performance, organs development, and gut health parameters of broiler chickens. *Poultry Science*, 103056.
- Mlaga, K. G., Agboka, K., Attivi, K., Tona, K., & Osseyi, E. (2022). Assessment of the chemical characteristics and nutritional quality of meat from broiler chicken fed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Heliyon*, 8(11).
- Molazadeh, M., Ahmadzadeh, H., Pourianfar, H. R., Lyon, S., & Rampelotto, P. H. (2019). The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO₂ biofixation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 42.
- Mullenix, G. J., Greene, E. S., Emami, N. K., Tellez-Isaias, G., Bottje, W. G., Erf, G. F., ... & Dridi, S. (2021). Spirulina platensis inclusion reverses circulating pro-inflammatory (chemo) cytokine profiles in broilers fed low-protein diets. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 287.
- National Research Council. (1994). Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl.Acad. Press, Washington, DC.

Neumann, C., Velten, S., & Liebert, F. (2018). Improving the dietary protein quality by amino acid fortification with a high inclusion level of micro algae (*Spirulina platensis*) or insect meal (*Hermetia illucens*) in meat type chicken diets.

Niccolai, A., Zittelli, G. C., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, *42*, 101617.

OECD/FAO (2023), OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>.

Oliveira, C. Y. B., Jacob, A., Nader, C., Oliveira, C. D. L., Matos, Â. P., Araújo, E. S., ... & Gálvez, A. O. (2022). An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. *Journal of Environmental Management*, *320*, 115897.

Oliveira, T. F. B., Rivera, D. F. R., Mesquita, F. R., Braga, H., Ramos, E. M., & Bertechini, A. G. (2014). Effect of different sources and levels of selenium on performance, meat quality, and tissue characteristics of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, *23*(1), 15-22.

O'Neill, L. M., Galvin, K., Morrissey, P. A., & Buckley, D. J. (1998). Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat and meat products. *British Poultry Science*, *39*(3), 365-371.

Park, J. H., Lee, S. I., & Kim, I. H. (2018). Effect of dietary *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* on the growth performance, antioxidant enzyme activity, nutrient digestibility, cecal microflora, excreta noxious gas emission, and breast meat quality of broiler chickens. *Poultry science*, *97*(7), 2451-2459.

Pestana, J. M., Puerta, B., Santos, H., Madeira, M. S., Alfaia, C. M., Lopes, P. A., ... & Prates, J. A. M. (2020). Impact of dietary incorporation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and exogenous enzymes on broiler performance, carcass traits, and meat quality. *Poultry science*, *99*(5), 2519-2532.

Ponte, P. I. P., Alves, S. P., Bessa, R. J. B., Ferreira, L. M. A., Gama, L. T., Bras, J. L. A., ... & Prates, J. A. M. (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*(1), 80-88.

Pootthachaya, P., Puangsap, W., Bunchalee, P., Plangklang, P., Reungsang, A., Yuangsoi, B., ... & Wongtangintharn, S. (2023). Investigation of nutritional profile, protein solubility and in vitro digestibility of various algae species as an alternative protein source for poultry feed. *Algal Research*, *72*, 103147.

Prates, J. A. M., Quaresma, M. A. G., Bessa, R. J. B., Fontes, C. M. A., & Alfaia, C. M. M. (2006). Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and β -carotene in Barrosã-PDO veal. *Food chemistry*, *94*(3), 469-477.

Rao, S. R., Raju, M. V. L. N., Nagalakshmi, D., Prakash, B., & Paul, S. S. (2021). Effect of supplementation of graded concentrations of xylanase and α -amylase on performance, slaughter variables, and energy digestibility in broiler chickens fed corn-soybean meal-based diet. *Journal of Applied Poultry Research*, *30*(2), 100139.

Regulamento (UE) 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de novembro de 2015, relativo a novos alimentos, que altera o Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho e que revoga o Regulamento (CE) n.º 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1852/2001 da Comissão (Texto relevante para efeitos do EEE).

Ribeiro, T., Lordelo, M. M., Alves, S. P., Bessa, R. J. B., Costa, P., Lemos, J. P. C., ... & 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*(6), 753-765.

Ribeiro, T., Lordelo, M. M., Costa, P., Alves, S. P., Benevides, W. S., Bessa, R. J. B., ... & Prates, J. A. M. (2014). Effect of reduced dietary protein and supplementation with a docosahexaenoic acid product on broiler performance and meat quality. *British poultry science*, *55*(6), 752-765.

- Rosenkranz, F. D. 1993. Freeze drying. In vacuum products. Pages: 201-215 ed. Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK.
- Saleh, A. A., Elsawee, M., Soliman, M. M., Elkon, R. Y., Alzawqari, M. H., Shukry, M., ... & Eltahan, H. (2021). Effect of bacterial or fungal phytase supplementation on the performance, egg quality, plasma biochemical parameters, and reproductive morphology of laying hens. *Animals*, 11(2), 540.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine*, 233(6), 674-688.
- Singh, V., & Mishra, V. (2021). Exploring the effects of different combinations of predictor variables for the treatment of wastewater by microalgae and biomass production. *Biochemical Engineering Journal*, 174, 108129.
- Song, X. P., Hansen, M. C., Potapov, P., Adusei, B., Pickering, J., Adami, M., ... & Tyukavina, A. (2021). Massive soybean expansion in South America since 2000 and implications for conservation. *Nature sustainability*, 4(9), 784-792.
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina—From growth to nutritional product: A review. *Trends in food science & technology*, 69, 157-171.
- Spínola, M. P., Costa, M. M., & Prates, J. A. (2023). Studies on the impact of selected pretreatments on protein solubility of *Arthrospira platensis* microalga. *Agriculture*, 13(1), 221.
- Spínola, M. P., Costa, M. M., & Prates, J. A. M. (2022). Digestive Constraints of *Arthrospira platensis* in Poultry and Swine Feeding. *Foods* 2022, 11, 2984.
- Stanier, R. Y., & Van Niel, C. B. (1962). The concept of a bacterium. *Archiv für Mikrobiologie*, 42, 17-35.
- Torres-Tijji, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2020). Microalgae as a future food source. *Biotechnology advances*, 41, 107536.
- UNICEF. (2023). The State of Food Security and Nutrition in the World 2023.
- UNITED NATIONS. Sustainable Development Goals. 2023. Accessed 2023 Sept 20. <https://www.un.org/en/exhibits/page/sustainable-development-goals>.
- Valente, L. M., Cabrita, A. R., Maia, M. R., Valente, I. M., Engrola, S., Fonseca, A. J., ... & Freire, J. P. B. (2021). Microalgae as feed ingredients for livestock production and aquaculture. In *Microalgae* (pp. 239-312). Academic Press.
- Zalles, V., Hansen, M. C., Potapov, P. V., Stehman, S. V., Tyukavina, A., Pickens, A., ... & Chavez, S. (2019). Near doubling of Brazil's intensive row crop area since 2000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(2), 428-435.
- Zampiga, M., Brugaletta, G., Ceccaroni, F., Bonaldo, A., Pignata, S., & Sirri, F. (2023). Performance response of broiler chickens fed diets containing dehydrated microalgae meal as partial replacement for soybean until 22 days of age. *Animal Feed Science and Technology*, 297, 115573.