

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE *CHLORELLA VULGARIS* NA DIETA, COM E SEM  
SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS, NO VALOR NUTRICIONAL DA  
FRAÇÃO LIPÍDICA E NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DA CARNE DE FRANGO

MARTA AIRES DE JESUS

ORIENTADOR:

Doutor José António Mestre Prates

CO-ORIENTADORA:

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira Mateus

2020

LISBOA

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE *CHLORELLA VULGARIS* NA DIETA, COM E SEM  
SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS, NO VALOR NUTRICIONAL DA  
FRAÇÃO LIPÍDICA E NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DA CARNE DE FRANGO

MARTA AIRES DE JESUS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI:

PRESIDENTE:

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

VOGAIS:

Doutor José António Mestre Prates

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

ORIENTADOR:

Professor Doutor José António Mestre Prates

CO-ORIENTADORA:

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira  
Mateus

2020

LISBOA

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Marta Aires de Jesus

Título da Tese ou Dissertação: EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE CHLORELLA VULGARIS NA DIETA, COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS, NO VALOR NUTRICIONAL DA FRAÇÃO LIPÍDICA E NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DA CARNE DE FRANGO

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2020

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 sob 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.
- NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 2 de março de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Marta Aires de Jesus

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Luísa e José, pelo amor e pela paciência infinita que sempre tiveram comigo ao longo dos anos e por quererem a minha felicidade e realização pessoal. Obrigada por todo o apoio.

Ao Professor Doutor José Prates, por me ter acolhido no seu projeto, pela disponibilidade, pela confiança depositada no meu trabalho, pelo conhecimento transmitido e pela sua ajuda e paciência.

À Doutora Cristina Mateus, por todo acompanhamento que me deu ao longo dos meses, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas explicações relativas ao funcionamento do laboratório de bioquímica e técnicas laboratoriais, pelo carinho, pela paciência, por sempre me ter motivado e pela confiança depositada no meu trabalho.

A todos os professores e convidados do Mestrado em Segurança Alimentar.

À minha família e a todos os meus amigos, em ninguém em especial, mas um obrigada especial a todos eles.

Aos meus colegas de mestrado pela união e força transmitida.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e ao Instituto Superior de Agronomia, ao CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal.

## **Efeito da incorporação de *Chlorella vulgaris* na dieta, com e sem suplementação de enzimas exógenas, no valor nutricional da fração lipídica e na estabilidade oxidativa da carne de frango**

### **Resumo**

As microalgas podem ser uma alternativa promissora para substituir as fontes tradicionais de proteína, principalmente o bagaço de soja, na nutrição de aves. No entanto, a parede celular recalcitrante das microalgas pode constituir uma barreira para a digestibilidade dos nutrientes. Uma estratégia para quebrar esta parede é o uso de enzimas exógenas para melhorar o aproveitamento dos compostos bioativos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da incorporação de 10% de *Chlorella vulgaris*, com ou sem suplementação enzimática, no valor nutricional da fração lipídica e na estabilidade oxidativa da carne de frango. Realizou-se um ensaio com 120 pintos, machos, da estirpe Ross 308 dos quais 40 foram aleatoriamente distribuídos por 4 dietas experimentais ( $n=10$ ): dieta à base de milho e bagaço de soja (controle); dieta base com 10% de *Chlorella vulgaris* (MA); dieta base com 10% *Chlorella vulgaris* suplementada com 0,005% de Rovabio<sup>®</sup> Excel AP (MAR) e dieta base com 10% *Chlorella vulgaris* suplementada com 0,01% de 4 CAZymes selecionadas *in vitro* (MAM). A dieta não influenciou o teor de lípidos totais ( $P > 0,05$ ) na carne de frango (peito e coxa). A inclusão de 10% da microalga com ou sem enzimas promoveu a liberação de  $n-3$  PUFA no peito (18:3 $n-3$  e 18:4 $n-3$ ) e na coxa (18:4 $n-3$ ). Os teores de vitamina E na coxa de frango foram menores nas dietas com *Chlorella vulgaris* não protegendo assim a carne da oxidação lipídica.

Concluindo, a utilização *in vivo* das enzimas exógenas não demonstrou ser eficiente na capacidade de degradar a parede celular de *Chlorella vulgaris*, mas a incorporação desta microalga poderá ser usada como ingrediente em dietas para aves porque não afetou negativamente nem o crescimento nem qualidade da carne de frango.

**Palavras-chave:** carne de frango, *Chlorella vulgaris*, enzimas, fração lipídica, microalgas.

# Effect of the incorporation of *Chlorella vulgaris* in the diet, with or without exogenous enzyme supplementation, on the nutritional value of the lipid fraction and on the oxidative stability of broiler meat

## Abstract

Microalgae may be a promising alternative to replace traditional protein sources, particularly soybean bagasse, in poultry nutrition. However, the recalcitrant cell wall in microalgae can be a barrier to nutrient digestibility. One strategy to break this wall is to use exogenous enzymes to improve the use of bioactive compounds. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of incorporation of 10% *Chlorella vulgaris*, with or without enzymatic supplementation, on the nutritional value of the lipid fraction and on the oxidative stability of chicken meat. A trial was carried out with 120 male Ross 308 chicks, of which 40 were randomly assigned to 4 experimental diets ( $n=10$ ): maize-based diet and soybean meal (control); base diet with 10% *Chlorella vulgaris* (MA); base diet with 10% *C. vulgaris* plus 0.005% of Rovabio<sup>®</sup> Excel AP (MAR) and base diet with 10% *C. vulgaris* plus 0.01% of 4 CAZymes selected *in vitro* (MAM). The diet did not influence the total lipid content ( $P > 0.05$ ) in chicken meat (breast and thigh). Inclusion of microalgae with or without enzymes promoted the release of *n*-3 PUFA in breast (18:3*n*-3 and 18:4*n*-3) and thigh (18:4*n*-3). Vitamin E levels in chicken thigh were lower in diets with inclusion of *Chlorella vulgaris*, thus not protecting the meat from lipid oxidation. In conclusion, the *in vivo* use of exogenous enzymes has not proved to be efficient in the ability to degrade the cell wall of *Chlorella vulgaris*, but the incorporation of this microalgae can be used as an ingredient in poultry diets because did not negatively affect either the growth or the quality of chicken meat.

**Keywords:** chicken meat, *Chlorella vulgaris*, enzymes, lipid fraction, microalgae.

## Índice

Resumo	V
Abstract	VI
Lista de figuras	VIII
Lista de tabelas	IX
Lista de gráficos	X
Lista de abreviaturas	XI
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. Mercado nacional da carne de frango	2
2.2. Composição nutricional da carne de frango	3
2.3. Incorporação de microalgas na dieta de frangos	4
2.4. Suplementação das dietas de frangos com enzimas exógenas	7
2.5. Importância dos lípidos na qualidade, segurança dos alimentos e nutrição humana	9
2.6. Importância da oxidação lipídica na carne	13
3. Objetivos	15
4. Material e métodos	15
4.1. Delineamento experimental	15
4.2. Determinação da matéria-seca e lípidos totais	19
4.3. Determinação do perfil de ácidos gordos	21
4.4. Determinação do teor de colesterol total e vitaminas lipossolúveis	23
4.5. Determinação da estabilidade lipídica (após indução da oxidação <i>in vitro</i> )	25
4.6. Análise estatística	26
5. Resultados e discussão	26
5.1. Teor de lípidos totais	27
5.2. Composição em ácidos gordos	28
5.3. Teor de colesterol e vitaminas lipossolúveis	33
5.4. Estabilidade oxidativa da carne da coxa de frango	37
6. Conclusões e considerações finais	38
Referências bibliográficas	40

## Lista de figuras

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da célula da <i>Chlorella</i> (adaptado de Bauperte et al. 2017)	6
Figura 2 – Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis (adaptado de Cerqueira et al. 2007).	12
Figura 3 – Pesagem em balança analítica de amostras liofilizadas.	20
Figura 4 – Filtros separadores de fases e balões usados na determinação dos lípidos totais.	20
Figura 5 – Balões de rotaevaporador conservados em exsiccador.	21
Figura 6 – Rotaevaporador para evaporação do solvente dos balões.	21
Figura 7 – Concentrador para evaporação de solvente sob corrente de azoto.	22
Figura 8 – Injetor automático do cromatógrafo gasoso.	22
Figura 9 – Frascos de vidro (“vials”) para cromatografia.	23
Figura 10 – Tubos de ensaio com amostras de carne.	24
Figura 11 – Tubos de ensaio com amostras de dietas.	24
Figura 12 – Cromatógrafo líquido de alta pressão.	25
Figura 13 – Filtração por filtro de seringa hidrofóbico para frascos âmbar.	25
Figura 14 – Homogeneizador Ultra-Turrax.	26
Figura 15 – Banho maria com agitação.	26
Figura 16–Tubos de ensaio após reação com ácido tiobarbitúrico.	26

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição nutricional da carne de frango - peito e perna sem peles e crus (adaptado da tabela de composição de alimentos do INSA).	3
Tabela 2 – Doses diárias recomendadas de ácidos gordos e vitamina E (FAO 2010).	11
Tabela 3 – Ingredientes, composição química e perfil de ácidos gordos e de algumas vitaminas lipossolúveis das dietas experimentais ( $n=3$ ).	17
Tabela 4 – Efeito da inclusão de <i>Chlorella vulgaris</i> com e sem suplementação enzimática no perfil de ácidos gordos na carne do peito de frango.	31
Tabela 5 – Efeito da inclusão de <i>Chlorella vulgaris</i> com e sem suplementação enzimática no perfil de ácidos gordos na carne da coxa de frango.	32

## Lista de gráficos

Gráfico 1 – Comparação do consumo de carne de suíno com a carne de animais de capoeira entre 2013 e 2017.	3
Gráfico 2 – Teores de lípidos totais no peito de frango.	27
Gráfico 3 – Teores de lípidos totais na coxa de frango.	28
Gráfico 4 – Teores de colesterol no peito de frango.	34
Gráfico 5 – Teores de colesterol na coxa de frango.	34
Gráfico 6 – Teores de $\alpha$ -tocoferol no peito de frango.	35
Gráfico 7 – Teores de $\alpha$ -tocoferol na coxa de frango.	36
Gráfico 8 – Teores de $\gamma$ -tocoferol no peito de frango.	36
Gráfico 9 – Teores de $\gamma$ -tocoferol na coxa de frango.	37
Gráfico 10 – Efeito das dietas nos valores de TBARS da coxa de frango.	38

## Lista de abreviaturas

AGE- ácidos gordos essenciais

CAZymes – Carbohydrate-Active enZymes / enzimas degradadoras de hidratos de carbono.

DMA – dimetilacetais.

EB – energia bruta

EFSA – *European Food Safety Authority* / Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos.

EPM- Erro padrão da média.

FAME – Fatty Acid Methyl Esters / ésteres metílicos de ácidos gordos.

FAO - *Food and Agriculture Organization* / Organização para Alimentação e Agricultura.

FEPASA - Federação Portuguesa das Associações Avícolas.

GB – gordura bruta.

GC - *Gas Chromatography* / cromatografia gasosa.

HPLC – High Performance/Pressure Liquid Chromatography / cromatografia líquida de alta resolução ou pressão.

INE - Instituto Nacional de Estatística.

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

MS – matéria seca.

MUFA – Monounsaturated Fatty Acids / ácidos gordos monoinsaturados.

OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico.

PB – proteína bruta.

PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids / ácidos gordos polinsaturados.

SFA – Saturated Fatty Acids / ácidos gordos saturados.

UE – European Union / União Europeia.

## 1. Introdução

Nos dias que correm existe uma preocupação crescente, por parte dos consumidores dos países desenvolvidos, em manterem uma alimentação equilibrada e saudável, e também uma procura mais ativa em relação à segurança e à qualidade dos alimentos consumidos. O consumidor está cada vez mais atento, mais informado e é mais fácil através das novas tecnologias ter acesso a informações que há alguns anos atrás não eram possíveis, como por exemplo ter acesso a informação associada ao alimento ao longo de toda a cadeia alimentar desde “o prado ao prato”, conhecendo então o percurso dos alimentos desde que foram produzidos até ao momento em que vão ser consumidos.

Uma das grandes preocupações para além da segurança dos alimentos é a segurança alimentar, em termos de abastecimento e independência, tendo em conta o aumento da população mundial e o aumento do consumo de alimentos. Estima-se que a procura de produtos de origem animal tende a aumentar nos próximos anos com um maior impacto nas carnes de maior consumo a nível global, ou seja, nas carnes de aves e de suíno. Este aumento da procura de carne será particularmente problemático para os animais monogástricos, uma vez que a distribuição atual de cereais para este setor parece ser insustentável, sendo por isso necessário desenvolver alternativas para a indústria de alimentos compostos para animais. Também as restrições e condicionalismos impostos na produção de alimentos na União Europeia (UE), nomeadamente os de origem animal (Soares 2010), e a especulação de preços em matérias-primas, principalmente no que toca a alimentação para animais, que na produção avícola representa a maior fatia de custos das explorações (Ravindran 2012). Em virtude da dependência de Portugal em relação ao bagaço de oleaginosas, à semelhança do que acontece com os restantes países da UE, e em parte no que se refere ao grão de milho, duas matérias-primas fundamentais no fabrico dos alimentos compostos para aves, torna-se necessário a procura de fontes de proteínas alternativas na produção de frangos de carne.

## 2. Revisão bibliográfica

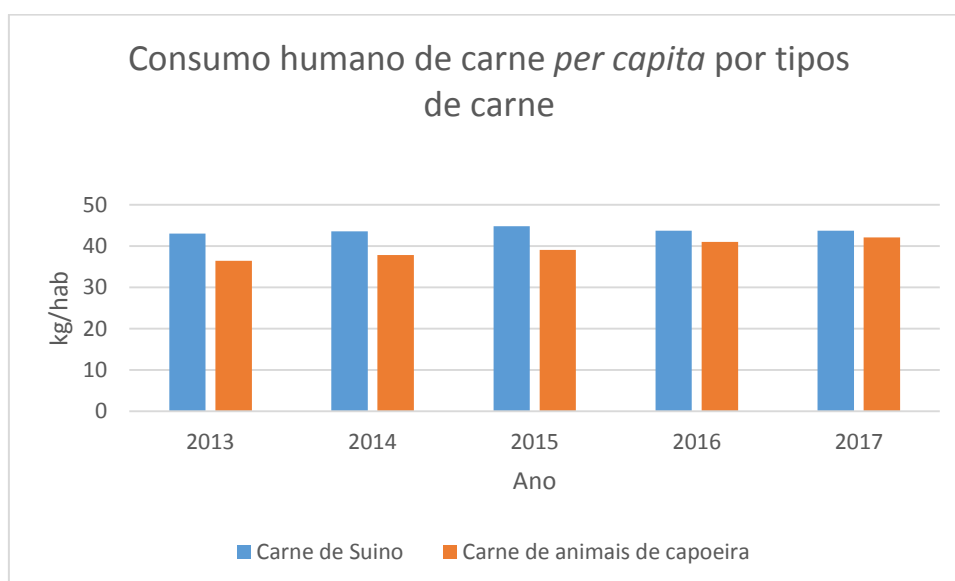
### 2.1. Mercado nacional da carne de frango

A avicultura é o ramo da ago-pecuária que levou mais longe o conceito de intensificação e produção em larga escala, no sentido de encontrar uma resposta pragmática para alguns dos seus objetivos primários: produzir maior quantidade, mais depressa e ao mais baixo custo (Costa 2002). Nos países desenvolvidos é crescente a consciencialização dos consumidores sobre decisões relacionadas com as questões de saúde e sustentabilidade. Este efeito contribuiu para o aumento da popularidade das carnes magras, como a das aves. Segundo a estimativa da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) e a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) das Nações Unidas, espera-se que nos países desenvolvidos o consumo de aves aumente em quase 2 kg *per capita* para atingir 31 kg *per capita* em 2028. São as preocupações com a saúde que motivarão o aumento do consumo de aves, estimando-se que a União Europeia atinja os 1,2 kg/capita até 2028 (OCDE/FAO 2019).

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE 2017), em Portugal, o consumo de carne de animais de capoeira (onde está incluída a carne de frango) tem vindo a aumentar significativamente e tem vindo a aproximar-se da carne de suíno que é a mais consumida (Gráfico 1). Portugal é o maior consumidor *per capita* de carne de aves da Europa comunitária. O consumo *per capita* é de 37,5 kg contra os 22,5 kg da média comunitária.

No segmento da carne de aves, o frango é o mais representativo. O consumo da carne de frango é vista como uma das opções mais saudáveis em termos de consumo de carne, uma vez que se trata de uma carne “branca”. As denominadas carnes brancas são consideradas pelos nutricionistas, melhores que as carnes vermelhas, porque no geral possuem menor teor de colesterol e de gordura e são de mais fácil digestão. Já as carnes vermelhas têm um maior teor de vitamina B<sub>12</sub> e uma maior quantidade de ferro. Esta tendência pode estar relacionada com a procura de hábitos de alimentação mais saudáveis, mas também com o crescimento do mercado das carnes brancas, e com o preço mais reduzido comparativamente ao da carne de bovino, por exemplo. É também importante referir que na escolha do consumidor não importam apenas as características nutricionais mas também as características organolépticas, como a cor o cheiro e a textura da carne, que são características passíveis de ser alteradas através da alimentação dos animais.

**Gráfico 1– Comparação do consumo de carne de suíno com a carne de animais de capoeira entre 2013 e 2017 (adaptado do Instituto Nacional de Estatística, 2019).**



## 2.2. Composição nutricional da carne de frango

A composição média de alguns nutrientes de carne de frango, mais especificamente a composição do peito e da perna, é apresentada na Tabela 1. Diferentes músculos do mesmo animal, podem apresentar diferentes características e diferentes composições.

**Tabela 1 – Composição nutricional da carne de frango (peito e perna sem peles e crus) (adaptado da Tabela da Composição de Alimentos do INSA).**

Componentes (por 100 g de parte edível)	Peito	Perna
Água	73,8 g	74,3 g
Proteína	24,1g	22 g
Gordura total	1,2 g	2,6 g
Ácidos orgânicos	0,2 g	–
Ácidos gordos saturados	0,3 g	0,6 g
Ácidos gordos monoinsaturados	0,4 g	0,9 g
Ácidos gordos polinsaturados	0,2 g	0,5 g
Ácido linoleico	0,2 g	0,5 g
Colesterol	70 mg	100 mg
Vitamina E (α – tocoferol)	0,13 mg	0,17 mg

As principais diferenças existentes entre os dois músculos, de acordo com a Tabela 1, são o peito de frango ter maior quantidade de proteína enquanto a perna ser um músculo mais “gordo” pois apresenta uma maior percentagem de gordura total, de ácidos gordos e também valores mais elevados de colesterol e de  $\alpha$ -tocoferol. Também é importante referir que a diferença entre os dois músculos em grande parte deve-se às suas características metabólicas e contrácteis. Os músculos da coxa e sobrecoxa, de coloração avermelhada, são ricamente vascularizados, com grande número de mitocôndrias e de mioglobina, constituídos predominantemente por fibras oxidativas enquanto o músculo peitoral (*pectoralis major*), de cor branca, é formado predominantemente por fibras glicolíticas (Madeira et al. 2006).

De modo geral, a qualidade da carne de frangos de corte é formada pela segurança, valor nutricional e características sensoriais, sendo a segurança da carne determinada pelo grau de contaminação química e pela presença de agentes patogénicos, o valor nutricional determinado pelo teor de proteínas de alto valor biológico, ácidos gordos insaturados, colesterol, vitaminas e minerais, e as características sensoriais determinadas pela cor, textura, aroma e sabor da carne (Sokolowicz et al. 2016). Outro fator que pode afetar a qualidade da carne de aves é a taxa de crescimento acelerado. Ao longo dos anos observa-se melhorias progressivas na seleção genética para produzir frangos de crescimento rápido. O melhoramento das características sensoriais e nutricionais da carne de frango através da nutrição contribui com cerca de 15 a 20% enquanto que a genética participa com 80-85% do frango de hoje (Havenstein et al. 2003). No entanto, nos últimos anos, têm sido realizados vários estudos com diferentes estratégias nutricionais de modo a melhorar a qualidade da carne de frango e, se possível, mais benéfica para a saúde humana.

### **2.3. Incorporação de microalgas nas dietas de frango**

O aumento da procura e consumo da carne de aves requer, no entanto, uma maior preocupação com a qualidade da mesma, bem como, uma maior preocupação com a qualidade das rações, matérias-primas e os aditivos, com o objetivo da produção de rações com maior valor nutritivo e nutricionalmente seguras, que além de melhorarem o desempenho do animal também melhorem as características físicas e químicas da carne.

Os grãos de cereais são considerados os principais ingredientes das dietas para frangos de carne devido às suas propriedades nutricionais permitindo obter um nível energético elevado (Verstegen 2009). No entanto, os cereais, como exemplo do grão de milho (*Zea mays*), que é o cereal por excelência na alimentação das aves apesar de ser o mais energético, apresenta teor proteico geralmente inferior às

necessidades dos animais, e inclusivamente défice de alguns aminoácidos essenciais (como a lisina e a metionina) limitando a sua utilização e tornando necessário o uso de outros ingredientes como fonte de proteína (McDonald et al. 2002). Para complementar esta escassez proteica do milho e cereais utiliza-se muito a soja, na forma de bagaço de soja, como matéria-prima em dietas de frangos de carne (Santos 2019). A soja é considerada como uma das melhores fontes de proteína de origem vegetal disponíveis para alimentação animal devido à sua composição equilibrada em aminoácidos essenciais e baixo teor de fatores antinutricionais. Nos últimos anos, existe um interesse crescente pela procura de alternativas que possam substituir parcialmente determinados ingredientes usados na composição da dieta de animais, para melhorar o valor nutricional das dietas e o desempenho das aves (Lum et al. 2013).

A utilização eficiente dos recursos naturais na produção de monogástricos deve ser uma prioridade para a sustentabilidade do setor pecuário. As microalgas, e com base na literatura científica, poderão ser uma solução interessante para resolver algumas questões relevantes do século XXI, nomeadamente no que toca à procura de novas fontes de alimento e também de alimentos saudáveis (Derner et al. 2006). As microalgas, recentemente têm sido alvo de muitos estudos, podendo ser um ingrediente promissor nas dietas de frangos como suplemento para o milho e a soja. A incorporação de microalgas na dieta de frangos poderá ser uma opção sustentável na medida que as microalgas se multiplicam rapidamente através da fotossíntese. O seu elevado rendimento fotossintético, comparado com algumas plantas terrestres, conduz a uma grande produção de biomassa rica em proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerais e pigmentos (Madeira et al. 2017). Embora o perfil nutricional das microalgas varie consideravelmente com as espécies, a grande maioria é caracterizada por possuir altos teores de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerais e pigmentos, comparáveis ou mesmo superiores aos alimentos convencionais (Coelho et al. 2019). O teor de lípidos que as microalgas podem apresentar é muito variável, podendo atingir cerca de 60% da matéria seca, sob certas condições, levando alguns autores a considerar as microalgas como uma das principais fontes de biocombustíveis para o futuro (Bernard 2011). As microalgas podem assim desempenhar um papel importante como fonte de produtos naturais e compostos bioativos. Os compostos bioativos são geralmente metabolitos secundários, que incluem vários tipos de substâncias que provêm de ácidos orgânicos, hidratos de carbono, aminoácidos e péptidos, vitaminas, substâncias de crescimento, antibióticos e enzimas. Os metabolitos apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo atividade anticancerígena, antioxidante, antiviral e antiinflamatória

(Bule et al. 2018; Raposo et al. 2013). No entanto, a composição química das microalgas depende da espécie, da estirpe e das condições de crescimento das algas. Tendo em conta as tão variadas composições e espécies de microalgas, podem ser estudadas as suas potencialidades nas diversas áreas científicas.

A *Chlorella* é uma microalga verde eucariótica unicelular de água doce pertencente à classe Trebouxiophyceae, ordem - Chlorellales, família - Chlorellaceae, género – *Chlorella* (Baudelet et al. 2017). Este grupo de microalgas tem sido alvo de grande interesse científico e comercial (Liu and Chen 2016). O género *Chlorella* contém centenas de espécies, sendo a *Chlorella vulgaris* das microalgas mais utilizadas na indústria de alimentos funcionais (Liu and Chen 2016). Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Agency- EFSA*), a *Chlorella vulgaris* já se encontra no mercado como alimento ou ingrediente alimentício e não é considerada um novo alimento pois era consumido em grau significativo antes de 15 de maio de 1997, data a partir da qual são considerados novos alimentos os alimentos que não tinham sido consumidos de forma significativa por humanos no espaço comunitário. A *Chlorella vulgaris*, é rica em proteínas (42–58% da matéria seca, variando com as condições de crescimento) e contém todos os aminoácidos essenciais, fibras, carotenóides, polissacarídeos, vitaminas e minerais (Safi et al. 2014). Entre os pigmentos possui principalmente carotenóides e clorofilas, particularmente luteína, clorofila a e b, e feofitina a, sendo os compostos mais importantes na resposta da capacidade antioxidante (Cha et al. 2010). Durante as condições ideais de crescimento, a *Chlorella vulgaris* pode atingir de 5 a 40% de lípidos e são principalmente compostos de glicolípidos, ceras, hidrocarbonetos, fosfolípidos e pequenas quantidades de ácidos gordos livres. Estes constituintes são sintetizados pelos cloroplastos e localizam-se na parede das membranas de organelos (cloroplasto e mitocôndria) (Figura 1). As condições de stress favorecem a acumulação de lípidos neutros ou triacilgliceróis que se depositam no citosol (Safi et al. 2014).

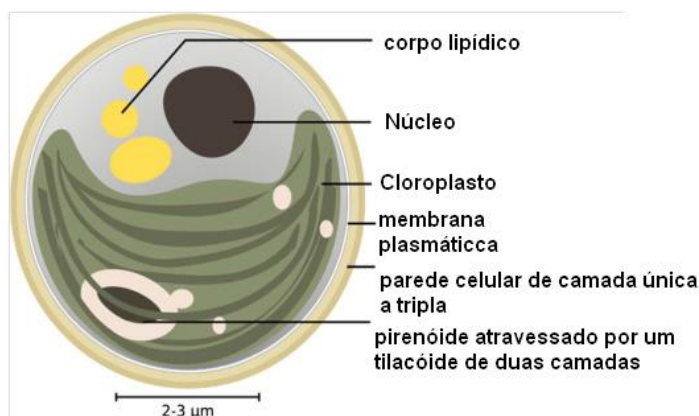


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da célula da *Chlorella*  
(adaptado de Baudalet et al. 2017).

O uso de *Chlorella* como ingrediente de rações é mais recente e a sua utilização em aves é bastante promissora (Liu and Chen 2016).

#### **2.4. Suplementação das dietas de frangos com enzimas exógenas**

As enzimas, na grande maioria proteínas globulares altamente específicas para o seu substrato, são também aplicadas no fabrico de alimentos compostos para animais monogástricos, tendo como objetivo minimizar a variabilidade das matérias primas e melhorar o valor nutritivo dos ingredientes incorporados no alimento concentrado (Bedford and Schulz 1998). De um modo geral, as enzimas são responsáveis pelo aumento da digestibilidade das dietas e ainda pela destruição de compostos que possam interferir com a digestão, absorção e utilização dos mesmos (Teixeira 2013).

Como os animais monogástricos (não ruminantes), tais como as aves, os suínos, os coelhos ou os cavalos, têm uma maior dificuldade na digestão de alguns componentes vegetais, visto que apenas possuem um compartimento simples para a digestão gástrica, a incorporação de enzimas pode melhorar o valor nutricional das dietas para frangos de carne, pois degradam ligações específicas e promovem a quebra dos componentes da fibra, aumentando assim a disponibilidade de nutrientes para a digestão. As enzimas mais utilizadas para este fim são as celulases,  $\beta$ -glucanases, xilanases, amilases, proteases e fitases (Slomninski 2011). Estas enzimas alimentares, principalmente a fitase (Cowieson and Bedford 2009) e as enzimas degradadoras de hidratos de carbono genericamente designadas por CAZymes (*Carbohydrate-Active enZymes*), principalmente xilanases e beta-glucanases, aumentam a conversão alimentar, promovendo um melhor acesso das enzimas endógenas aos seus substratos alvo, promovendo assim a digestibilidade dos alimentos (Choct 2006). A maior parte das misturas enzimáticas comerciais possuem uma composição enzimática muito diversificada. A aplicação das enzimas exógenas pode ser variada, sendo que a que é mais simples e provavelmente a mais praticada é a chamada “over the top”, que consiste em suplementar as enzimas com uma formulação padrão, sem alterar os níveis nutricionais. A alternativa a esta aplicação seria alterar a formulação da ração, por meio da redução dos nutrientes, e adição de enzimas exógenas para restaurar o valor nutricional da dieta padrão que visa o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais recomendados. De facto, a introdução de enzimas exógenas nas dietas de frangos de carne tem vindo a ser cada

vez mais utilizada com os objetivos de maximizar a utilização de nutrientes, melhorar os índices zootécnicos de forma geral, e em particular o índice de conversão alimentar, reduzir os custos associados à alimentação.

Os sistemas de alimentação das aves baseiam-se principalmente em dietas à base de cereais. Alguns cereais contêm, glúcidos complexos, solúveis e não digeríveis pelas enzimas endógenas, que apresentam uma ação antinutricional na alimentação. Os inibidores de proteínas, oxalatos, taninos e nitritos, devido ao fato de interferirem na absorção de nutrientes, podendo acarretar danos à saúde quando ingeridos em elevadas quantidades (Benevides et al. 2011). Então para atenuar os efeitos negativos associados à presença dos glúcidos solúveis, recorre-se à adição de enzimas exógenas para melhorar o valor nutritivo das matérias-primas, inclusivamente das microalgas.

Vários estudos têm demonstrado que as enzimas que hidrolisam os polissacarídeos não amiláceos (PNAs) são capazes de aumentar a utilização dos nutrientes pelas aves, já que eliminam o efeito de proteção provocado pelas paredes celulares vegetais e diminuem a viscosidade do conteúdo digestivo (Slomninski 2011). O termo PNAs é usado frequentemente para se referir à porção antigamente denominada como fibra bruta. Os PNAs classificam-se de acordo com os monossacáridos presentes na sua constituição, e pela configuração ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) das suas ligações glicosídicas. As hexoses como a D-glucose, D-galactose e D-manose assim como a L-arabinose e D-xilose são os monossacáridos que normalmente se encontram nas paredes das células vegetais dos cereais. A estrutura dos PNAs é o fator que condiciona a sua solubilidade em água e são os PNAs solúveis que constituem os principais fatores antinutritivos dos cereais para os monogástricos (Teixeira 2013). Com a adição de enzimas ocorre a libertação do conteúdo celular que se torna disponível à digestão enzimática, aumentando, desta forma, a digestibilidade de alguns dos nutrientes. No entanto, os PNAs têm um alto poder de retenção de água e conseqüentemente podem dificultar a ação enzimática, aumentando o teor de nutrientes não hidrolisados.

Alguns estudos investigaram o efeito da adição de preparados convencionais de xilanases e glucanases e outras, em dietas à base de milho, nos parâmetros produtivos dos frangos de carne (Zanella et al. 1999; Zou et al. 2013). Zanella et al. (1999) mostraram que a suplementação de dieta à base de milho e soja com misturas enzimáticas (xilanase, amilase e protease) promoveu um aumento da digestibilidade dos nutrientes e dos parâmetros reprodutivos dos frangos de carne. Contrariamente, West et al. (2007) não obtiveram diferenças significativas nas dietas à base de milho suplementadas com xilanase e glucanase.

Nas dietas para aves suplementadas com microalgas, devido à presença de paredes celulares recalcitrantes, a eficiência de incorporação das microalgas poderá também ser melhorada pelo uso de CAZymes e constituir uma boa abordagem para melhorar a biodisponibilidade de nutrientes das microalgas diminuindo o custo efetivo de microalgas pela indústria de alimentos para animais. No entanto, a parede celular das microalgas varia de espécie para espécie. Por exemplo, a *Dunaliella sp.* tem uma célula sem parede, a *Euglena gracilis* uma parede celular baseada em proteínas e a *Chlorella sp.* uma parede celular à base de polissacarídeos (Passos and Ferrer 2015). Especificamente, a parede celular composta por polissacarídeos tem uma natureza mais recalcitrante do que a composta por proteínas. As paredes celulares de algumas microalgas geralmente podem ser fracionadas numa fração solúvel chamada “hemicelulose” e um resíduo, a “parede rígida”. As paredes rígidas são compostas principalmente por glucosamina, um polissacarídeo do tipo quitina (Kapaun and Reisser 1995). A parede celular da *Chlorella vulgaris* é composta de uma bainha trilaminar composta de uma camada mais resistente com uma parede secundária subjacente rica em manose e polissacarídeos do tipo quitina (Burczyk and Hesse, 1981). Abo-Shady et al. (1993) verificaram que na parede celular da *Chlorella vulgaris*, 22 a 25% da matéria seca da parede celular é hemicelulósica, enquanto 60 a 66% corresponde à fração rígida da parede. Os principais açúcares neutros encontrados na parede rígida, para além da glucosamina, são a galactose e a ramnose (Takeda et al. 1991). A estrutura e composição da parede celular para o género *Chlorella* foram revistas recentemente por Safi e colaboradores (2014).

Esta parede celular recalcitrante presente nas microalgas confere resistência a invasores e condições ambientais adversas, e, portanto, à extração dos nutrientes. Nas últimas décadas, devido a preocupações ambientais, diversos processos inovadores foram desenvolvidos em biorrefinaria de plantas e algas tentando minimizar o consumo de energia e o uso de poluentes (Barba, Grimi, Vorobiev 2014). Entre estes processos, a extração aquosa assistida por enzima apresenta várias vantagens importantes, como baixo consumo de energia, condições operacionais leves e livres de poluentes, embora com alto custo (Barba, Grimi, Vorobiev 2014; Martin 2016). Contudo, a eficiência de extração dos compostos alvo da parede celular depende da qualidade e precisão quantitativa das atividades enzimáticas escolhidas.

## **2.5. Importância dos lípidos na qualidade, segurança dos alimentos e nutrição humana**

Os lípidos são nutrientes fundamentais, e alguns deles são essenciais pois não são sintetizados no organismo. Os lípidos são macromoléculas biológicas que incluem

um amplo grupo heterogêneo de substâncias hidrofóbicas como triacilgliceróis ou vulgarmente conhecidos como triglicéridos, fosfolípidos, esteróis, vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K), entre outros. Os lípidos desempenham funções biológicas de extrema importância, quer como reserva energética quer ao nível das estruturas (membranas celulares) quer ainda como mensageiros celulares (hormonas).

De forma geral, podemos classificar os lípidos em lípidos neutros ou triacilgliceróis e lípidos polares ou fosfolípidos. Os lípidos neutros constituem a principal reserva energética. As gorduras ou lípidos constituem entre 30 a 40% da energia na dieta dos seres humanos (Mann 2002) fornecendo 9 kcal por cada grama de gordura. Os fosfolípidos são um componente essencial das membranas celulares e a sua quantidade permanece constante, ou aumenta ligeiramente, à medida que o teor de gordura aumenta (Wood et al. 2008).

Os ácidos gordos representam a unidade estrutural dos lípidos e ocorrem na natureza como substâncias livres ou esterificados. A maior parte encontra-se esterificado como glicerol, dando origem aos triacilgliceróis. Os lípidos neutros ou triacilgliceróis são ricos em ácidos gordos saturados e monoinsaturados. Entre os ácidos gordos saturados (SFA), o 12:0, 14:0 e 16:0 são hipercolesterolémicos e, portanto, potencialmente prejudiciais para a saúde humana. O colesterol é um constituinte (esterol) normal de todas as células do organismo, precursor das hormonas esteroides, vitamina D e sais biliares e um componente importante das membranas celulares conferindo-lhes fluidez e rigidez. Cerca de 70% do colesterol é sintetizado endogenamente no nosso organismo (fígado) e aproximadamente 30% é fornecido pela dieta pelos alimentos de origem animal (King 2011). O colesterol quando consumido em excesso (acima dos 300 mg/dia) pode aumentar os níveis sanguíneos e ser um dos fatores de risco para a ocorrência de doença coronária, enfarte do miocárdio ou acidente vascular cerebral. É assim importante reduzir o teor de colesterol nas dietas modernas dos países industrializados e, inclusivamente, os consumidores serem aconselhados em ingerir dietas com baixo teor de colesterol e gorduras saturadas. Na Tabela 2 são apresentadas as doses diárias recomendadas (DDR) de ingestão de alguns ácidos gordos, colesterol e vitamina E segundo a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO 2010). Também a Fundação Portuguesa de Cardiologia (2019) recomenda que o nível de colesterol da dieta não deve exceder as 300 mg por dia.

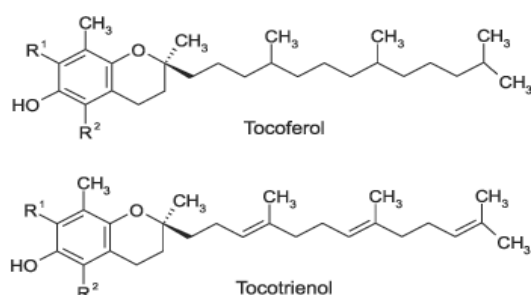
**Tabela 2 – Doses diárias recomendadas de ingestão (FAO 2010).**

<b>Recomendações (g/dia)</b>	
<b>Ômega 3</b>	
18:3 <i>n</i> -3	> 1
EPA+DHA	0,250-500
18:3 <i>n</i> -3 + EPA + DHA	1-4
<b>Ômega 6</b>	
18:2 <i>n</i> -6	5-20
<b>Total Polinsaturados</b>	
18:2 <i>n</i> -6 + 18:3 <i>n</i> -3 + EPA + DHA	13-24
<b>Colesterol</b>	0,300
<b>Vitamina E (α-tocoferol)</b>	0,015

Relativamente aos ácidos gordos insaturados, alguns estudos têm revelado efeitos positivos de dietas ricas em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) sobre os problemas cardiovasculares ao diminuírem os níveis sanguíneos de colesterol transportado pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Kris-Etherton et al. 1999; Roche 1999). Em relação aos ácidos gordos polinsaturados (PUFA), estes podem ser divididos em duas grandes famílias: os ômega 6, atualmente designados *n*-6, e os ômega 3, atualmente designados *n*-3, consoante a sua estrutura química, e cada um dos grupos com ações distintas no organismo. O ácido linoleico (LA, 18:2*n*-6) e o ácido α-linolénico (ALA, 18:3*n*-3) são ácidos gordos essenciais que os seres humanos são incapazes de sintetizar *de novo* tendo que ser por isso fornecidos pela dieta (Arterburn et al. 2006). Estes ácidos gordos são os precursores dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA). O LA e ALA por ação de enzimas dessaturases e elongases são convertidos em LC-PUFA da família *n*-6 e *n*-3, respetivamente. O LA é convertido em ácido araquidónico (AA, 20:4*n*-6) que por sua vez é convertido em ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5*n*-6) e por ação de enzimas lipooxigenases e ciclooxigenases em eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) da série 2 e 4, que apesar de biologicamente mais ativos, são pró-inflamatórios, pró-trombóticos e pró-agregantes (Schmitz and Ecker 2008). O ALA é convertido em ácido estearidónico (18:4*n*-3) e sucessivamente em ácido eicosapentaenóico (20:5*n*-3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6*n*-3) que por ação das ciclooxigenases e lipooxigenases dão origem a eicosanóides da série 3 e 5 que são anti-inflamatórios e antiagregantes.

Os *n*-6 PUFA desempenham um papel importante no desenvolvimento cerebral, no tempo de vida e estrutura das células, na proteção da pele, etc, mas quando consumidos em excesso, podem ter efeitos prejudiciais para a nossa saúde tais como o envelhecimento celular precoce, alterações estruturais das membranas celulares, anomalias na multiplicação celular e indução do aparecimento de carcinomas. Contrariamente, a deficiência de *n*-3 PUFA origina alterações neurológicas, dificuldades de aprendizagem, diminuição da acuidade visual, entre outros. Assim, do ponto de vista nutricional, o consumo de *n*-3 PUFA, em particular do ALA, EPA e DHA poderá ser benéfico para a saúde humana pois favorecem a diminuição do colesterol no sangue, têm propriedades anti-trombóticas (evitam a trombose) e anti-aterogénicas (previnem a aterosclerose), e um efeito protetor sobre o aparecimento das doenças cardiovasculares, de uma forma geral, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças crónicas, tais como o cancro, obesidade (Lopez-Garcia et al. 2004).

As vitaminas lipossolúveis, e em particular a vitamina E, também desempenham um papel importante nos tecidos biológicos e cuja atividade tem sido relacionada com a inibição da oxidação lipídica (Morrissey et al. 1998). A vitamina E é o termo genérico utilizado para 2 classes de substâncias biologicamente ativas, os tocoferóis e os tocotrienóis apresentando ambos 4 formas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -), os quais diferem pelo número e posição dos grupos metilo no anel aromático (Machlin 1991). A vitamina E é um poderoso antioxidante natural presente nos tecidos biológicos e de todos os vitâmeros, o  $\alpha$ -tocoferol é a forma biologicamente mais ativa e a principal fonte de vitamina E encontrada no sangue (Bramley et al. 2000). Na carne, o  $\alpha$ -tocoferol geralmente é também o homólogo presente em maior concentração, podendo aparecer outros homólogos dependendo das carnes e da disponibilidade desses homólogos na dieta dos animais.



Tocoferol / Tocotrienol	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
$\alpha$ -	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ -	CH <sub>3</sub>	H
$\delta$ -	H	H

**Figura 2 – Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis (adaptado de Cerqueira et al. 2007).**

Portanto, a vitamina E como antioxidante natural para além de preservar os alimentos retardando a sua deterioração, descoloração e rancidez decorrente da autooxidação, também protege os sistemas biológicos contra efeitos potencialmente danosos de reações entre as espécies reativas do oxigénio com diversos alvos celulares, como os lípidos, principalmente ácidos gordos polinsaturados, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos (Adegoke et al. 1998).

A vitamina A engloba uma família de compostos essenciais lipossolúveis com estrutura semelhante ao retinol. Os carotenoides com atividade de pró-vitamina A que atuam como precursores do retinol, o  $\alpha$ -caroteno, o  $\beta$ -caroteno e a criptoxantina são muitas vezes considerados também vitamina A (Rao 2007). Entre os aproximadamente 600 carotenoides descobertos, seis deles ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina) representam mais de 95% da concentração total dos carotenoides (Maiani 2009). Alguns estudos epidemiológicos sugerem que os carotenoides exercem um papel protetor importante contra as doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro (Knekt 1994). Embora o mecanismo de ação ainda não esteja totalmente elucidado em parte depende da sua atividade antioxidante (Mcnulty 2008), mas também da sua participação na regulação do crescimento celular e na modulação da expressão génica. A ação antioxidante dos carotenoides resulta da sua capacidade de reagir com o oxigénio singlete, interrompendo a propagação de reações de peroxidação lipídica. É relevante mencionar que alguns carotenoides, como o  $\beta$ -caroteno, podem apresentar propriedades pró-oxidantes em condições específicas (Norman 2001), o que reforça a necessidade de mais estudos para esclarecer o mecanismo pelo qual os carotenoides exercem seus efeitos na saúde humana.

Em geral, o interesse por antioxidantes naturais tem vindo a aumentar devido à perceção negativa dos consumidores acerca da segurança dos antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial carcinogénico, bem como outros efeitos prejudiciais à saúde (Velazco 2005).

## **2.6. Importância da oxidação lipídica na carne**

A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração da carne alterando diversas características sensoriais (cheiro, cor, sabor), valor nutricional (perda de vitaminas, ácidos gordos essenciais) influenciando assim a qualidade da carne e com implicações diretas sobre o seu valor comercial. De facto, um dos

maiores desafios para a indústria de carnes é oferecer produtos com sabor, cor e cheiro agradáveis e que estas características se mantenham estáveis durante toda a vida de prateleira, com maior segurança e menores custos possíveis. Assim, a avaliação do estado de alteração das gorduras representa, quer para o consumidor quer para a indústria, uma causa de depreciação ou mesmo de rejeição dos produtos alimentares. Não só diminui o tempo de vida útil e o valor nutritivo dos produtos alimentares como pode dar origem a formação de compostos nocivos. A oxidação lipídica nos alimentos apresenta assim um problema para a indústria alimentar, pois os produtos formados são indesejáveis tanto pela decomposição dos lípidos como pela produção de compostos voláteis. Estes compostos promovem alterações sensoriais, como também destruição de constituintes essenciais, ocasionando uma diminuição do valor nutricional e a formação de compostos tóxicos, tais como a formação dos produtos de oxidação do colesterol, durante o processamento e armazenamento do alimento (Melo and Guerra 2002; Karpinska et al. 2001).

A oxidação lipídica depende de fatores pró-oxidantes como por exemplo, presença de oxigénio, luz, temperatura, iões metálicos e concentração de ácidos gordos polinsaturados, os principais substratos que compõem os fosfolípidios das membranas celulares e triacilgliceróis, que são particularmente suscetíveis à peroxidação lipídica, resultando a formação de radicais livres (peróxidos e hidroperóxidos) que levam à formação de odores e sabores característicos do ranço, responsáveis por *off flavors*, mas também depende da presença de substâncias antioxidantes naturais (por exemplo, tocoferóis, carotenoides), ou seja, a estabilidade oxidativa depende do equilíbrio entre anti- e pró-oxidantes, mas também das condições de processamento e de armazenamento do género alimentício.

Resumindo, a concentração de vitamina E e o grau de insaturação dos ácidos gordos presentes no músculo são os principais intervenientes desta oxidação (Morrissey et al. 1994). Sendo o grau de insaturação uma condicionante para a estabilidade (Morrissey et al. 1998), quanto mais insaturados os ácidos gordos maior a suscetibilidade e extensão da oxidação (Wood et al. 2003). A presença de PUFA na composição da carne de frango torna-a mais suscetível à oxidação lipídica, podendo afetar o sabor, o aroma, a cor e a textura dos alimentos, limitando sua estabilidade e vida útil (Mariutti and Bragagnolo 2009; Almeida et al. 2012). Por outro lado, a vitamina E protege as membranas biológicas de danos oxidativos, contribuindo para a estabilidade da cor e aumentando consequentemente o tempo de prateleira do produto (Arnold et al. 1993).

### 3. Objetivos do trabalho

Considerando que as microalgas podem ser uma alternativa alimentar sustentável e promissora para substituir as fontes tradicionais de proteínas, como o bagaço de soja, para a nutrição de monogástricos (suínos e aves) e que o uso de enzimas exógenas podem constituir uma boa estratégia para degradar as paredes celulares das microalgas, que são uma barreira importante para a digestibilidade e biodisponibilidade dos seus compostos bioativos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da incorporação da microalga *Chlorella vulgaris*, individualmente ou em combinação com enzimas exógenas (Rovabio® Excel AP e uma seleção de CAZymes), na dieta de frangos e qual o impacto na qualidade nutricional da carne de frango (coxa e peito), principalmente a relacionada com a fração lipídica, incluindo lípidos totais, perfil de ácidos gordos e de antioxidantes.

A partir de estudos preliminares em que foram testadas 200 CAZymes e sulfatases, individualmente ou em combinação, verificou-se que a mistura de 4 enzimas composta por exo- $\beta$ -glucosaminidase, alginato liase, desacetilase do ácido peptidoglicano N-acetilmurâmico e lisozima, apresenta uma capacidade efetiva de degradar a parede celular da *Chlorella vulgaris* (Coelho et al. 2019). Assim, a hipótese deste trabalho é testar a eficiência da utilização das microalgas na dieta de frangos através da incorporação de 10% de *Chlorella vulgaris* e se a suplementação enzimática, através da utilização de um complexo enzimático comercial e de uma combinação racional de 4 CAZymes, apresenta uma capacidade efetiva de degradar a parede celular recalcitrante da *Chlorella vulgaris in vivo* e, deste modo, maximizar o valor nutricional da biomassa, em particular em lípidos.

### 4. Material e métodos

#### 4.1. Delineamento experimental

Para a realização deste estudo, realizou-se um ensaio em frangos, que decorreu nas instalações do Instituto Superior de Agronomia, no qual foram utilizados 120 pintos, machos, da estirpe Ross 308 obtidos do aviário Quinta da Freiria. As aves foram anilhadas, pesadas e aleatoriamente alojadas em 40 gaiolas de crescimento, em lotes de 3, em condições de temperatura e humidade controladas. Durante os primeiros 21 dias, os animais foram alimentados com uma dieta completa e equilibrada à base de milho e soja, designada por dieta de crescimento. Posteriormente, do 21º ao 35º dia, os animais foram alimentados *ad libitum* com uma das 4 dietas experimentais com 10 réplicas por tratamento ( $n=10$ ): uma dieta à base de milho e soja ajustada em termos nutricionais para a idade dos animais (grupo controlo, CON); dieta controlo

com 10% da microalga *Chlorella vulgaris* (MA); dieta controlo com 10% *Chlorella vulgaris* suplementada com 0,005% de uma mistura enzimática comercial Rovabio® Excel AP (MAR); dieta controlo com 10% *Chlorella vulgaris* suplementada com 0,01% de uma mistura de 4 CAZymes (MAM). A composição das várias dietas testadas neste ensaio encontra-se descrita na Tabela 3. As dietas experimentais foram administradas nas últimas duas semanas do ensaio (fase de acabamento) e ao 35º dia os animais foram abatidos (dez de cada uma das quatro dietas, sendo 1 por gaiola e o critério utilizado foi o do animal mais pesado). A quantidade de alimento adicionada e a mortalidade foram registadas diariamente e o peso vivo e o consumo de alimento foram registados semanalmente. A partir dos registos (diários e semanais) calculou-se a quantidade de alimento ingerido, o índice de conversão (IC), o ganho médio diário de peso e a mortalidade. Os 40 animais foram insensibilizados através de eletronarcose seguido do destroncamento do pescoço e sangramento. Após o abate, para além do sangue e de vários órgãos do trato gastrointestinal, procedeu-se à recolha dos músculos peitoral (músculo branco, formado predominantemente por fibras glicolíticas) e músculo da coxa e sobrecoxa (músculo vermelho constituído predominantemente por fibras oxidativas). As amostras foram conservadas a –20 °C para posterior análise, à exceção das amostras para determinação da oxidação lipídica que foram conservadas a –80 °C.

**Tabela 3 – Ingredientes, composição química e perfil de ácidos gordos e de algumas vitaminas lipossolúveis das dietas experimentais (n=3).**

Dieta	Controlo	MA	MAR	MAM
	<b><u>Ingredientes</u></b>			
	56% milho	55,5% milho	55,5% de milho	55,5% milho
	37% bagaço soja	26,5% bagaço soja	26,5% bagaço soja	26,5% bagaço soja
	-	10% <i>C. vulgaris</i>	10% <i>C. vulgaris</i>	10% <i>C. vulgaris</i>
	3,6% óleo soja	4,14% óleo soja	4,14% óleo soja	4,14% óleo soja
	1,06% carbonato cálcio	1% carbonato cálcio	1% carbonato cálcio	1% carbonato cálcio
	1,435% fosfato bicálcico	1,5% fosfato bicálcico	1,5% fosfato bicálcico	1,5% fosfato bicálcico
	0,28% metionina sintética	0,36% metionina sintética	0,36% metionina sintética	0,36% metionina sintética
	-	0,3% lisina sintética	0,3% lisina sintética	0,3% lisina sintética
	0,33% premix	0,33% premix	0,33% premix + 0,005% Rovabio® Excel	0,33% premix + 0,01% Mistura 4 CAZymes seleccionadas
	<b><u>Composição proximal</u></b>			
MS (%)	11,0	10,4	10,7	13,6
Água (%)	89,0	89,6	89,3	86,4
Cinzas (% MS)	6,3	6,8	7,0	7,1
Proteína bruta (% MS)	22,4	22,8	22,2	22,1
Energia metabolizável (kcal/g MS)	4,6	4,6	4,6	4,6
	<b><u>Composição em ácidos gordos (% AGT)</u></b>			
14:0	0,1	0,1	0,1	0,2
16:0	12,4	12,6	12,6	13,1
16:1c9	0,1	1,0	1,0	1,2
18:0	2,8	2,8	2,8	3,0
18:1c9	21,6	22,1	22,6	23,2
18:1c11	1,4	1,6	1,6	1,8
18:2n-6	50,5	47,3	48,0	46,5
18:3n-3	5,2	5,5	5,6	5,6
20:0	0,3	0,3	0,3	0,3
20:1c11	0,2	0,3	0,2	0,3
	<b><u>Composição de vitaminas lipossolúveis (µg/g MS)</u></b>			
β-Caroteno	n.d.	83,6	37,3	45,1
α-tocoferol	10,5	42,2	12,4	20,2
α-tocotrienol	1,3	5,9	3,0	2,8
β-tocoferol	0,4	1,0	0,5	0,7
γ-tocoferol+β-tocotrienol	16,2	26,8	14,7	19,3
γ-tocotrienol	2,5	7,6	3,9	3,4
δ-tocoferol	2,0	4,4	2,8	2,9

Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura 4 CAZymes; AGT- ácidos gordos totais; MS- matéria seca; n.d. – não detetado.

As dietas foram analisadas no Instituto Superior de Agronomia (ISA) quanto à matéria seca (MS), por secagem em estufa a 100 °C até peso constante. O teor de nitrogênio (N) de todas as dietas foi determinado pelo método de Kjeldahl, conforme descrito no método AOAC 954.01 (AOAC 2000), e a proteína bruta foi calculada como  $6,25 \times N$ . O teor de cinzas foi determinado pelo método AOAC 942,05 (AOAC 2000). A gordura bruta foi determinada pela extração das dietas com éter de petróleo, utilizando um extrator automático Soxhlet (Gerhardt Analytical Systems, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Alemanha). A energia bruta da alimentação foi determinada por calorimetria adiabática por bomba (Parr 1261, Parr Instrument Company, Moline, IL, EUA).

A microalga usada neste ensaio foi a *Chlorella vulgaris* cuja composição proximal e perfil de ácidos gordos analisada no Instituto Superior de Agronomia e no Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), respetivamente, é apresentada no anexo 2 e 3. Sabendo que as enzimas podem contribuir para degradar parcialmente as paredes celulares das células contendo elevado teor em nutrientes eventualmente encapsulados, libertando-os e tornando-os passíveis de serem despolimerizados pelas enzimas digestivas recorreu-se à suplementação das dietas contendo a microalga com 2 misturas de CAZymes diferentes, a Rovabio® Excel AP e a mistura de 4 CAZymes testada *in vitro* na *Chlorella vulgaris*.

O Rovabio® Excel AP é uma mistura comercial enzimática de enzimas degradadoras de hidratos de carbono onde predominam as endo-1,4- $\beta$ -xilanases (EC 3.2.1.8), e as endo-1,3- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.6-), de origem bacteriana produzida por *Talaromyces versatilis*, inicialmente designado por *Penicillium funiculosum*. Esta combinação de enzimas atua em sinergia para hidrolisar os pentosanos e  $\beta$ -glucanos das matérias primas vegetais, melhorando o valor nutricional dos alimentos que contêm diferentes tipos de cereais (anexo 5). Proporciona ainda uma redução da viscosidade do conteúdo intestinal permitindo uma ação enzimática mais eficaz sobre os conteúdos digestivos e uma melhor digestão e absorção de nutrientes, melhor utilização da energia e à melhoria do desempenho produtivo das aves.

Foi ainda testada a suplementação de uma mistura de 4 CAZymes composta por exo- $\beta$ -glucosaminidase, alginate liase, desacetilase do ácido peptidoglicano N-acetilmurâmico e lisozima, após vários ensaios *in vitro* onde se testaram cerca de 200 enzimas, verificou-se que esta mistura de 4 enzimas é a que obteve os melhores resultados no que concerne à degradação das paredes celulares da microalga *Chlorella vulgaris* usada neste estudo (Coelho et al. 2019).

## 4.2. Determinação da matéria seca e lípidos totais

As amostras dos músculos do peito e da coxa foram inicialmente liofilizadas para determinação do teor de matéria seca (MS) de acordo com o método descrito por Rosenkranz (1993). As amostras foram previamente congeladas durante 24 h a -20 °C. De seguida as tomas do ensaio foram colocadas no liofilizador durante 48 horas, ajustado a -60 °C e 2,0 hPa. Após liofilização, as tomas de ensaio foram pesadas com rigor 0,0001 g e armazenadas em exsiccador. O teor de MS, expresso em grama por grama de massa de músculo, foi calculado pela seguinte relação algébrica:

$$MS \text{ (g/g)} = m_2 / m_1$$

em que  $m_2$ , a massa, expressa em g, da toma de ensaio após 48 horas de liofilização e  $m_1$ , a massa, expressa em g, da toma de ensaio antes da liofilização. Estas determinações foram efetuadas, em duplicado, tendo a média dos valores obtidos sido aceite para coeficientes de variação inferiores a 1 %.

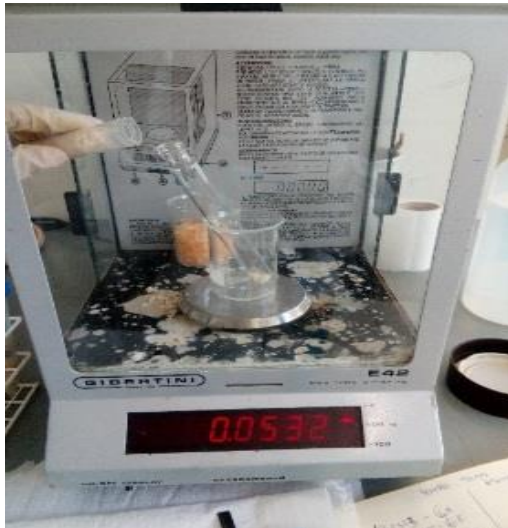
Para a determinação dos lípidos totais e perfil e teor de ácidos gordos procedeu-se de acordo com o protocolo descrito por Folch et al. (1957). Este procedimento foi realizado, em triplicado, para cada amostra, 2 para a gordura total (análise ponderal) e 1 para metilação (análise de ácidos gordos posteriormente realizada). Para a análise dos lípidos totais, colocaram-se 2 balões de rotaevaporador (IKA HB10 Basic), previamente tarados, em estufa a 70 °C durante toda a noite. De seguida, os balões foram retirados para exsiccador e pesados 1 hora depois, registando-se os valores. Os balões foram novamente colocados no exsiccador até posterior utilização. Para a extração e quantificação dos lípidos totais, pesaram-se 0,250 g das amostras musculares liofilizadas para tubos de vidro de 16 mL, e adicionou-se 2,5 mL de metanol ficando a humedecer durante 5 minutos. Os tubos foram agitados no vórtex durante 10 segundos e colocados no banho de ultrassons (Grant, modelo MXB14; Grant Instruments, Cambridge, Inglaterra), durante 5 minutos a 30 °C, agitando-se regularmente. Seguidamente, efetuaram-se três extrações com o intuito de aumentar o rendimento da extração. Começou-se por adicionar 5 mL de diclorometano, agitando no vórtex durante 10 segundos, seguida de uma incubação no banho ultrassons, a 30 °C durante 5 min., agitando regularmente. No final, o homogeneizado foi centrifugado a 2500 rpm ou 1439 g, durante 5 min., e recolheu-se o sobrenadante que foi filtrado por papel de filtro nº 1 (Whatman International Lda, Maidston, Inglaterra) para tubo de 50 mL. Ao resíduo, adicionou-se 7,5 mL da solução de diclorometano/metanol (2:1) efetuando-se uma extração idêntica à anterior colocando os tubos no banho de ultrassons durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e filtrado para o mesmo tubo de 50 mL. Procedeu-se a nova extração, adicionando 5 mL da solução de diclorometano/metanol (2:1) ao resíduo e colocou-se

no banho de ultrassons durante 5 minutos. O sobrenadante após centrifugação foi recolhido para o mesmo tubo de 16 mL referido anteriormente. De seguida, adicionaram-se 3,6 mL de solução de cloreto de potássio 0,88%, tendo-se agitado durante 10 segundos no vórtex, e centrifugou-se durante 5 minutos a 2500 rpm. As fases orgânicas, de dois tubos de 50 mL, foram aspiradas e filtradas com filtro separador de fases, humedecido com diclorometano, para dois balões de rotoevaporador, previamente tarados como descrito anteriormente para análise ponderal. Os solventes dos balões foram evaporados em rotoevaporador a 40 °C. Os resíduos dos balões foram secos na estufa a 70 °C durante 2 horas, arrefecidos no exsiccador e pesados 1 hora depois para determinar os lípidos totais. A fase orgânica do terceiro foi evaporada sob corrente de azoto para análise do perfil e teor de ácidos gordos por cromatografia gasosa.

O teor em lípidos totais de cada amostra foi calculado pela média aritmética de duas determinações de acordo com a seguinte fórmula, efetuadas em paralelo, aceitando-se um coeficiente de variação inferior a 12 %.

$$\text{Lípidos totais} = (m_2 - m_1) \times 100/m$$

sendo  $m_2$ , a massa (g) do balão com o resíduo,  $m_1$ , a massa (g) do balão e  $m$ , a massa (g) da toma de ensaio.



**Figura 3 – Pesagem em balança analítica de amostras liofilizadas.**



**Figura 4 – Filtros separadores de fases e balões usados na determinação dos lípidos totais.**



**Figura 5 – Balões de rotaevaporador conservados em exsiccador.**



**Figura 6 – Rotaevaporador para evaporação do solvente dos balões.**

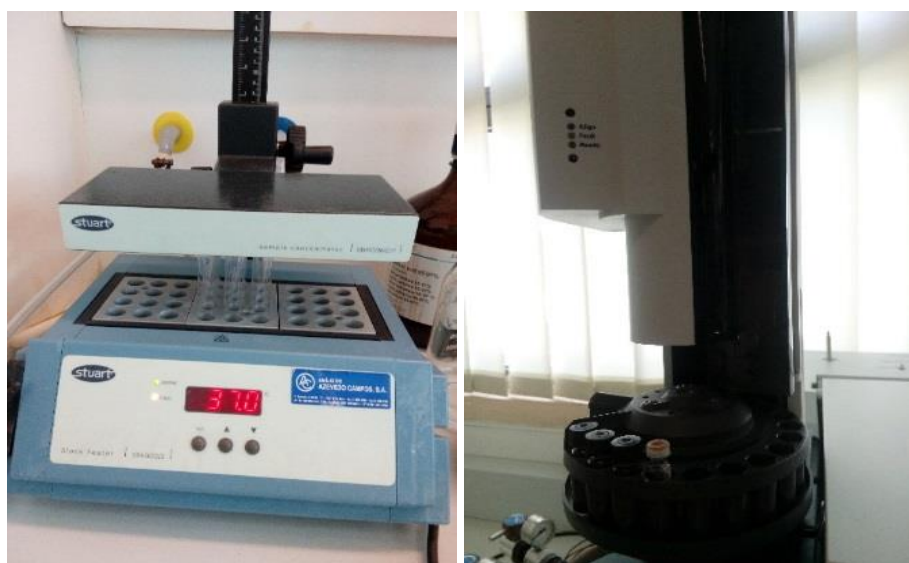
### **4.3 Determinação do perfil de ácidos gordos**

O perfil de ácidos gordos das dietas experimentais foi analisado após conversão dos ácidos gordos nos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) por transesterificação ácida direta (Sukhija and Palmquist 1988; Palmquist and Jenkins 2003). O procedimento iniciou-se pesando 100 mg de cada amostra para tubos de vidro de 16 mL com rolhas de teflon. Adicionou-se 1 mL de padrão interno (FAME 21:0 na concentração de 1 mg/mL), 1 mL de tolueno e 3 mL de solução de HCl em metanol a 1,25 M a cada tubo. Agitou-se em vórtex durante 1 min. e colocou-se em banho de água a 70 °C durante 2 horas. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se 2 mL de solução aquosa a 6% de  $K_2CO_3$  e 2 mL de *n*-hexano. Em seguida agitou-se em vórtex e foi à centrifuga a 2500 rpm durante 5 min. A fase orgânica foi transferida para um novo tubo de vidro de 16 mL e adicionou aproximadamente 0,5 g de sulfato de sódio anidro ( $Na_2SO_4$ ). Nas amostras bastante pigmentadas, adicionou-se 1 g de carvão ativado, agitou-se em vórtex (10 seg) e deixou-se repousar durante 1 hora. Após o repouso, agitou-se novamente em vórtex (10 segundos) e centrifugou-se durante 5 min. a 2500 rpm. Aspirou-se o sobrenadante para outro tubo de vidro de 16 mL e evaporou-se sob corrente de azoto a 37 °C. Ao resíduo adicionou-se 1 mL de *n*-hexano e transferiu-se para frasco transparente de 1,5 mL para análise por cromatografia gasosa.

A determinação do perfil de ácidos gordos totais nas amostras de músculo (peito e coxa) foi realizada por transesterificação combinada segundo o método descrito por Raes et al. (2001). Ao resíduo do 3º tubo de vidro de 16 mL, adicionou-se

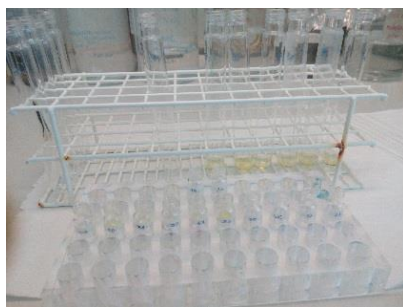
1 mL de tolueno seco e 1 mL do FAME 21:0 na concentração de 1 mg/mL em *n*-hexano. Procedeu-se a uma hidrólise sequencial alcalina e ácida adicionando 3 mL de solução de metóxido de sódio a 0,5 M e 2 mL de HCl/metanol a 1,25 M e incubou-se no banho a 50 °C durante 30 e 10 min., respectivamente, e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. No fim da reação adicionou-se 2 mL de água Milli Q e agitou-se no vórtex durante 10 segundos. Para a extração dos ácidos gordos adicionou-se 3 mL de *n*-hexano tendo-se agitado em vórtex (1 min.) e centrifugou-se a 2500 rpm durante 5 min. Adicionou-se 0,5 g de sulfato de sódio anidro à fase orgânica, homogeneizou-se em vórtex (10 s) e centrifugou-se novamente. Após centrifugação, evaporou-se o solvente sob corrente de azoto a 37 °C até à secura. No final ressuspendeu-se o resíduo em 1 mL de *n*-hexano (“vial” para GC). Sempre que os valores de lípidos totais das amostras eram superiores a 50 mg procedeu-se a uma diluição das amostras de modo a ajustar a concentração final a 40 mg/mL. Este procedimento foi apenas necessário para as amostras do músculo da coxa.

A análise dos FAME foi realizada por cromatografia gás-líquido usando o cromatógrafo gasoso (HP7890A, Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA), equipado com detetor de ionização de chama e uma coluna capilar Supelcowax<sup>TM</sup>10 (30 m; 0,20 mm i.d. e 0,20 mm de espessura capilar), (Supelco Inc., Bellefonte, PA) com hélio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detetor foram de 250 e 280 °C, respectivamente. O programa de temperatura do forno foi iniciado a 150 °C e mantido por 11 min., depois aumentado para 210 °C a uma taxa de 3 °C/min e mantido por 30 min. A identificação e separação dos FAME foi realizada por comparação com os tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões de ácidos gordos (mistura de 37 componentes FAME da Supelco Inc.).



**Figura 7 – Concentrador para evaporação de solvente sob corrente de azoto.**

**Figura 8 – Injetor automático do cromatógrafo gasoso.**



**Figura 9 – Frascos de vidro (“vials”) para cromatografia.**

A quantificação dos FAME foi realizada pelo método do padrão interno usando o ácido heneicosaenóico metilado (21:0). Cada ácido gordo foi expresso como uma percentagem da soma dos ácidos gordos identificados (% de ácidos gordos totais).

#### **4.4. Determinação do teor de colesterol total e de vitaminas lipossolúveis**

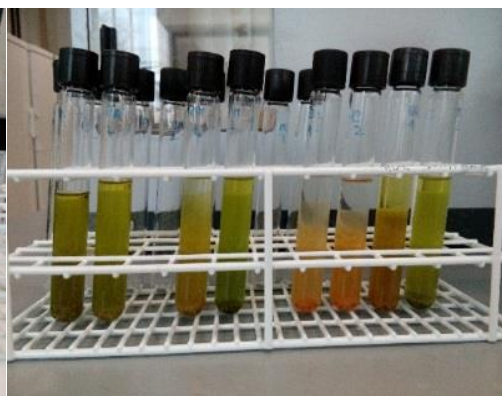
A separação, identificação e quantificação do colesterol total,  $\beta$ -caroteno e vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) na carne de frango (peito e coxa) e nas dietas experimentais foi realizada segundo o método descrito por Prates et al. (2006). Este método consiste na saponificação direta da carne fresca (750 mg) e das dietas (100 mg), em duplicado, seguida de extração com *n*-hexano com cuidados especiais para evitar luz e oxigénio. O protocolo consistiu em pesar as amostras para 2 tubos Kimax de 16 mL (duplicado) adicionando-se 0,20 g de ácido ascórbico e 5,5 mL de solução de saponificação (solução etanólica de hidróxido de potássio). Os tubos foram imediatamente agitados para evitar aglomeração dos fragmentos da amostra. O passo seguinte foi substituir o ar dos tubos por azoto (atmosfera inerte), tapá-los bem e agitar no vórtex até dissolver completamente o ácido ascórbico. Depois aqueceu-se em banho-maria a 80 °C durante 15 min., com agitação a 200 rpm. De seguida, arrefeceu-se os tubos em água fria durante 1' (<50 °C) e adicionou-se 1,5 mL de água destilada e 3 mL de *n*-hexano. Agitou-se vigorosamente no vórtex durante 2 min. e centrifugou-se a 2500 rpm ou 1439 *g*, durante 5 minutos. Após a centrifugação aspirou-se as fases do *n*-hexano (superiores) para tubos com tampa (tubos de 16 mL) onde foi previamente adicionado sulfato sódico anidro (quantidade: ponta espátula) e agitou-se em vórtex durante 10 segundos cada amostra. Por fim, filtrou-se uma alíquota das fases do *n*-hexano (superiores), por filtro de seringa hidrofóbico 0,45  $\mu$ m, para frascos

âmbar de 1,5 mL para análise por cromatografia líquida de alta pressão ou de alta eficiência (HPLC).

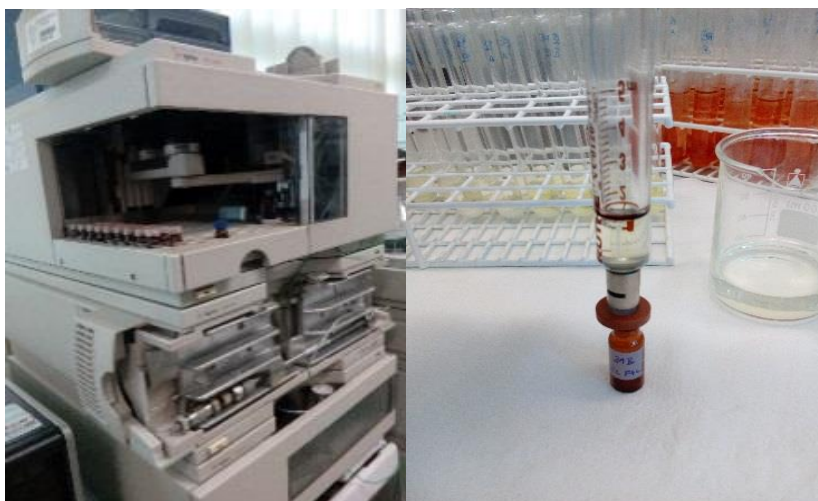
A análise simultânea do colesterol total,  $\beta$ -caroteno e vitamina E das amostras foi realizada por HPLC em fase normal usando o cromatógrafo líquido HP1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) com uma coluna de sílica (Zorbax RX-Sil, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.) e dois detetores ligados em série, o detetor de fotodíodos UV/Vis (para a análise do colesterol total no comprimento de onda de 202 nm e do  $\beta$ -caroteno no comprimento de onda de 450 nm) e o detetor de fluorescência (análise de vitamina E ao comprimento de onda de excitação de 295 nm e de emissão de 325 nm). O fluxo da fase móvel (1% isopropanol em *n*-hexano, v/v) foi de 1 mL/min, tendo a análise a duração de 20 minutos e a temperatura do forno da coluna foi ajustada a 20 °C. Os volumes de injeção variaram entre 20 e 100  $\mu$ L para obter valores dentro da faixa de linearidade das curvas padrão. O teor de colesterol total e tocoferóis na carne foi calculado, em duplicado, com base no método do padrão externo, a partir de uma curva padrão área do pico *versus* concentração.



**Figura 10 – Tubos de ensaio com amostras de carne.**



**Figura 11– Tubos de ensaio com amostras de dietas.**



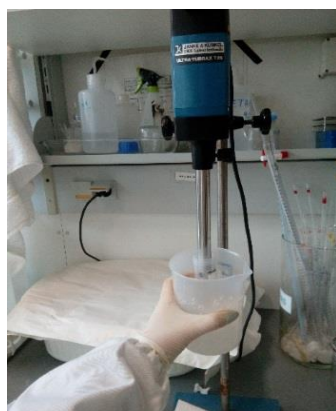
**Figura 12 – Cromatógrafo líquido de alta pressão.**

**Figura 13 – Filtração por filtro de seringa hidrofóbico para frascos âmbar.**

#### **4.5. Determinação da estabilidade lipídica (após indução da oxidação *in vitro*)**

Para avaliação da estabilidade lipídica (potencial antioxidante) da carne de frango (coxa) determinaram-se as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) após indução da oxidação *in vitro* (reação de Fenton) segundo Mercier et al. (2004). O método consistiu em pesar 1 g de carne da coxa de frango, em duplicado, e adicionar 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7,0 e homogeneizar em Ultra-Turrax (haste S25N-10G), sobre gelo, durante 1 min. (4×15") a 20.000 rpm. Depois transferir o homogeneizado para tubos de vidro de 16 mL e adicionar 100 µL das soluções de FeSO<sub>4</sub> 50 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM (0,5:1 mM). Após agitação dos tubos no vórtex aqueceu-se em banho-maria a 37 °C durante 30 e 120 min., com agitação a 200 rpm. Após a incubação, parou-se a oxidação com 2 mg BHT (1 grânulo) / 10 mL (4) (0,02%). Transferiu-se alíquotas do homogeneizado para eppendorfs e guardou-se a -80 °C até análise. A segunda parte para a determinação da oxidação lipídica envolveu transferir 0,5 mL do homogeneizado para 2 tubos de vidro 16 mL, e adicionar 0,25 mL de reagente TBA a 1% e 0,25 mL de solução de TCA a 2,8%. Posteriormente, agitou-se lentamente no vórtex e colocou-se em banho-maria durante 10 min. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente durante 20 min e de seguida extraiu-se o cromóforo com 2 mL de *n*-butanol. Agitou-se no vórtex e centrifugaram-se os tubos a 3500 rpm durante 10 min. Neste método o TBA reage com os aldeídos dando uma coloração rosa que depois é medida por espectrofotometria a 535 nm.

Para a quantificação dos TBARS utilizou-se uma curva padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP, Fluka, Germany), precursor do aldeído malónico ou malonaldeído (MDA). Os resultados foram apresentados em mg de MDA/kg de carne.



**Figura 14 – Homogeneizador Ultra-Turrax.**



**Figura 15 – Banho maria com agitação.**



**Figura 16–Tubos de ensaio após reação com ácido tiobarbitúrico.**

#### **4.6. Análise estatística**

A análise estatística apresentada foi efetuada recorrendo à análise de variância usando o procedimento *General Linear Models* (GLM) do programa estatístico SAS (Institute Inc., Cary NC) usando o teste PDIFF ajustado ao método Tukey Kramer. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). AS diferenças entre as médias foram significativas quando  $P < 0,05$ .

#### **5. Resultados e discussão**

Apesar de não ser um dos objetivos deste trabalho avaliar o efeito da incorporação da *Chlorella vulgaris* com ou sem adição de enzimas exógenas no desempenho produtivo dos animais, a título informativo podemos constatar que a inclusão de 10% de *Chlorella vulgaris* na dieta para frangos em crescimento individualmente ou em combinação com suplementação enzimática (mistura comercial Rovabio® Excel AP versus mistura das 4 CAZymes seleccionadas) não afetou ( $P > 0,05$ ) os resultados da performance zootécnica dos animais, nomeadamente a ingestão diária, o peso final, o ganho médio diário e o índice de conversão (anexo 1). Estes resultados são bastante satisfatórios quando comparados com os resultados de Santos (2019) e Pestana et al. (2020) em que os autores verificaram que a incorporação de 15% de Spirulina (*Arthrospira platensis*) em dietas para frangos,

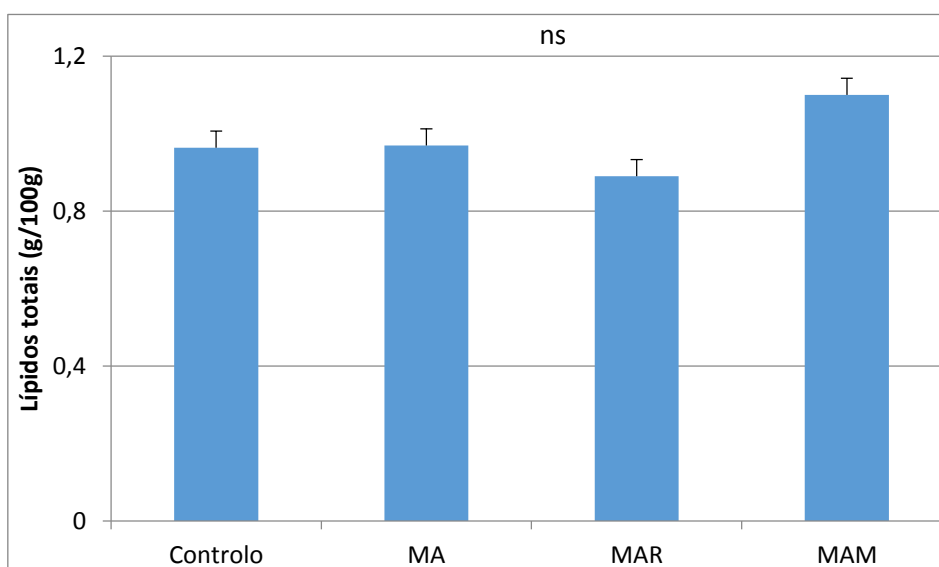
individualmente ou combinadas com enzimas exógenas (Rovabio® Excel AP e Lisozima), reduziu o desempenho das aves devido a uma maior viscosidade da digesta, que provavelmente está associada à gelificação de proteínas indigestas da microalga.

A seguir são apresentados e discutidos os resultados da matéria seca e lípidos totais, perfil de ácidos gordos, colesterol total e vitamina E e do potencial antioxidante que poderão influenciar o valor nutricional da carne do peito e da coxa de frango.

### 5.1. Teor de lípidos totais

Os Gráficos 2 e 3 mostram que os teores de lípidos totais no peito de frango (0,89-1,00 g/100 g) foram inferiores aos da coxa (2,47-2,92 g/100 g), mas ambas as carnes são consideradas carnes magras (teor de gordura <5%) de acordo com os critérios da *Food Advisory Committee* (1990). Esta diferença poderá resultar do facto do músculo da coxa ter mais fibras musculares vermelhas do que o músculo peitoral, as quais são mais ricas em triacilgliceróis do que as fibras brancas.

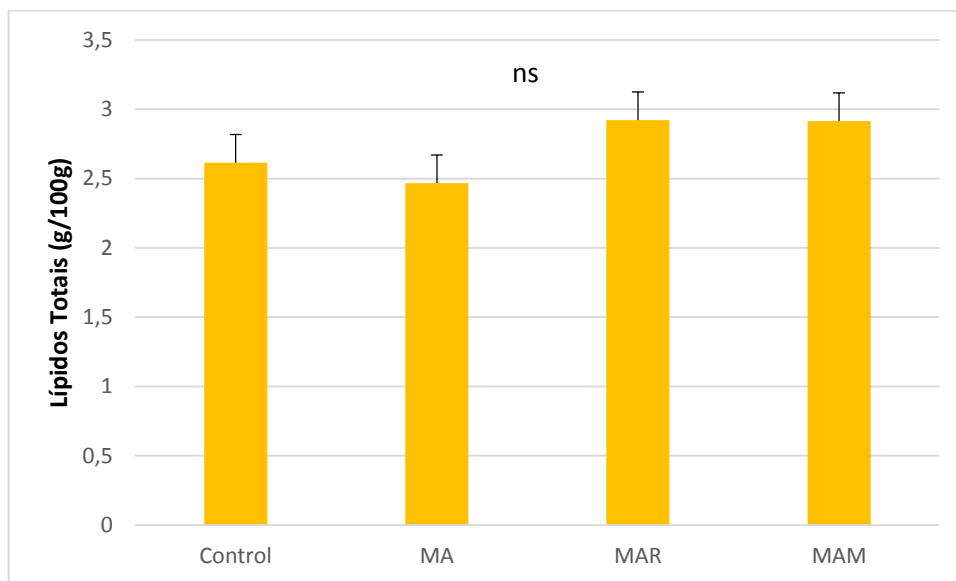
Gráfico 2 – Teores de lípidos totais no peito de frango.



Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura 4 CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); ns, não significativo ( $P>0,05$ ).

Como podemos observar pelos mesmos Gráficos 2 e 3, a dieta não influenciou o teor de lípidos totais no peito nem na coxa de frango ( $P>0,05$ ).

**Gráfico 3 – Teores de lípidos totais na coxa de frango.**



Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura 4 enzimas CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); ns, não significativo ( $P > 0,05$ ).

## 5.2. Composição em ácidos gordos

Os resultados de ácidos gordos presentes no peito e na coxa de frango são apresentados nas Tabelas 4 e 5. Para além da composição em ácidos gordos são ainda apresentados os somatórios parciais e os índices nutricionais dos ácidos gordos.

A composição em ácidos gordos, expressos em percentagem dos ácidos gordos totais no peito e coxa de frango revela perfis semelhantes. Os ácidos gordos predominantes na carne de frango em todos os tratamentos da perna e da coxa foram o ácido oleico (18:1c9), como ácido gordo monoinsaturado (mais abundante na coxa), e o ácido linoleico (LA, 18:2n-6), como ácido gordo polinsaturado da série n-6 (mais abundante no peito), seguidos dos ácidos gordos saturados palmítico (16:0) e esteárico (18:0). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que também analisaram a incorporação de diferentes microalgas nas dietas de frangos (Gatrell et al. 2015; Pestana et al. 2020; Ribeiro et al. 2013). Esta composição em ácidos gordos na carne de frango está de acordo com o perfil de ácidos gordos das dietas dos animais e da microalga *Chlorella vulgaris*. Se observarmos a Tabela 3, podemos verificar que em todas as dietas os ácidos gordos maioritários são, por ordem decrescente, o 18:2n-6, 18:1c9, 16:0, 18:3n-3 (ALA, ácido  $\alpha$ -linolénico) e 18:0.

Portanto, a dieta influencia a composição e conversão em ácidos gordos (Arterburn et al. 2006). Se observarmos o perfil de ácidos gordos da *Chlorella vulgaris* (anexo 2) podemos também verificar que os ácidos gordos maioritários são, por ordem decrescente, o 16:0 (17,2%), 18:1n-9 (11,7%), 18:2n-6 (11,2%), e por fim em quantidades iguais o 16:1n-7 e 18:3n-3 (10,1%).

Na Tabela 4 podemos observar que a inclusão de *Chlorella vulgaris* com ou sem suplementação enzimática influenciou significativamente ( $P<0,05$ ) 6 dos 30 ácidos gordos identificados no peito de frango, especificamente o 16:0 ( $P<0,001$ ), 16:1c7, 17:1c9, 18:3n-3 e 22:0 ( $P<0,05$ ) e 18:4n-3 ( $P<0,01$ ). De realçar que enquanto a percentagem do ácido palmítico (16:0) diminuiu significativamente ( $P<0,001$ ) com a incorporação da *Chlorella vulgaris* (MA) e da combinação da microalga com a mistura das 4 CAZymes (MAM) comparativamente ao controlo, as percentagens de 18:3n-3 e de 18:4n-3 aumentaram com a incorporação da microalga (MA) e da suplementação da microalga com a enzima comercial Rovabio<sup>®</sup> Excel (MAR). A incorporação de 10% de *Chlorella vulgaris* individualmente ou em combinação com a suplementação de Rovabio<sup>®</sup> Excel mostrou ser uma fonte de ALA (18:3n-3) comparativamente a uma alimentação à base de cereais que são relativamente pobres em ALA. As principais fontes de n-3 PUFA são por exemplo as sementes de linhaça (Rebole et al. 2006) ou pastagem (O`Sullivan et al. 2004; Ponte et al. 2008) que aumentam os níveis de ALA enquanto a incorporação de óleos de peixe ou algas nas dietas aumentam os teores de EPA e DHA na carne (Komprda et al. 2005; Rymer et al. 2010). Contudo, Santos (2019) e Pestana et al. (2020) verificaram que a incorporação de 15% de *A. Platensis* em dietas de frangos revelaram uma diminuição na percentagem de 18:3n-3 nas carnes provenientes dos animais alimentados com a microalga individualmente ou em combinação com enzimas exógenas. Tal como já foi referido, a conversão do ALA ao longo de toda a via n-3 é um processo *in vivo* limitado devido à competição pelas enzimas dessaturases e elongases, que são as mesmas para as vias n-6 e n-3 (Lopez-Ferrer et al. 2001; Mooney et al. 1998). Portanto, para obter uma conversão eficiente do ALA no EPA (20:5n-3) e no DHA (22:6n-3) e ter significado funcional é importante garantir um nível adequado da razão LA/ALA na dieta (Griffin 2008). Mooney et al. (1998) verificaram que a suplementação de microalgas em dietas para aves demonstrou melhorar o *status* geral de ácidos gordos n-3 no músculo peitoral.

Pela Tabela 5, podemos verificar que a incorporação de *Chlorella vulgaris* com ou sem adição de enzimas exógenas afetou significativamente apenas 5 ácidos gordos minoritários na carne da coxa de frango, nomeadamente 16:1c7 ( $P<0,001$ ), 17:1c9, DMA 18:0 e DMA 18:1 ( $P<0,05$ ) e 18:4n-3 ( $P<0,01$ ). De realçar que dos ácidos gordos monoinsaturados, o ácido gordo 16:1c7 apresenta proporções superiores nas

dietas com incorporação da *Chlorella vulgaris* (MA) e da microalga suplementada com as enzimas exógenas (MAR e MAM) comparativamente ao grupo controlo enquanto o ácido gordo 17:1c9 aparece apenas significativamente aumentado nas dietas da microalga adicionadas das enzimas (MAR e MAM). A percentagem do ácido gordo 18:4n-3 também aparece aumentada na dieta MAM em comparação ao grupo controlo.

Em relação aos somatórios parciais dos ácidos gordos na carne de frango (peito e coxa) podemos observar que o músculo peitoral apresenta valores superiores de SFA e PUFA em relação à coxa, a qual por sua vez apresenta valores mais elevados de MUFA o que está concordante com o perfil dos ácidos gordos individuais. O aumento de MUFA na coxa sugere um aumento da síntese *de novo* de ácidos gordos por ação da delta-9 dessaturase (Ribeiro et al. 2014). A dieta influenciou significativamente o somatório de SFA no peito ( $P < 0,05$ ) observando-se que a incorporação de 10% de *Chlorella vulgaris* (MA) e da microalga com a mistura das 4 CAZymes (MAM) apresentam valores mais baixos de SFA que o grupo controlo.

**Tabela 4 – Efeito da inclusão de *Chlorella vulgaris* com e sem suplementação enzimática no perfil de ácidos gordos na carne do peito de frango.**

	Controlo	MA	MAR	MAM	EPM	P
<b>Composição em ácidos gordos (% AGT)</b>						
14:0	0,28	0,28	0,31	0,31	0,015	0,3551
14:1c9	0,01	0,02	0,02	0,02	0,008	0,8910
15:0	0,10	0,10	0,11	0,09	0,009	0,5661
DMA16:0	0,40	0,30	0,30	0,36	0,043	0,2762
16:0	20,6 <sup>a</sup>	19,3 <sup>b</sup>	19,8 <sup>ab</sup>	19,4 <sup>b</sup>	0,218	0,0004
16:1c7	0,37 <sup>a</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,023	0,0216
16:1c9	1,22	1,44	1,54	1,40	0,144	0,4669
17:0	0,21	0,19	0,18	0,18	0,010	0,1452
17:1c9	0,05 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,011	0,0269
DMA18:0	0,19	0,32	0,32	0,40	0,060	0,1226
DMA18:1	0,23	0,35	0,32	0,48	0,067	0,0837
18:0	9,96	9,48	9,26	9,38	0,322	0,4447
18:1c9	20,0	21,3	21,6	21,6	0,805	0,4356
18:1c11	2,85	2,75	2,70	2,64	0,107	0,5557
18:2n-6	24,5	25,8	25,8	25,7	0,583	0,3605
18:3n-6	0,12	0,12	0,12	0,11	0,006	0,1921
18:2t9t12	0,14	0,15	0,16	0,16	0,011	0,4508
18:3n-3	1,15 <sup>a</sup>	1,58 <sup>b</sup>	1,58 <sup>b</sup>	1,45 <sup>ab</sup>	0,112	0,0272
18:4n-3	0,03 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,010	0,0034
20:0	0,13	0,12	0,14	0,11	0,009	0,0508
20:1c11	0,23	0,24	0,25	0,27	0,016	0,4955
20:2n-6	1,29	1,10	1,08	1,17	0,085	0,3223
20:3n-6	0,99	0,84	0,91	1,09	0,091	0,2639
20:4n-6	7,46	6,42	5,93	6,06	0,508	0,1563
20:3n-3	0,21	0,20	0,19	0,19	0,018	0,8241
20:5n-3	0,28	0,27	0,25	0,25	0,021	0,6176
22:0	0,12 <sup>a</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,010	0,0163
22:1n-9	0,04	0,07	0,04	0,04	0,015	0,4563
22:5n-3	0,53	0,42	0,39	0,41	0,042	0,0880
22:6n-3	1,41	1,34	1,03	1,10	0,154	0,2597
Outros	4,80	4,76	4,82	5,04	0,381	0,9512
<b>Somatórios parciais dos ácidos gordos</b>						
SFA	31,4 <sup>a</sup>	29,5 <sup>b</sup>	29,9 <sup>ab</sup>	29,5 <sup>b</sup>	0,470	0,0219
MUFA	24,8	26,4	26,8	26,5	0,901	0,4037
PUFA	38,1	38,2	37,6	37,7	0,485	0,6781
DMA	0,82	0,96	0,93	1,23	0,119	0,1109
n-6 PUFA	34,4	34,2	33,9	34,1	0,423	0,8481
n-3 PUFA	3,61	3,86	3,51	3,42	0,137	0,1469
<b>Índices dos ácidos gordos</b>						
PUFA/SFA	1,22	1,30	1,26	1,28	0,024	0,1119
n-6/n-3	9,74	8,96	9,74	10,1	0,358	0,1738

Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura de 4 enzimas CAZymes; AGT – ácidos gordos totais; DMA – dimetilacetais; EPM – erro padrão da média; SFA – ácidos gordos saturados; MS – matéria seca; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 5 – Efeito da inclusão de *Chlorella vulgaris* com e sem suplementação enzimática no perfil de ácidos gordos na carne da coxa de frango.**

	Controlo	MA	MAR	MAM	EPM	P
<b>Composição em ácidos gordos (% AGT)</b>						
14:0	0,41	0,40	0,38	0,41	0,022	0,7517
14:1c9	0,10	0,09	0,09	0,08	0,007	0,1329
15:0	0,12	0,10	0,11	0,11	0,017	0,7943
DMA16:0	0,13	0,11	0,14	0,06	0,019	0,0626
16:0	19,9	19,5	20,1	20,8	0,727	0,6463
16:1c7	0,43 <sup>a</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,65 <sup>c</sup>	0,016	<0,0001
16:1c9	3,23	3,42	3,44	3,45	0,166	0,7732
17:0	0,18	0,18	0,16	0,18	0,016	0,8614
17:1c9	0,04 <sup>a</sup>	0,06 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,008	0,0141
DMA18:0	0,09 <sup>a</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,01 <sup>ab</sup>	0,023	0,0166
DMA18:1	0,08 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,018	0,0183
18:0	7,15	7,15	7,22	7,20	0,290	0,9972
18:1c9	30,5	30,2	29,2	30,8	0,734	0,4377
18:1c11	2,06	2,14	2,18	2,27	0,067	0,1802
18:2n-6	27,9	28,4	28,7	26,3	1,308	0,5758
18:3n-6	0,10	0,11	0,11	0,09	0,007	0,2218
18:2t9t12	0,16	0,16	0,15	0,14	0,020	0,8738
18:3n-3	2,02	2,23	2,33	2,17	0,142	0,4744
18:4n-3	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>ab</sup>	0,03 <sup>ab</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,007	0,0087
20:0	0,13	0,12	0,11	0,11	0,016	0,7235
20:1c11	0,28	0,25	0,25	0,28	0,011	0,1145
20:2n-6	0,38	0,37	0,38	0,31	0,034	0,3872
20:3n-6	0,33	0,33	0,32	0,29	0,030	0,7895
20:4n-6	2,09	2,26	1,99	1,74	0,163	0,1708
20:3n-3	0,06	0,05	0,06	0,04	0,010	0,4710
20:5n-3	0,08	0,08	0,07	0,07	0,013	0,8703
22:0	0,05	0,06	0,05	0,06	0,009	0,8277
22:1n-9	0,12	0,07	0,06	0,06	0,039	0,6741
22:5n-3	0,13	0,10	0,10	0,09	0,018	0,5002
22:6n-3	0,37	0,59	0,48	0,54	0,107	0,5085
Outros	1,26	0,78	1,08	1,37	0,202	0,1963
<b>Somatórios parciais dos ácidos gordos</b>						
SFA	28,0	27,5	28,2	28,9	0,952	0,7848
MUFA	36,8	36,9	36,0	37,9	0,857	0,5045
PUFA	33,7	34,7	34,7	31,8	1,519	0,4988
DMA	0,29 <sup>a</sup>	0,24 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>ab</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,044	0,0096
n-6 PUFA	30,8	31,4	31,5	28,7	1,423	0,4804
n-3 PUFA	2,67	3,08	3,07	2,95	0,139	0,1489
<b>Índices dos ácidos gordos</b>						
PUFA/SFA	0,86	0,81	0,83	0,98	0,085	0,4703
n-6/n-3	11,5 <sup>a</sup>	10,3 <sup>ab</sup>	10,3 <sup>ab</sup>	9,88 <sup>b</sup>	0,414	0,0493

Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% Rovabio®Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura de 4 enzimas CAZymes; AGT – ácidos gordos totais; DMA – dimetilacetais; EPM – erro padrão da média; SFA – ácidos gordos saturados; MS – matéria seca; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

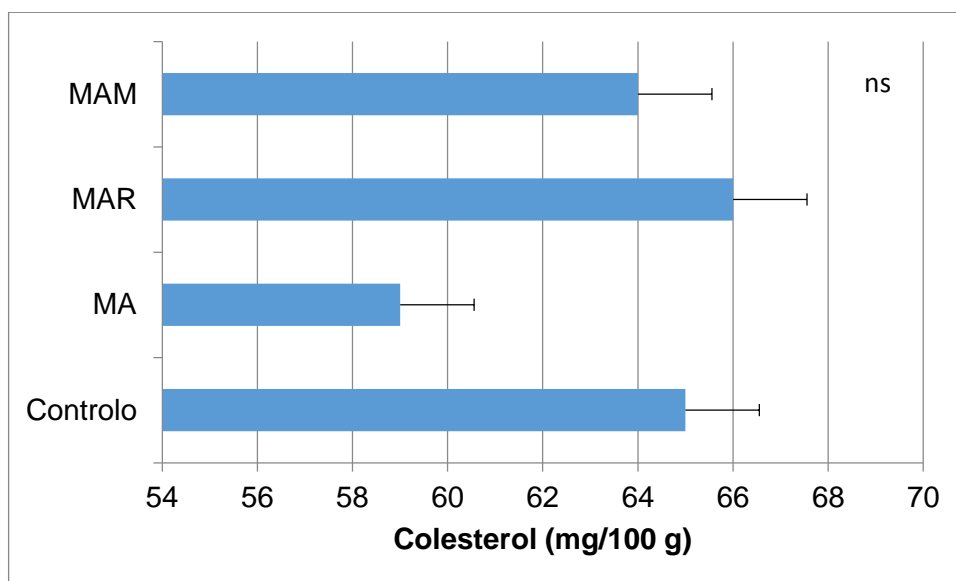
Na coxa de frango, apenas o somatório dos dimetilacetais (DMA) foi significativamente menor na dieta MAM ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo controlo.

Quanto aos índices nutricionais dos ácidos gordos, que refletem o padrão dos somatórios parciais dos ácidos gordos, quer no peito quer na coxa, não se observaram diferenças significativas entre as carnes provenientes dos diferentes tratamentos para a razão entre ácidos gordos saturados e polinsaturados (PUFA/SFA) ( $P > 0,05$ ) e, apesar dos valores serem superiores no peito comparativamente à coxa, em ambos os casos estão acima das recomendações nutricionais ( $> 0,45$ ). Contrariamente, a razão entre as duas séries de PUFA ( $n-6/n-3$ ) é superior na coxa que no peito, mas em ambos os casos também os valores são superiores aos recomendados (não deve exceder 4,0) (Burghardt et al. 2010). Para a razão  $n-6/n-3$  não se observaram diferenças estatísticas entre as dietas com exceção da dieta com inclusão da *Chlorella vulgaris* com a mistura das 4 CAZymes (MAM) na coxa cujo valor foi inferior (9,88) comparativamente ao controlo (11,5). Este facto reflete em larga medida a diferença no perfil de ácidos gordos das dietas experimentais sendo a razão 18:2n-6/18:3n-3 (LA/ALA) na dieta controlo de 9,7 e na MAM de 8,3.

### **5.3. Teor de colesterol e vitaminas lipossolúveis**

No que respeita ao teor de colesterol no peito de frango (Gráfico 4) não se observaram diferenças significativas entre as dietas ( $P > 0,05$ ) e os valores estão de acordo com outros estudos da literatura (Ponte et al. 2008; Ribeiro et al. 2014). Os teores de colesterol na carne variam de acordo com vários fatores como a dieta, idade, espécie, raça, e no mesmo animal diferentes músculos podem também apresentar diferentes teores de colesterol (Pratiwi 2006).

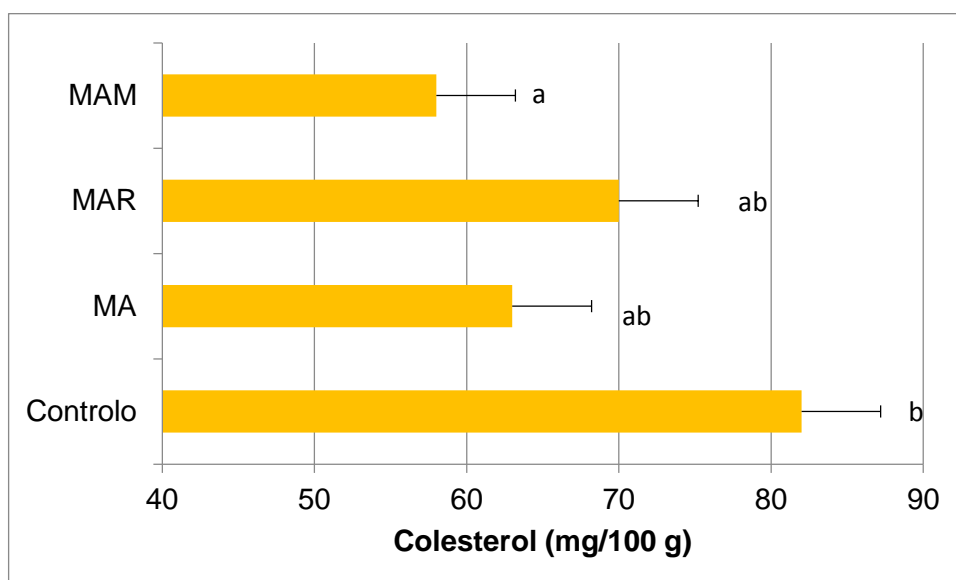
**Gráfico 4 – Teores de colesterol no peito de frango.**



Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA- dieta com 10% *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% de Rovabio<sup>®</sup> Excel AP; MAM- dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura das 4 enzimas CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); ns, não significativo ( $P>0,05$ ).

Como era esperado, a carne da coxa (Gráfico 5) apresenta um teor de colesterol mais elevado que a carne do peito devido à maior quantidade de gordura. No entanto, a incorporação de *Chlorella vulgaris* com a mistura das 4 CAZymes testada *in vitro* (MAM) diminuiu significativamente o teor de colesterol na coxa comparativamente ao grupo controlo ( $P<0,05$ ).

**Gráfico 5 – Teores de colesterol na coxa de frango.**



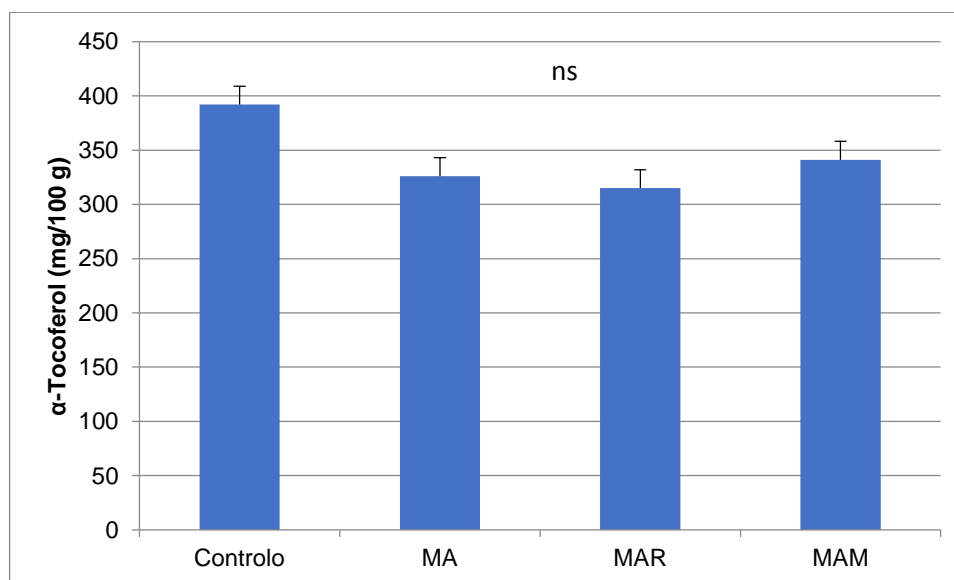
Controlo – dieta à base de de milho e bagaço de soja; MA <<- dieta com 10% de *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% de *Chlorella vulgaris* e 0,005% de Rovabio<sup>®</sup> Excel AP; MAM - dieta com 10% de *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura de 4 enzimas CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); letras diferentes são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ).

Neste estudo, o  $\beta$ -caroteno não foi detetado no peito e na coxa de frango proveniente das dietas analisadas. Provavelmente, todo o  $\beta$ -caroteno presente nas dietas nas quais foi incorporada *Chlorella vulgaris* individualmente ou em combinação com as enzimas exógenas foi metabolizado em retinol (Nogareda et al. 2015). No anexo 4 são apresentados os teores de carotenoides na carne de frango que podem refletir os teores de carotenoides presentes nas dietas e na microalga *Chlorella vulgaris*.

Relativamente à vitamina E, o  $\alpha$ -tocoferol foi o principal diterpeno identificado e quantificado no peito e na coxa de frango estando ainda presente, mas em menores quantidades, o  $\gamma$ -tocoferol. Também a presença de vitamina E na carne será um fator determinante para a estabilidade e qualidade da carne e conseqüentemente para o tempo de prateleira do produto. A vitamina E, que é um potente antioxidante natural, vai proteger os ácidos gordos insaturados, principalmente os PUFA, da peroxidação sequestrando os radicais livres e interrompendo a progressão da cadeia oxidativa dos lípidos.

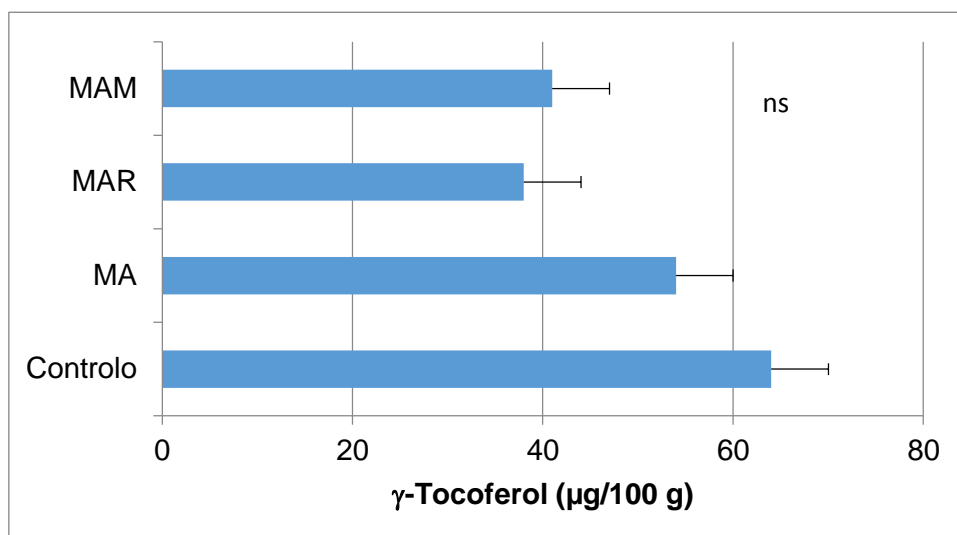
Nos Gráfico 6 e 7 são apresentados os teores dos homólogos da vitamina E, do  $\alpha$ -tocoferol e do  $\gamma$ -tocoferol, respetivamente, no peito de frango e podemos verificar que não houve diferenças estatísticas entre as dietas ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 6 – Teores de  $\alpha$ -tocoferol no peito de frango.**



Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% de Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura das 4 enzimas CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); ns, não significativo.

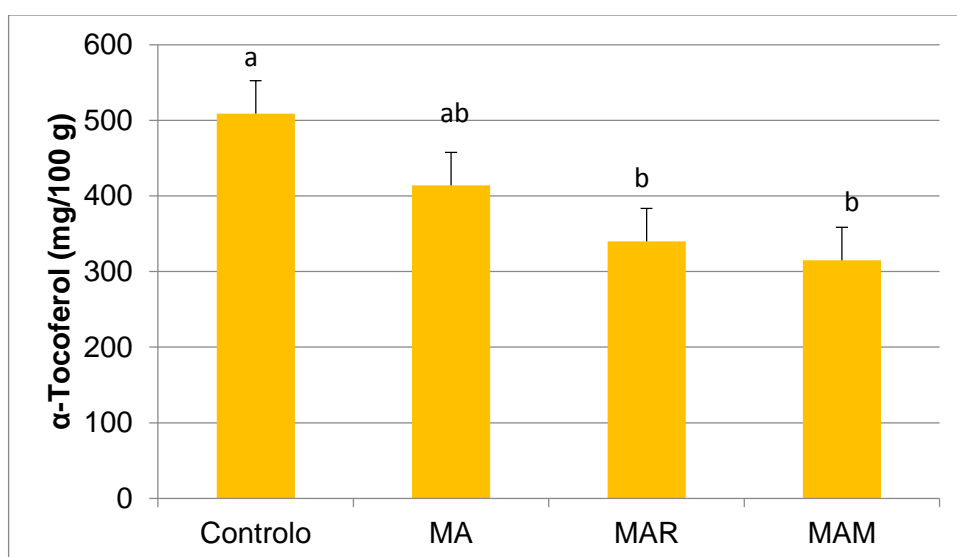
**Gráfico 7 – Teores de  $\gamma$ -tocoferol no peito de frango.**



Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% de Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura das 4 enzimas CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); ns, não significativo ( $P>0,05$ ).

Nos Gráficos 8 e 9 são apresentados os teores do  $\alpha$ -tocoferol e do  $\gamma$ -tocoferol na coxa de frango, respetivamente, e podemos observar, como era esperado, que os teores destes 2 vitâmeros são mais elevados que no peito. Para além disso, e contrariamente ao peito, os teores destes 2 homólogos na coxa foram significativamente inferiores nas dietas com a microalga ( $\gamma$ -tocoferol) e com a microalga suplementada com as enzimas exógenas ( $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol) em comparação à dieta controlo ( $P<0,05$ ).

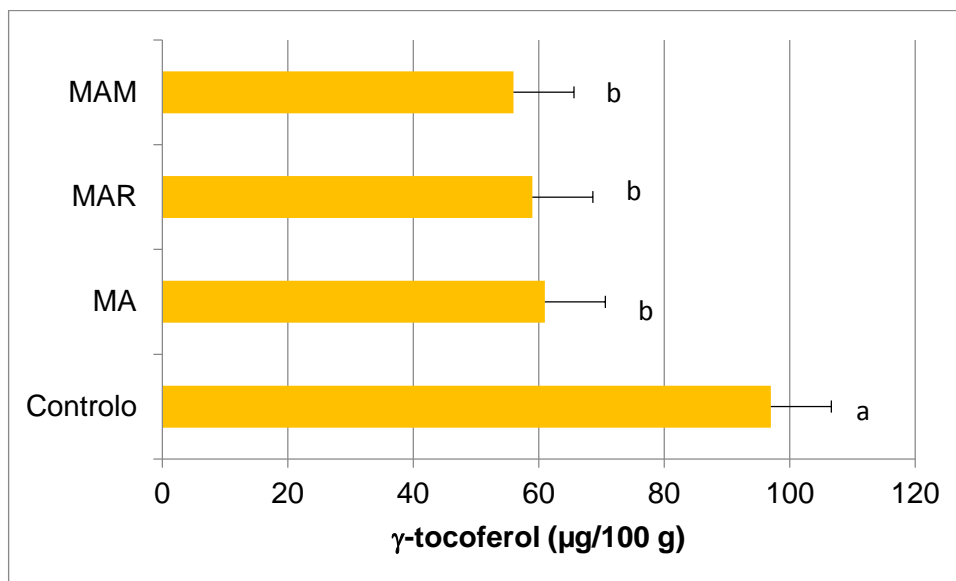
**Gráfico 8 – Teores de  $\alpha$ -tocoferol na coxa de frango.**



Controlo – dieta à base de de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% de *Chorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% de *Chlorella vulgaris* e 0,005% de Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% de *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura de 4 enzimas CAZymes. As

barras indicam o erro padrão da média (epm); letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**Gráfico 9 – Teores de  $\gamma$ -tocoferol na coxa de frango.**



Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% de *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% de *Chlorella vulgaris* e 0,005% de Rovabio<sup>®</sup> Excel AP; MAM - dieta com 10% de *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura de 4 enzimas CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

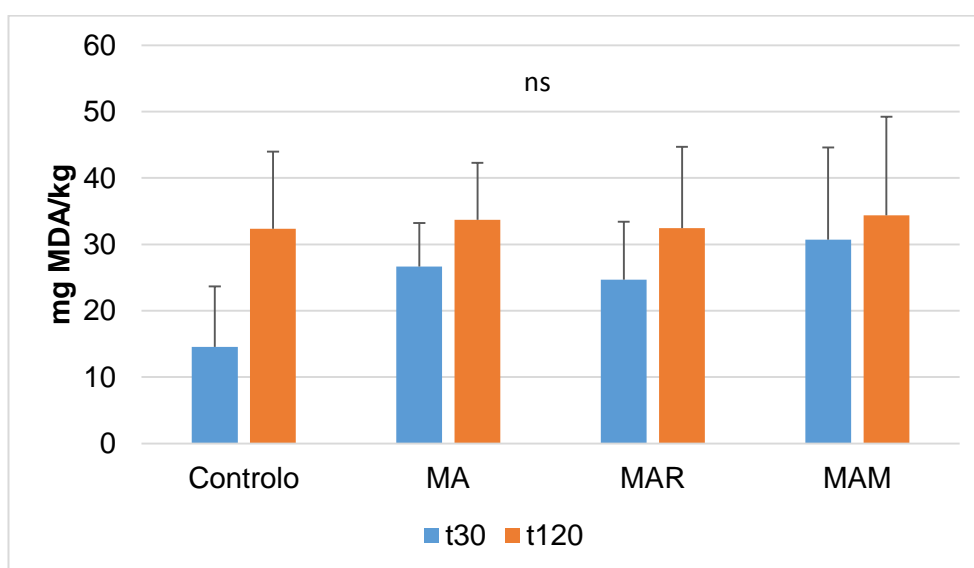
#### 5.4. Estabilidade oxidativa da carne da coxa de frango

No Gráfico 10 são apresentados os valores de TBARS na coxa de frango proveniente dos diferentes tratamentos. A suscetibilidade da carne à oxidação lipídica varia dependendo da espécie animal e do tipo de músculo (Rhee and Ziprin 1987). Os valores elevados de TBARS neste estudo resultam não só da indução mas, provavelmente, também de outros fatores prooxidantes. Diferenças no teor de gordura, composição em ácidos gordos, antioxidantes endógenos e catalisadores como metais têm também um papel importante na estabilidade oxidativa da carne (Allen and Foegeding 1981). Segundo Min et al. (2008) também diferenças na quantidade do pigmento heme e atividade da enzima catalase determinam a taxa de oxidação lipídica na carne fresca em geral. As carnes com maior concentração do pigmento heme, sobretudo as carnes vermelhas, produzem mais peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante a autooxidação da oximioglobina do que as carnes com menos pigmentos heme. O peróxido de hidrogénio pode reagir com a metamioglobina e promover a oxidação lipídica (Baron and Andersen 2002).

Segundo a literatura, níveis de TBARS acima de 0,8 mg/kg são indicativos de ranço na carne de aves (O'Neil et al. 1998), proporcionando um sabor oxidado e tornando a carne inaceitável para os consumidores (Bonos et al. 2016).

Pelos resultados podemos verificar que a estabilidade oxidativa da carne da coxa de frango, após 30 e 120 min de indução da oxidação, não foi afetada significativamente em todas os grupos analisados, embora seria de esperar que nas dietas com a microalga individualmente e em combinação com as enzimas exógenas os valores de TBARS fossem inferiores aos valores da dieta controlo. Apesar da *Chlorella vulgaris* ser uma fonte de pigmentos antioxidantes, embora em níveis inferiores comparativamente a outras microalgas (Madeira et al. 2017), a sua capacidade antioxidante não foi eficiente para proteger a carne da oxidação lipídica.

**Gráfico 10 – Efeito das dietas no TBARS da coxa de frango**



Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chlorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% de Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura das 4 enzimas CAZymes. As barras indicam o erro padrão da média (epm); ns, não significativo ( $P>0,05$ ).

No entanto, será expectável uma maior suscetibilidade da carne da coxa à oxidação que o peito como resultado do maior teor lipídico (Leskanich and Noble 1997; Betti et al. 2009) e do somatório das percentagens de ácidos gordos insaturados (MUFA e PUFA) ser mais elevado que no peito, e por isso, mais suscetíveis de sofrer oxidação.

## 6. Conclusões e considerações finais

A incorporação de 10% de *Chlorella vulgaris* em combinação com enzimas degradadoras de hidratos de carbono não alterou o teor de lípidos totais no peito e na coxa de frango. A inclusão de *Chlorella vulgaris* individualmente e/ou suplementada com as enzimas exógenas aumentou ligeiramente a deposição de alguns  $n-3$  PUFA na carne do peito (18:3 $n-3$  e 18:4 $n-3$ ) e na coxa (18:4 $n-3$ ) de frango. Contudo, os

resultados sugerem uma ineficiente conversão do 18:3 $n$ -3 nos  $n$ -3 LC-PUFA limitando a utilização desta microalga nas dietas para aves como fonte de ácidos gordos  $n$ -3. No peito de frango, a percentagem de SFA diminuiu com a incorporação de 10% de *Chlorella vulgaris* individualmente e quando adicionada da mistura das 4 CAZymes selecionadas. Na coxa de frango, a combinação da *Chlorella vulgaris* com a mistura das 4 CAZymes diminuiu o teor de colesterol e apresentou uma razão  $n$ -6/ $n$ -3 mais favorável. Contrariamente, os teores de  $\alpha$ -TF e  $\gamma$ -TF na coxa de frango foram inferiores com a inclusão de *Chlorella vulgaris* e/ou com a combinação de enzimas exógenas afetando negativamente a qualidade nutricional da carne de frango. Mais ainda, não se observou um efeito protetor da microalga com ou sem adição de enzimas, contra a oxidação lipídica na carne da coxa, não refletindo assim a composição e atividade antioxidante da *Chlorella vulgaris*, o que poderá explicar-se pelo teor lipídico muito baixo destas carnes.

No global, é possível que as CAZYmes possam ter efetivamente uma capacidade de degradar a parede celular da *Chlorella vulgaris in vivo* e, deste modo, constituir uma boa estratégia para melhorar a biodisponibilidade de nutrientes desta microalga quando incorporada como ingrediente nas dietas para animais monogástricos, em particular em aves, e ser uma fonte alternativa às culturas tradicionais de soja para uma agricultura animal mais sustentável. Existe, contudo, ainda um longo caminho a percorrer na investigação da aplicação de microalgas como possíveis ingredientes alternativos aos alimentos usuais na nutrição das aves. Trabalhos futuros devem explorar o impacto da incorporação de microalgas ricas em EPA e DHA, em diferentes níveis de incorporação e de suplementação com enzimas, para enriquecer a carne de aves em ácidos gordos  $n$ -3 LC-PUFA benéficos para a saúde humana. Para além da fração lipídica deverá também analisar-se o teor de proteínas e perfil de aminoácidos nos tratamentos utilizados para avaliar em que medida as microalgas individualmente ou em combinação com enzimas exógenas e os níveis de inclusão nas dietas poderão em parte substituir as fontes proteicas hoje em dia utilizadas nas dietas dos animais monogástricos.

## Referências bibliográficas

- Abo-Shady AM, Mohamed YA, Lasheen T. 1993. Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biol Plant*. 35:629–632.
- Allen CE, Foegeding EA. 1981. Some lipid characteristics and interactions in muscle foods—a review. *Food Technol*. 35(5):253–7.
- Barba FJ, Grimi N, Vorobiev E. 2014. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Eng Rev*. 7:45–62.
- Baron CP, Andersen HJ. 2002. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J Agric Food Chem* 50:3887–97.
- Baudelet PH, Ricochonb G, Lindera M, Munigliaa LA. 2017. New insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res*. 25:333-371.
- Bedford MR, Schulz H. 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutr Res Rev*. 11:91-114.
- Benevides CMJ, Souza MV, Souza RDB, Lopes MV. 2011. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. *Segurança Alimentar Nutricional* 18:67-79.
- Bernard O. 2011. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO2 mitigation and biofuel production. *J Process Control* 21:1378-1389.
- Bule MH, Ahmed I, Maqbool F, Bilal M, Iqbal HMN. 2018. Microalgae as a source of high-value bioactive compounds. *Front Biosci*. 10:197-216.
- Burczyk J, Hesse M. 1981. The ultrastructure of the outer cell wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin. *Plant Syst Evol*. 138:121-137.
- Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. 2007. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. *Quim Nova* 30:441-449.
- Cha KH, Kang SW, Kim, CY et al. 2010. Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *J Agric Food Chem*. 58:4756-4761.
- Coelho D, Lopes PA, Cardoso V, Ponte P, Brás J, Madeira MS, Alfaia CM, Bandarra NM, Gerken HG, Fontes CMGA, Prates JAM. 2019. Novel combination of feed enzymes to improve the degradation of *Chlorella vulgaris* recalcitrant cell wall. *Sci Rep* 9: 5382.
- Cowieson AJ, Bedford MR. 2009. The effect of phytase and carbohydrate on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complementary mode of action? *Worlds Poul Sci J*. 65:609-624.
- Costa PM 2002. Resistências antimicrobianas em avicultura. Livro do Congresso de Ciências Veterinárias. Taguspark-Oeiras, 10-12 de outubro, pp. 251-260.
- Choct 2006. Enzymes for feed industry: past, present and future. *World's Poul Sci J*. 62:5-16.

- Derner RB, Ohse S, Villela M, Carvalho SMC, Fetts R. 2006. Microalgae, products and applications. *Ciência Rural* 36(6):1959-1967.
- Gatrell SK, Kim JG, Derksen TJ, O'Neil EV, Lei XG. 2015. Creating  $\omega$ -3 fatty-acid-enriched chicken using defatted green microalgal biomass. *J Agric Food Chem.* 63:9315–9322.
- Griffin BA. 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. *Curr Opin Lipidol.* 19:57-62.
- Havenstein GB, Ferket PR, Qureshi MA. 2003. Growth, livability and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci.* 82:1500-1508.
- INE (2019). Consumo de carne per capita. Instituto Nacional de estatística. <https://www.ine.pt/>
- Kapaun E, Reisser W. 1995. A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Planta* 197:577–582.
- Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aroma A. 1994. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol.* 139(12):1180-9.
- Liu J, Chen F. 2016. Biology and industrial applications of *Chlorella*: Advances and prospects. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 153:1-35.
- Lum K, Kim J, Lei X. 2013. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *J Anim Sci Biotechnol.* 4:53.
- Madeira LA, Sartori JR, Saldanha ESPB, Pizzolante CC, Silva MDP, Mendes AA, Takahashi SE, SolarteWVN. 2006. Morfologia das fibras musculares esqueléticas de frangos de corte de diferentes linhagens criados em sistemas de confinamento e semi-confinamento. *R. Bras. Zootec.* 35:2322-2332.
- Madeira MS et al. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review. *Livestock Sci.* 205:111-121.
- Maiani G, Castón MJP, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, et al. 2009. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res.* 53(Suppl 2):S194-218.
- Mann J, Truswell AS. 2002. *Essentials of Human Nutrition* (2nd Edition). New York: Oxford University Press.
- Martin GJO. 2016. Energy requirements for wet solvent extraction of lipids from microalgal biomass. *Bioresour Technol.* 205:40–47.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA. 2002. *Animal Nutrition* (6<sup>th</sup> ed.). England: Person Education Limited.
- McNulty H, Jacob RF, Mason RP. 2008. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am J Cardiol.* 101(suppl):20D-9D.

- Min B, Nam KC, Cordray J, Ahn DU. 2008. Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *J Food Sci.* 73:C439-C446.
- Mooney JW, Hirschler EM, Kennedy AK, Sams AR, Van Elswyk ME. 1998. Lipid and flavour quality of stored breast meat from broilers fed marine algae. *J Sci Food Agric.* 78:134-140.
- Norman IK. 2001. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* 17(10):815-7.
- OCDE/FAO 2019. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico, e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura.
- Passos F, Ferrer I. 2015. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Res* 68:364-373.
- Pestana JM, Puerta B, Santos H, Madeira MS, Alfaia CM, Lopes PA, Pinto RMA, Lemos JPC, Fontes CMGA, Lordelo MM, and Prates JAM. (2020). Impact of dietary incorporation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and exogenous enzymes on broiler performance, carcass traits, and meat quality. *Poult. Sci.* 99:2519-2532.
- Ponte PIP, Alves SP, Bessa RJB, Ferreira LMA, Gama LT, Brás JLA, Fontes CMGA, Prates JAM. 2008. Influence of pasture intake on the fatty acid composition, and cholesterol, tocopherols, and tocotrienols content in meat from free-range broilers. *Poult. Sci.* 87:80-88.
- Prates JAM, Quaresma MAG, Bessa RJB, Fontes CMGA, Alfaia CPM. 2006. Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and b-carotene in Barrosã-PDO veal. *Food Chem.* 94:469-477.
- Pratiwi N, Murray PJ, Taylor DG. 2006. Total cholesterol concentrations of the muscles in castrated Boer goats. *Small Ruminant Res.* 64:77-81.
- Raes K, De Smet S, Demeyer D. 2001. Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids. *Anim Sci Papers Reports* 73:253-260.
- Rao AV, Rao LG. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res.* 55(3):207-16.
- Raposo MFJ, de Moraes RMSC, de Moraes AMMB. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci.* 93:479-486.
- Ravindran V. 2012. Poultry feed availability and nutrition in developing countries. *Poultry Development Review.* FAO. [www.fao.org/ag/againfo/themes/en/poultry/AP\\_nutrition.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/poultry/AP_nutrition.html)
- Rhee KS, Ziprin YA. 1987. Lipid oxidation in retail beef, pork and chicken muscles as affected by concentrations of heme pigments and nonheme iron microsomal enzymic lipid peroxidation activity. *J Food Biochem* 11:1-15.
- Ribeiro T, Lordelo MM, Alves SP, Bessa RJB, P. Costa, Lemos JPC, Ferreira LMA, Fontes CMGA, Prates JAM. 2013. Direct supplementation of diet is the most

- efficient way of enriching broiler meat with n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Br. Poult. Sci.* 54:753-765.
- Ribeiro T, Lordelo MM, Costa P, Alves SP, Benevides WS, Bessa RJB, Lemos JPC, Pinto LMARMA, Ferreira LMA, Fontes CMGA, Prates JAM. 2014. Effect of reduced dietary protein and supplementation with docosahexaenoic acid product on broiler performance and meat quality. *Brit. Poult. Sci.* 55:752-765.
- Santos HMMLM 2019. Valorização nutricional da carne de frangos alimentados com dietas contendo *Arthrospira platensis* e aditivadas com enzimas exógenas. [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV-Universidade de Lisboa.
- Soares MC. 2010. Desafios da Segurança Alimentar: Sector Avícola, FEPASA – Federação Portuguesa das Associações Avícolas.
- Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P, Vaca-Garcia C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renew Sust Energ Rev.* 35:265-278.
- Sokołowicz Z, Krawczyk J, Świątkiewicz S. 2016. Quality of poultry meat from native chicken breeds – a review. *Ann Anim Sci.* 16(2):347–368.
- Slomninski BA. 2011. Recent advances in research on enzymes for poultry diets, *Poult Sci.* 90:2003-2023
- Takeda H. 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *J Phycol.* 27:224–232.
- Teixeira L. 2013. *Efeito da Suplementação de Enzimas Exógenas em Regimes Alimentares à base de Milho e Trigo nos Índices Zootécnicos de Frangos de Carne*. Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia-Universidade de Lisboa
- Verstegen MWA, Poel AFB. 2009. Grains in Nutrition for Farm Animals. XXV Curso de Especialization. FEDNA.
- West ML, Corzo A, Dozier III WA, Blair ME, Kidd MT. 2007. Assessment of dietary rovabio excel in practical United States broilers diets. *J Applied Poult Res.* 16:313-332.
- Zanella I, Sakomura NK, Silversides FG, Figueirido A, Pack M.1999. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poult Sci.* 78:581-568.
- Zou J, Zheng P, Zhang K, Ding X, Bai S. 2013. Effects of exogenous enzymes and dietary energy on performance and digestive physiology of broilers. *J Anim Sci Biotechnol.* 4:14.

## Anexos

### Anexo 1 – Dados do desempenho zootécnico

DIAS 21 A 27 DO ENSAIO (7 dias de tratamento)

	Controlo	MA	MAM	MAR	EPM	P
GMD	77,5	67,9	76,9	70,8	2,956	0,076
Ingestão	346,8	320,3	350,2	327,3	9,311	0,078
IC	4,479	4,743	4,56	4,759	0,153	0,496

DIAS 28/6 A 2/7 DO ENSAIO (5 dias de tratamento)

	Controlo	MA	MAM	MAR	EPM	P
GMD	88,7	91,8	90,4	93,9	2,952	0,645
Ingestão	424,2	427,5	438,9	421,2	15,19	0,853
IC	4,794	4,675	4,876	4,49	0,143	0,266

DIAS 21 A 32 DO ENSAIO (12 dias de tratamento)

	Controlo	MA	MAM	MAR	EPM	P
GMD	82,1	78,5	82,5	81,5	2,392	0,634
Ingestão	379,0	364,9	387,2	366,4	10,85	0,424
IC	4,619	4,662	4,689	4,513	0,085	0,490

DIAS 21/6 A 4/7 DO ENSAIO (14 dias de tratamento)

	Controlo	MA	MAM	MAR	EPM	P
GMD	80,8	81,4	81,8	81,6	2,406	0,991
Ingestão	128,4	124	131,1	124,4	3,644	0,464
IC	1,59	1,537	1,602	1,528	0,037	0,395
Peso inicial	786,8	788,3	783,4	780,2	12,67	0,969
Peso final	1867,40	1927,8	1929,2	1923,9	52,89	0,811

Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,005% Rovabio ®Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chlorella vulgaris* e 0,01% mistura 4 enzimas CAZymes; EPM – erro padrão da média; GMD – ganho médio diário; IC – índice de conversão.

**Anexo 2 – Composição proximal da *Chlorella vulgaris* (Instituto Superior de Agronomia, Seção de Produção Animal)**

Matéria Seca (%)	93,1
Cinza (% MS)	12,7
Proteína Bruta (% MS)	46,0
Gordura Bruta (% MS)	9,4
Energia Bruta (kcal/g)	4,586

**Anexo 3 - Composição e somatório de ácidos gordos da microalga *Chlorella vulgaris***

Ácidos gordos	Média (% AGT)	dp	Média (mg/g)	dp
11:0	0.3	0.00	0.2	0.00
12:0	0.5	0.01	0.4	0.01
14:0 Isobr	0.7	0.01	0.6	0.01
14:0	1.1	0.01	0.9	0.01
15:0- isobr	1.1	0.01	0.9	0.02
15:0 ante-iso	0.2	0.00	0.1	0.01
15:0	0.1	0.02	0.1	0.01
16:0 ante-iso	0.4	0.01	0.3	0.01
16:0	17.2	0.04	13.6	0.14
16:1 <i>n</i> -9	3.9	0.00	3.1	0.02
16:1 <i>n</i> -7	10.1	0.02	8.0	0.04
17:0 Isobr	1.5	0.00	1.2	0.01
16:2 $\omega$ 4	0.1	0.00	0.1	0.00
17:0	0.2	0.00	0.2	0.00
16:3 $\omega$ 4	0.3	0.00	0.2	0.00
17:1	0.6	0.00	0.5	0.00
18:0	3.0	0.01	2.4	0.01
18:1 $\omega$ 9	11.7	0.02	9.3	0.06
18:1 $\omega$ 7	8.5	0.01	6.7	0.04
18:2 $\omega$ 6	11.2	0.00	8.9	0.07
19:0	0.0	0.00	0.0	0.00
18:3 $\omega$ 3	10.1	0.16	7.9	0.06
18:4 $\omega$ 3	0.0	0.00	0.0	0.00
20:0	0.2	0.00	0.1	0.00
20:1 $\omega$ 11	0.1	0.00	0.1	0.00
20:1 $\omega$ 9	0.1	0.00	0.1	0.00
20:2 $\omega$ 6	0.1	0.01	0.1	0.01
20:4 $\omega$ 6	0.0	0.00	0.0	0.00
20:3 $\omega$ 3	0.2	0.01	0.1	0.00
20:5 <i>n</i> -3	0.0	0.00	0.0	0.00
22:0	0.1	0.00	0.0	0.00
22:5 <i>n</i> -3	0.0	0.00	0.0	0.00
24:0	0.2	0.01	0.1	0.00
22:6 <i>n</i> -3	0.0	0.00	0.0	0.00
$\Sigma$ SFA	26.7	0.10	21.1	0.24

Σ MUFA	35.2	0.09	27.8	0.14
Σ PUFA	21.9	0.18	17.3	0.01
Σ n-3 PUFA	10.2	0.17	8.1	0.07
Σ n-6 PUFA	11.3	0.02	8.9	0.06
n-3/n-6	0.9		0.9	

Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chorella vulgaris* e 0,005% Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chorella vulgaris* e 0,01% mistura de 4 enzimas CAZymes; AGT – ácidos gordos totais; EPM – erro padrão da média; SFA – ácidos gordos saturados; MS – matéria seca; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos poliinsaturados; dp – desvio padrão.

#### Anexo 4 – Composição em pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris*

Dieta (µg/g)	Controlo	MA	MAR	MAM	EPM	P
Clorofila a	8,58 <sup>a</sup>	658 <sup>c</sup>	732 <sup>c</sup>	170 <sup>b</sup>	18,8	<0,0001
Clorofila b	15,4 <sup>a</sup>	224 <sup>b</sup>	214 <sup>b</sup>	38,7 <sup>a</sup>	16,9	<0,0001
Total clorofilas (a+b)	24,0 <sup>a</sup>	881 <sup>c</sup>	945 <sup>c</sup>	209 <sup>b</sup>	33,0	<0,0001
Total carotenóides	3,74 <sup>a</sup>	101 <sup>c</sup>	114 <sup>c</sup>	240 <sup>b</sup>	3,37	<0,0001
Total clorofilas+carotenoides	27,8 <sup>a</sup>	983 <sup>c</sup>	1059 <sup>d</sup>	240 <sup>b</sup>	31,8	<0,0001
Total feofitinas	109 <sup>a</sup>	3985 <sup>c</sup>	4320 <sup>c</sup>	872 <sup>b</sup>	144	<0,0001

Controlo – dieta à base de milho e bagaço de soja; MA - dieta com 10% *Chorella vulgaris*; MAR – dieta com 10% *Chorella vulgaris* e 0,005% Rovabio® Excel AP; MAM - dieta com 10% *Chorella vulgaris* e 0,01% mistura de 4 enzimas CAZymes; EPM – erro padrão da média.

#### Anexo 5 – Ficha técnica do Rovabio® Excel

## Rovabio® Excel

### Fonte de excelência

Rovabio® Excel é um aditivo nutricional que tem uma combinação naturalmente compatível de atividades enzimáticas produzidas pelo fungo não geneticamente modificado *Penicillium funiculosum*.

As enzimas encontradas em Rovabio® Excel são produzidas por um único micro-organismo, em um mesmo lote de fermentação. Tais enzimas são naturalmente compatíveis, o que confere estabilidade e eficácia otimizadas. Vários tipos de xilanases, β-glucanases e celulasas estão associadas a outras atividades enzimáticas essenciais. Esta combinação de enzimas atua em sinergia para proporcionar a quebra de uma ampla gama de compostos naturalmente não digeríveis, presentes nas matérias-primas do alimento.

Rovabio® Excel é disponível em duas apresentações:

- líquido (Rovabio® Excel LC e LC2)
- pó (Rovabio® Excel AP e AP10)

A apresentação do produto em pó é indicada para os alimentos farelados e peletizados, desde que o tratamento por calor não ultrapasse 85°C. Para evitar perda de atividade, em caso de exposição do alimento a altas temperaturas, recomenda-se pulverizar o líquido após o tratamento térmico ou a utilização de Rovabio® T-Flex.

Rovabio® Excel é o único produto que tem a vantagem de contar com 6 registros no mercado Europeu (frangos, poedeiras, perus, patos, suínos e leitões).



Atividades enzimáticas de Rovabio® Excel

Xilanases	Endo-1,4 β-xilanases α-arabinofuranosidase β-xilanases Ferulol esterase Endo-1,5 α-arabinanase
β-glucanases	Endo-1,3(4) β-glucanase Laminarinase
Celulasas	Endo-1,4 β-glucanase Celobiohidrolase β-glucosidase
Pectinases	Pectinases Poligalacturonase Pectina esterase Ramnogalacturonase
Proteases	Protease aspártica Metalo protease
Outras	Endo-1,4 β-mananase β-manosidase α-galactosidase