

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



QUALIDADE E ESTABILIDADE OXIDATIVA DA CARNE PROVENIENTE DE
FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ELEVADO TEOR DE
SPIRULINA *PER SE* OU EXTRUDIDA E SUPLEMENTAÇÃO COM ENZIMAS
EXÓGENAS

JOANA INÊS HENRIQUES FERREIRA

ORIENTADOR
Doutor José António Mestre Prates

COORIENTADORA
Doutora Mónica Mendes da Costa

2025

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



QUALIDADE E ESTABILIDADE OXIDATIVA DA CARNE PROVENIENTE DE
FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ELEVADO TEOR DE
SPIRULINA *PER SE* OU EXTRUDIDA E SUPLEMENTAÇÃO COM ENZIMAS
EXÓGENAS

JOANA INÊS HENRIQUES FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI PRESIDENTE:
Doutor Rui José Branquinho de Bessa

VOGAIS:
Doutor José António Mestre Prates
Doutora Cristina Maria Riscado Mateus

ORIENTADOR:
Doutor José António Mestre Prates

COORIENTADORA:
Doutora Mónica Mendes da Costa

2025

Nome: Joana Inês Henriques Ferreira

Título da Tese ou
Dissertação: QUALIDADE E ESTABILIDADE OXIDATIVA DA CARNE
PROVENIENTE DE FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM
ELEVADO TEOR DE SPIRULINA PER SE OU EXTRUDIDA E
SUPLEMENTAÇÃO COM ENZIMAS EXÓGENAS

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas
públicas): 2025

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

Área científica em que melhor se enquadra:

- 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, retirando as que não interessam):

- 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, 20 de janeiro de 2025

Assinatura:

Joana Ferreira

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que estiveram disponíveis para trocar um pouco de conhecimento e experiência comigo. Foram muito valiosos para mim durante uma fase desafiadora da minha vida pessoal e académica.

Em particular, quero expressar o meu apreço:

À minha equipa de orientação, Doutor Professor José António Mestre Prates e a Doutora Mónica Mendes da Costa “mana mais velha”, por me terem acolhido na equipa e dado oportunidade para evoluir. Obrigado pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos professores e colaboradores da FMV que não me deixaram desistir, e principalmente à Patrícia por me encorajar e fazer acreditar que estou à altura destes desafios. A Zé, a Lena e a Maria pelo acolhimento, pela ajuda e pelos vossos conselhos.

Aos meus colegas de turma, Beatriz, João, Carla e Teresinha que estiveram sempre disponíveis para sofrer comigo e dar uma palavra de conforto, que muito vezes era só o necessário.

As melhores “labmates” de sempre e amigas de boas e más horas. Maria, Mafalda, Vanessa, Rita, Ana e Elisabete. Esta equipa consegue o mundo! Obrigada pela vossa ajuda, pelos ensinamentos, académicos e pessoais, por me darem na cabeça quando necessário e se rirem muito comigo. Ao Obete, por fazeres os tempos mais leves e divertidos.

À minha avó, irmã, tia e mãe um agradecimento do coração por tudo que fazem para me ver feliz.

Ao meu namorado pelas palavras de carinho e encorajamento que me deram forças para continuar.

RESUMO

Qualidade e estabilidade oxidativa da carne proveniente de frangos alimentados com dietas com elevado teor de Spirulina *per se* ou extrudida e suplementação com enzimas exógenas

A crescente procura por alimentos, impulsionada pelo aumento da população, exige a busca por fontes proteicas alternativas e sustentáveis. Assim, torna-se essencial encontrar alternativas viáveis para o bagaço de soja, garantindo a segurança alimentar e reduzindo impactos ambientais. Este estudo avaliou o efeito da inclusão de 15% de Spirulina (*Limnospira platensis*) extrudida e suplementada com enzimas na dieta de frangos de carne, focando na qualidade nutricional e estabilidade oxidativa da carne. O ensaio teve a duração de 35 dias e envolveu 120 frangos machos com 1 dia de idade, distribuídos em quatro grupos experimentais, cada um com 10 aves: controlo (CTR) com dieta basal de soja e milho; 15% de Spirulina (SP); 15% de Spirulina extrudida (SPEX); e 15% de Spirulina extrudida com uma mistura enzimática, composta por 0,20% de extrato de pancreatina suína e 0,01% de lisozima (SPEZ). A suplementação com Spirulina iniciou-se no 21º dia e foi mantida até o abate, no 35º dia. Foram analisados a oxidação lipídica, o poder antioxidante, o perfil lipídico e os pigmentos, utilizando métodos espectrofotométricos (UV e visível) e cromatográficos (GC-FID e HPLC-DAD/FD) em amostras de carne de peito e coxa. A análise estatística foi realizada com o *software* SAS e a unidade experimental foi a gaiola. A carne dos frangos suplementados com Spirulina apresentou pH semelhante ao grupo controlo ($p=0,166$), mas diferenças significativas no parâmetro b^* da cor (CIELAB) ($p<0,001$). A adição de Spirulina não alterou significativamente os níveis de oxidação lipídica ($p=0,733$). No entanto, a composição do perfil lipídico variou entre os grupos, com um aumento nos ácidos gordos polinsaturados e saturados em relação ao controlo ($p<0,001$), o que melhorou os rácios nutricionais ($n-6/n-3$ e PUFA/SFA) de ácidos gordos. Conclui-se que a inclusão de Spirulina extrudida, associada à suplementação enzimática, mitiga os efeitos negativos sobre a digestibilidade, promovendo melhor aproveitamento nutricional sem prejudicar a qualidade da carne.

Palavras-chave: frango de corte, *Limnospira platensis*, extrusão de microalgas, enzimas alimentares, qualidade da carne.

ABSTRACT

Oxidative quality and stability of meat from chickens fed diets with high content of Spirulina *per se* or extruded and supplemented with exogenous enzymes

The growing demand for food, driven by population growth, requires the search for alternative and sustainable protein sources. Thus, it is essential to find viable substitutes for soybean meal, ensuring food security and reducing environmental impacts. This study evaluated the impact of including 15% Spirulina (*Limnospira platensis*) in the diet of broiler chickens, focusing on the nutritional quality and oxidative stability of the meat. The experiment lasted 35 days and involved 120 one-day-old male chickens, divided into four experimental groups, each with 10 birds: control (CTR) with a basal soy and corn diet; 15% Spirulina (SP); 15% extruded Spirulina (SPEX); and 15% extruded Spirulina with an enzyme mixture, composed of 0.20% pig pancreatin extract and 0.01% lysozyme (SPEZ). The Spirulina supplementation began on day 21 and continued until slaughter on day 35. Lipid oxidation, antioxidant power, lipid profile, and pigments were analyzed using spectrophotometric methods (UV and visible) and chromatographic techniques (GC-FID and HPLC-DAD/FD) in samples of breast and thigh meat. Statistical analysis was performed using SAS software. The meat of the Spirulina-supplemented chickens showed a similar pH to the control group ($p=0.166$), but significant differences in the b^* color parameter (CIELAB) ($p<0.001$). Spirulina addition did not significantly affect lipid oxidation levels ($p=0.733$). However, the lipid profile composition varied among the groups, with an increase in omega-3 and saturated fatty acids compared to the control ($p<0.001$), improving nutritional ratios. It was concluded that the inclusion of extruded Spirulina, combined with enzyme supplementation, mitigates negative effects on digestibility, promoting better nutritional utilization without compromising meat quality.

Keywords: Broiler chicken, *Limnospira platensis*, Microalga extrusion, Feed enzyme, Meat quality.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
Índice Geral.....	vi
Índice de tabelas.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Lista de símbolos.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Produção, consumo e preferência da carne de frango.....	2
2.2 Composição química da carne de frango.....	2
2.3 Incorporação das microalgas nas dietas de frangos.....	3
2.4 Caracterização e produção das microalgas.....	3
2.5 Suplementação das dietas dos frangos com enzimas.....	4
2.6 Qualidade alimentar e importância dos lípidos.....	5
2.7 Segurança da carne de frango enriquecida com microalgas e aceitabilidade do consumidor.....	7
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1 Delineamento experimental.....	9
4.2 Determinação de pH e cor.....	12
4.3 Determinação da oxidação lipídica.....	12
4.4 Determinação do teor de lípidos totais e composição do perfil de ácidos gordos.....	13
4.5 Determinação do teor de colesterol, vitaminas lipossolúveis e β -caroteno.....	15
4.6 Determinação do teor de pigmentos.....	16
4.7 Análise estatística.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Performance de crescimento e eficiência alimentar.....	17
5.2 pH e cor.....	18
5.3 Oxidação lipídica da carne.....	19
5.4 Teor de lípidos totais e composição do perfil de ácidos gordos.....	19
5.5 Teor de colesterol e vitaminas lipossolúveis.....	22
5.6 Teor de pigmentos.....	23
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	27

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
-------------------------------------	----

Índice de tabelas

Tabela 1: Composição química da carne da coxa e do peito de frango cru sem pele por 100g edíveis	3
Tabela 2: Composição química da microalga Spirulina	4
Tabela 3: Composição nutricional das dietas e da microalga Spirulina.....	10
Tabela 4: Resultados referentes a performance de crescimento e eficiência alimentar (dia 21 ao dia 35) em função das diferentes dietas	17
Tabela 5: Resultados de pH e cor das amostras de peito e coxa de frango em função das diferentes dietas.....	18
Tabela 6: Resultados da oxidação lipídica da carne de peito em função das diferentes dietas e períodos	19
Tabela 7: Teor de lípidos totais e composição de ácidos gordos do peito em função das diferentes dietas	20
Tabela 8: Teor de lípidos totais e composição dos ácidos gordos da coxa em função das diferentes dietas	21
Tabela 9: Teor de colesterol e de vitaminas lipossolúveis do peito em função das diferentes dietas	22
Tabela 10: Teor de colesterol e de vitaminas lipossolúveis da coxa em função das diferentes dietas	22
Tabela 11: Teor de pigmentos do peito em função das diferentes dietas.....	23
Tabela 12: Teor de pigmentos da coxa em função das diferentes dietas.....	23

Índice de figuras

Figura 1: Cor da carne de peito e coxa de frangos alimentados com dieta controlo e dietas suplementadas com Espirulina.....	19
---	----

Lista de abreviaturas

AG – Ácidos gordos

BHT - Hidroxitolueno butilado

CAZymes - *Carbohydrate-Active enZymes* (enzimas degradadoras de hidratos de carbono)

CTR – Dieta controlo

DGAV - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

EDTA - Ácido etilenodiamina tetra-acético

FAME – *Fatty Acids Methyl Esters* (ésteres metílicos de ácidos gordos)

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

GC – Gas Chromatography (Cromatografia de fase gasosa)

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

INE – Instituto Nacional de Estatística

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ISA - Instituto Superior de Agronomia

KCl - Cloreto de potássio

MDA - Malondialdeído

MS – Matéria seca

MUFA - *Monounsaturated Fatty Acids* (Ácidos gordos monoinsaturados)

n.d. – Não detetado

n-3 - Ómega-3

n-6 - Ómega-6

NRC - *National Research Council* (Conselho Nacional de Investigação)

OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*

ORBEA - Comité de Bem-Estar Animal

PUFA - *Polyunsaturated Fatty Acids* (Ácidos gordos polinsaturados)

p - Probabilidade

SAS - *Statistical Analysis System*

SEM – Erro padrão da média

SFA - *Saturated Fatty Acids* (Ácidos gordos saturados)

SP – Espirulina

SPEX - Espirulina extrudida

SPEZ - Espirulina extrudida + mistura enzimática

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

Lista de símbolos

% - Percentagem

= - Igual

± - Mais ou menos

°C - Grau Celsius

cm – centímetros

g - Grama

µg - Micrograma

kg - Quilograma

mg – Miligrama

MJ – Megajoule

mL – Mililitro

mm – Milímetro

n - Número de réplicas

nm - Nanómetro

rcf - *Relative Centrifugal Force* (Força Centrífuga Relativa)

rpm – Rotações por minuto

U – Unidade de atividade catalítica

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais exigentes, informados e conscientes acerca da alimentação, da indústria alimentar e da sua relação com a sustentabilidade e o meio ambiente. A origem dos alimentos, as práticas agrícolas, a qualidade nutricional e a segurança dos alimentos têm um peso crescente nas decisões de compra (Petrescu *et al.* 2019).

O aumento da população mundial é uma tendência demográfica que se tem intensificado nas últimas décadas, e as projeções indicam um aumento significativo nos próximos anos, com a população global a passar de 8,2 mil milhões atualmente para 9,7 mil milhões até 2050. Nesse cenário, a indústria alimentar e todos os seus intervenientes devem priorizar o crescimento sustentável, garantindo simultaneamente a oferta adequada de alimentos, a sua qualidade e segurança (FAO, 2017). No entanto, a necessidade de aumentar a produção de alimentos leva a uma intensificação das atividades agrícolas e pecuárias, resultando num maior consumo de recursos naturais, que estão cada vez mais escassos. Esse crescimento da produção intensiva traz desafios sociais, económicos e ambientais, com a agricultura sendo uma das principais responsáveis por problemas como a emissão de gases com efeito de estufa, degradação dos solos, poluição da água e perda de biodiversidade (Gerber *et al.* 2013).

Entre as carnes, a de aves, especialmente frango, destaca-se pelo maior crescimento em termos de produção e consumo. Esse tipo de carne é particularmente adequado para produção intensiva, com avanços contínuos na sua eficiência (FAO, 2023). A alimentação dos frangos é predominantemente baseada em rações de milho, como fonte de energia, e soja, a oleaginosa mais cultivada mundialmente, usada como principal fonte de proteína. Contudo, o crescimento na produção de frangos tem exigido uma expansão proporcional na produção de milho e soja, o que levanta sérias questões de sustentabilidade (Gerber *et al.* 2013). Para garantir a segurança alimentar e um futuro sustentável, é fundamental desenvolver, investir e aplicar novas estratégias de mitigação, explorando alimentos alternativos para a alimentação animal. Entre as soluções promissoras, destaca-se o uso de microalgas, como a Espirulina, que pode substituir o bagaço de soja devido à sua composição nutricional rica e aos benefícios ambientais (Madeira *et al.* 2017).

No entanto, essas matérias-primas apresentam desafios, como a baixa digestibilidade da Espirulina para animais monogástricos, tornando necessário o tratamento prévio, como a extrusão e o uso de enzimas exógenas, dessas substâncias para melhorar a sua utilização.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção, consumo e preferência da carne de frango

A produção e consumo de carne (bovino, suíno e aves), um alimento básico na dieta humana, aumentou nas últimas décadas de modo a acompanhar o aumento populacional. A carne de aves, nomeadamente frango, é a que apresenta o maior aumento de produção e consumo. Nos últimos 21 anos, a nível mundial, produziu-se mais 53% de carne, sendo a carne de frango a que representa mais de metade deste aumento (FAO 2023).

A produção intensiva visa a maximizar a produção no menor tempo possível, mantendo a qualidade e o baixo custo. A carne de frango é particularmente adequada a este tipo de produção. A seleção genética, a qual possibilitou a produção de frangos de crescimento rápido e menor índice de conversão, e o desenvolvimento tecnológico com a modernização e automatização da cadeia de abastecimento são alguns dos principais fatores que impulsionaram o aumento da produção (OECD/FAO 2023). A sua produção requer menos recursos energéticos e necessita de menos espaço para criação, tornando o frango um alimento significativamente mais sustentável. Além da sustentabilidade, o preço acessível, a disponibilidade, as questões culturais (restrições de carne vermelha em algumas religiões) e a crescente consciencialização sobre alimentação saudável (uma carne branca rica em proteína e micronutrientes essenciais) são fatores que contribuem para a preferência do consumidor pela carne de frango (OECD/FAO 2023).

O mercado interno português foi responsável por 75,4% da carne consumida no país e a preferência pela carne de frango também é evidente. A produção de carne de aves correspondeu a 47% da produção total, tendo-se consumido um total de 421 mil toneladas desta fonte proteica. Nas últimas décadas, existiu um aumento constante na produção de carne de aves e as carnes de frango são as que mais contribuíram para este crescimento (INE 2024).

2.2 Composição química da carne de frango

A composição da carne de frango varia principalmente no teor de água (60% a 80%), proteína (15% a 20%) e gordura (10% a 15%). O teor de lípidos totais varia de acordo com o sexo, idade, raça, ambiente e alimentação dos animais. Os hidratos de carbono presentes na carne de frango são normalmente reduzidos e estão presentes maioritariamente na forma de glicogénio, aproximadamente 1%. Outros componentes importantes são os micronutrientes, como os minerais (nomeadamente o ferro), vitaminas do complexo B e substâncias bioativas (como os pigmentos), geralmente

derivados das dietas dos animais (Soriano 2010). O peito e a coxa da carne de frango são os tecidos com maior valor comercial e estes tecidos apresentam uma composição ligeiramente diferente, devido as fibras que os compõem e o teor de gordura. Naturalmente, a coxa é um músculo mais gordo do que os músculos do peito do frango (Soriano 2010). A tabela 1 apresenta a composição química do peito e da coxa de frango e os valores estão apresentados em 100 g edíveis de carne do peito e da coxa crus e sem pele.

Tabela 1: Composição química da carne da coxa e do peito de frango cru sem pele por 100g edíveis (adaptado da Tabela da Composição dos Alimentos - INSA)

Nutrientes (por 100 g edíveis)	Coxa	Peito
Água	74,3 g	73,8 g
Proteína	22,0 g	24,1g
Gordura total	2,6 g	1,2 g
α – Tocoferol	0,17 mg	0,13 mg
Colesterol	100 mg	70 mg

2.3 Incorporação das microalgas nas dietas de frangos

O milho e a soja são os ingredientes principais das rações dos frangos, no entanto a dependência de Portugal, deste cereal e leguminosa, e o facto de se estarem a tornar culturas insustentáveis levanta uma ameaça à segurança alimentar. O uso de microalgas como substituto da fonte proteica é uma possível solução adequada nutricionalmente e mais sustentável (Madeira *et al.* 2017). A indústria da produção de microalgas está atualmente em crescimento, mas ainda existem áreas passivas de desenvolvimento e o custo de investimento ainda é elevado. É fundamental que a indústria de produção de microalgas colabore estreitamente com os produtores de carne de frango, sensibilizando-os para a necessidade de mudança e oferecendo suporte para se promover o uso eficaz deste recurso, aumentar a sua disponibilidade, otimizar os processos relacionados e promover soluções mais sustentáveis para a produção de alimentos (Dineshbabu *et al.* 2019). A escolha da microalga para a incorporação nas dietas de frangos depende da sua qualidade nutricional, da sua facilidade de aquisição e do seu custo.

2.4 Caracterização e produção das microalgas

As microalgas são organismos unicelulares pertencentes ao reino Bacteria. Existem aproximadamente 100.000 espécies de microalgas sendo a cor a característica que permite dividir as algas em 4 grupos diferentes: algas verdes (*Chlorophyceae*), algas douradas (*Chrysophyceae*), diatomáceas (*Bacillariophyceae*, *yellow/brown algae*)

e cianobactérias (*Cyanophyceae, blue-green algae*) (Madeira *et al.* 2017). As microalgas são reconhecidas pela sua composição nutricional, sendo algumas ricas em proteínas e, como tal, apontadas como uma potencial alternativa à soja. Para além de ser rica em proteína e aminoácidos essenciais, como lisina e metionina, é uma boa fonte de ácidos gordos, nomeadamente o ácido linoléico. No que diz respeito aos micronutrientes, a microalga é particularmente rica em vitaminas do complexo A (β -caroteno) e minerais. A composição química de cada alga varia com a espécie, meio de cultivo e condições de crescimento (Dolganyuk *et al.* 2020). A sua produção oferece soluções mais sustentáveis, como a produção em diferentes meios, água doce ou salgada, em fotobiorreatores ou mesmo lagos, contribuindo para uma menor necessidade de terra arável. A capacidade fotossintética das microalgas permite a captação de dióxido de carbono, podendo ser cultivadas em zonas industriais, e assim reduzir o efeito estufa. A absorção de compostos como o nitrogénio e o fósforo, auxilia no tratamento das águas residuais (Chaudhary *et al.* 2018). A Espirulina, *Limnospira platensis*, é uma cianobactéria, mas pela sua atividade metabólica é considerada uma alga verde procariótica e apresenta um elevado teor de proteína (Nowicka-Krawczyk *et al.* 2019). Nas últimas décadas esta microalga tem sido a mais produzida mundialmente, sendo que, entre 1950 e 2019, 99,6% do total de microalgas produzidas eram da espécie *Limnospira platensis* (Spínola *et al.* 2022). A tabela 2 apresenta a composição química da microalga Espirulina.

Tabela 2: Composição química da microalga Espirulina (adaptado Spínola *et al.* 2019 e Costa *et al.* 2023)

Nutrientes	<i>Limnospira platensis</i>
Proteína bruta (%)	61,3
Hidratos de carbono (%)	17,8
Gordura Total (%)	5,8
α -Tocoferol (mg/kg)	26,2
Carotenoides totais (mg/kg)	1450
Cinzas (%)	15

2.5 Suplementação das dietas dos frangos com enzimas

A parede celular da Espirulina é rígida e composta por peptidoglicano. As suas membranas tilacoides, complexadas com pigmentos e proteínas, tornam a hidrólise mais difícil devido à robustez da parede celular. Devido à sua composição, não é facilmente degradada pelas enzimas endógenas dos intestinos dos frangos, impedindo a digestão completa e assim diminuindo a biodisponibilidade e bioacessibilidade dos nutrientes. Outra condicionante, é o facto das proteínas que se libertam aquando da

degradação da parede celular da Espirulina, pelas enzimas exógenas, como a lisozima, sofrerem gelatinização, o que impossibilita a completa digestão dos nutrientes, provocando efeitos negativos na performance do frango e o aumento da viscosidade da digesta (Pestana *et al.* 2020). A aplicação de pré-tratamentos físicos, térmicos e químicos à microalga é uma das possíveis soluções para aumentar a extração de proteínas da biomassa da Espirulina (Spínola *et al.* 2023). Os tratamentos mecânicos incluem a moagem e trituração, homogeneização de alta pressão e o uso de ultrassons. Dentro dos tratamentos térmicos, tanto a secagem como o uso de altas temperaturas são alternativas viáveis. A utilização de enzimas exógenas, uso de soluções básicas e choques osmóticos são também alguns exemplos de processos químicos. A utilização combinada de pré-tratamentos auxilia a degradação da parede celular e libertação das proteínas da Espirulina (Costa *et al.* 2023). A aplicação dos pré-tratamentos deve ser feita de acordo com os objetivos e condições da produção. O processo de extrusão associado a um tratamento enzimático é uma das soluções apresentadas (Costa *et al.* 2023). As enzimas contendo proteases, incluído a mistura enzimática pancreatina e tripsina, são usadas para facilitar a digestão das proteínas de difícil digestão devido à formação de complexos com polissacáridos e pigmentos, enquanto as CAZymes (Coelho *et al.* 2019) tem sido utilizada para degradarem os hidratos de carbono da parede celular, e assim permitirem uma maior biodisponibilidade dos nutrientes da microalga. A extrusão, pela ação da temperatura e pressão, leva ao rompimento das ligações da parede celular (Coelho *et al.* 2019).

2.6 Qualidade alimentar e importância dos lípidos

Os lípidos são macromoléculas biológicas compostas por moléculas de carbono, hidrogénio e oxigénio formando estruturas apolares e hidrofóbicas, que se dissolvem em solventes orgânicos. É um grupo de moléculas orgânicas muito heterogéneo com funções diferentes e essenciais para o bom funcionamento do corpo humano (Ahmed *et al.* 2023).

Os ácidos gordos, cadeias com 2 a 24 carbonos, são as unidades básicas dos lípidos e estão normalmente ligados a uma molécula de glicerol, mas podem apresentar-se de forma livre ou esterificados. Os ácidos gordos (AG) podem ser classificados como ácidos gordos saturados (SFA) que não apresentam ligações duplas ou ácidos gordos insaturados com 1 (AG monoinsaturados) ou várias ligações duplas (AG polinsaturados) (Lichtenstein 2023). Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são divididos em 2 famílias (ómega-3 e ómega-6). Os PUFA da família ómega-6 (*n*-6), têm funções essenciais para a manutenção da barreira cutânea e a hidratação da pele e regula a resposta pró-inflamatória. Os PUFA da família ómega-3 (*n*-3) são essenciais para

resposta anti-inflamatória e para o desenvolvimento cognitivo. A proporção ideal entre ácidos gordos *n*-6 e *n*-3 na alimentação deve situar-se entre 1:1 e 2:1, garantindo um equilíbrio metabólico favorável e reduzindo o risco de complicações associadas ao consumo desregulado desses lípidos essenciais, mantendo a resposta inflamatória e trombótica eficiente (Djuricic & Calder 2021).

Os PUFA da família ómega-3 (*n*-3), especialmente o ácido α -linolénico, (18:3*n*-3, α -LA) é um AG essencial, não sintetizado pelos humanos por isso deve ser obtido pela dieta. A etapa limitante na biossíntese destes AG ocorre durante a ação das enzimas dessaturases delta-5 (Δ 5) e delta-6 (Δ 6), que catalisam a introdução de ligações duplas na estrutura lipídica. No organismo, o ácido linoleico é metabolizado em ácido araquidónico (AA, cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico, 20:4*n*-6), enquanto o ácido alfa-linolénico (ALA) é convertido em ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosa-hexaenoico (DHA) (Simopoulos, 2002).

Os AG monoinsaturados (MUFA) estão relacionados com a diminuição dos níveis de colesterol no sangue, transportado pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), melhoram o perfil lipídico, reduzindo o risco de doenças cardíacas. Contrariamente, os SFA que são hipercolesterolémicos, nomeadamente o ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0) e ácido palmítico (16:0), aumentam o risco de doenças cardiovasculares ao favorecer a formação de coágulos sanguíneos (Whitney & Rolfes 2010).

Os compostos antioxidantes têm grande importância na saúde humana (prevenção de doenças cardiovasculares, cancro e da integridade da pele) e na qualidade dos alimentos (impedindo a sua deterioração e perda de qualidade nutricional). Os antioxidantes ligam-se aos radicais livres resultante da degradação dos compostos, neutralizando-os, e impedindo que a reação se propague (Domínguez *et al.* 2019). A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel e é considerada um composto antioxidante natural presente nas membranas e nas gorduras. Os tocoferóis e os tocotrienóis (α -, β -, γ -, δ -) são homólogos desta vitamina. A forma α -Tocoferol é a forma mais biologicamente ativa e que se apresenta em maior quantidade na carne. Os carotenoides, especificamente o β -caroteno, são precursores da vitamina A e estão presentes em alimentos amarelos, laranjas e verdes, como as algas. O β -caroteno pode ser utilizado como pigmento natural e apresenta várias funções nos tecidos, como prevenção da saúde ocular, do envelhecimento da pele e reforço do sistema imunitário reduzindo o risco de cancro (Swapnil *et al.* 2021). O β -caroteno tem propriedades antioxidantes cooperativas, impedindo a oxidação lipídica das membranas das células. São necessários mais estudos para esclarecer a sua interação com outros compostos e o seu papel na saúde humana.

A oxidação lipídica influencia a qualidade sensorial da carne (como o sabor, cor, textura, odor, etc.), a vida útil do produto e o seu valor nutricional (perda de vitaminas e ácidos gordos essenciais). A composição lipídica (grau de saturação), as condições de armazenamento (luz, oxigénio e temperatura) e os níveis de antioxidantes naturais presentes nos alimentos, como o α -tocoferol e o β -caroteno, influenciam a estabilidade oxidativa. Os *off-flavours*, a rancificação e a formação de compostos nocivos, e consequentemente a perda de valor nutricional, são consequências da deterioração dos alimentos e um dos problemas da indústria alimentar (Domínguez *et al.* 2019).

2.7 Segurança da carne de frango enriquecida com microalgas e aceitabilidade do consumidor

A segurança e aceitabilidade dos frangos alimentados com a *Espirulina* são preocupações da EFSA (*European Food Safety Authority*) e das indústrias alimentares. Ainda que as algas sejam alimentos considerados seguros, podem conter metais pesados considerados perigosos para a saúde que se vão acumular na carne dos frangos, sendo por isso necessária uma avaliação cuidada antes da sua introdução nas rações. Além disso, a carne dos frangos alimentados com microalgas tem uma tonalidade mais amarela/laranja que pode afetar a perceção de qualidade e aceitabilidade dos consumidores, condicionando assim o sucesso da sua comercialização (Altmann *et al.* 2023). No entanto, esta perceção pode ser transformada com uma comunicação estratégica e clara, que informe os consumidores sobre a origem e os benefícios desta carne, aumentando assim a aceitação e o valor percebido do produto.

3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da incorporação de uma alta concentração (15%) da microalga *Espirulina (L. platensis) per se* e extrudida na dieta de frangos de carne na fase final de crescimento, associada à suplementação com enzimas exógenas (mistura de pancreatina e lisozima), sobre a qualidade e a estabilidade oxidativa da carne. A inclusão de *Espirulina* extrudida na alimentação, em conjunto com a mistura enzimática, teve como intuito aumentar a digestibilidade e o aproveitamento nutricional deste ingrediente. Em particular, será analisado a composição lipídica da carne de frango, incluindo a composição de ácidos gordos, teor de colesterol, presença de vitamina E e carotenoides nas partes do peito e da coxa de frango, assim como a estabilidade oxidativa da carne no peito. Adicionalmente, avalia-se o impacto da suplementação enzimática relativo ao desempenho de crescimento, as características da carcaça e os parâmetros de qualidade da carne em frangos de corte durante a fase de finalização.

Especificamente, o estudo procurou analisar os efeitos desses tratamentos em parâmetros como a oxidação lipídica, a capacidade antioxidante, o perfil lipídico e o teor de pigmentos na carne dos frangos. As atividades experimentais foram realizadas ao longo de diferentes fases entre outubro de 2023 e julho de 2024. O ensaio experimental com os frangos ocorreu entre outubro e dezembro de 2023, seguido pelo abate e colheita de amostras, realizadas no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa (ISA-ULisboa). As análises laboratoriais das amostras de carne foram conduzidas na Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) entre janeiro e maio de 2024. Por fim, a elaboração da presente Dissertação de Mestrado foi concluída entre junho e julho de 2024.

4. MATERIAL E METÓDOS

A metodologia adotada neste estudo está em conformidade com as diretrizes nacionais e da União Europeia para o uso ético de animais em investigação. A Comissão de Ética do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da FMV, Lisboa, e o Comité de Cuidados com Animais da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Lisboa, aprovaram os protocolos dos ensaios. O Comité de Bem-Estar Animal (ORBEA) do ISA da Universidade de Lisboa concedeu aprovação adicional, atribuindo o código de protocolo 0421/000/000/2022.

4.1 Delineamento experimental

Para a realização do estudo, no ISA, utilizaram-se 120 pintos machos, com um dia de idade e pertencentes à linhagem Ross 308, as aves foram obtidas da Pinto Valouro (Leiria, Portugal). Os animais foram pesados, com um peso corporal médio inicial de $44,4 \pm 2,82$ g (média \pm desvio padrão), anilhados e alojados aleatoriamente em 40 gaiolas, 3 aves por gaiola. Cada gaiola apresentava um piso de arame e média 56 cm de altura, 56 cm de comprimento e 50 cm de largura. O alojamento tinha ambiente controlado por uma câmara climática, com iluminação, ventilação e temperatura ideais. A humidade relativa foi mantida entre 60 e 70%. A temperatura e a ventilação foram monitorizadas do dia 1 ao dia 35 para garantir condições ótimas e uniformidade nas gaiolas. Todas as gaiolas estavam equipadas com dois bebedouros tipo *nipple* e um comedouro para garantir acesso *ad libitum* à água e à alimentação para os pintos. A formulação de cada dieta experimental estava de acordo com a recomendação nutricional fornecida pelo Conselho Nacional de Investigação (NRC 1994).

Foram realizados registos diários e semanais da quantidade de alimento fornecido e consumido, e do peso dos animais, para o cálculo dos indicadores de crescimento e eficiência alimentar. Com estes dados, foi possível determinar o consumo médio diário de dieta (consumo total de alimento dividido por 7 dias), o ganho médio diário de peso corporal (ganho de peso semanal dividido por 7 dias) e o índice de conversão alimentar (consumo total semanal de alimento dividido pelo ganho de peso semanal). Morreu apenas uma ave, resultando numa taxa de mortalidade de 0,83%.

O período experimental foi de 35 dias, sendo que nos primeiros 21 dias, os animais foram alimentados com uma dieta de crescimento equilibrada e adequada às necessidades nutricionais dos pintos, formulada à base de soja e milho. A partir do dia 21 até ao dia 35 foram administradas 4 dietas experimentais ($n=10$): controlo (CTR), dieta basal contendo soja e milho; 15% de Espirulina *per se* (SP) adicionada à dieta basal; 15% de Espirulina extrudida (SPEX) na dieta de base; 15% de Espirulina

extrudida e uma mistura enzimática (SPEZ) - 0,20% de extrato de pancreatina suína (Merck; Darmstadt, Alemanha) e 0,01% de lisozima derivada da clara de ovo de galinha (SIGMA-ALDRICH; Missouri, USA) ambas incorporadas na dieta basal. A microalga usada foi a *Espirulina*, *L. platensis*, adquirida na Allmicroalgae (Pataias, Portugal), em pó *per se*. A composição da mistura enzimática inclui um extrato de pancreatina suína (350 FIP-U/g para peptidase, 6000 FIP-U/g para lipase e 7500 FIP-U/g para amilase) e de lisozima (com uma atividade enzimática de 70000 U/mg). A extrusão da microalga foi realizada pela empresa Sparos (Olhão, Algarve, Portugal). Iniciou-se o processo de extrusão a 118 °C e 34 bares por 3 a 7 segundos.

A tabela 3 apresenta os ingredientes e a composição nutricional de cada dieta e da microalga. A determinação de proteína bruta (pelo método de Kjeldahl), gordura bruta (extração em éter de petróleo num extrator Soxhlet automático), energia bruta (usando um calorímetro) e cinzas das dietas foram feitas de acordo com procedimento da AOAC (2000). As dietas foram submetidas a um processo de secagem a 103 °C para a determinação do teor de matéria seca. A composição nutricional da microalga foi determinada de maneira semelhante as dietas, à exceção da determinação de gordura bruta, feita de acordo com o método de Folch (1957).

Tabela 3: Composição nutricional das dietas e da microalga *Espirulina*

Microalga			Dietas			
	Espirulina	Espirulina Extrudida	CTR	SP	SPEX	SPEZ
Ingredientes (%)						
Milho	-	-	51,5	59,8	61,4	61,4
Bagaço de soja	-	-	40,1	20,6	19,2	19,2
Óleo de girassol	-	-	4,90	1,50	1,27	1,27
Cloreto de sódio	-	-	0,38	0,40	0,40	0,40
Carbonato de cálcio	-	-	1,07	1,39	1,38	1,38
Fosfato bicálcico	-	-	1,59	0,88	0,87	0,87
DL-Metionina	-	-	0,10	0,02	0,03	0,03
L-Lisina	-	-	-	-	0,04	0,04
Vitamin-mineral premix ¹	-	-	0,4	0,4	0,4	0,4
Espirulina em pó	-	-	-	15,0	-	-
Espirulina extrudida em pó	-	-	-	-	15,0	15,0
Pancreatina	-	-	-	-	-	0,20

Lisozima	-	-	-	-	-	0,01
Análise Proximal						
Energia Bruta, kcal/kg MS (matéria seca)	4476	4504	4626	4406	4407	4404
Proteína bruta, % MS	52,5	53,7	23,1	23,5	22,8	23,0
Gordura bruta, % MS	6,56	5,81	8,66	5,52	4,76	4,61
Humidade	5,2	1,6	10,7	10,4	10,0	10,1
Composição de ácidos gordos, % ácidos gordos totais						
14:0	0,43	0,39	0,07	0,10	0,10	0,10
16:0	39,7	49,5	9,49	15,1	15,8	15,6
16:1c9	4,95	4,34	0,12	0,72	0,81	0,78
17:0	0,41	0,45	0,06	0,12	0,13	0,12
17:1c9	1,88	1,60	0,00	0,12	0,25	0,24
18:0	1,75	1,68	3,13	2,65	2,57	2,64
18:1c9	6,34	5,32	29,1	27,3	26,8	26,8
18:1c11	3,47	2,86	0,77	1,09	1,13	1,11
18:2n-6	17,8	15,0	53,9	46,9	46,1	46,4
18:3n-6	0,23	0,13	0,16	0,13	0,14	0,13
18:3n-3	15,8	12,0	1,53	3,08	3,41	3,35
20:0	0,19	0,20	0,34	0,39	0,40	0,41
20:1c11	0,91	0,03	0,19	0,20	0,20	0,20
22:0	0,25	0,29	0,59	0,39	0,37	0,37
Composição de vitaminas lipossolúveis (µg/g)						
α-Tocoferol	29,5	12,5	72,9	40,0	22,5	38,2
α-tocotrienol	-	-	4,85	4,50	3,53	5,38
γ-tocoferol+β-tocotrienol	-	-	5,39	4,67	4,50	4,79
β-Tocoferol	-	-	0,58	0,34	0,30	0,32
δ -Tocoferol	-	-	1,31	0,86	0,77	0,87
Pigmentos (µg/g)						
β-Caroteno	243	78,0	1,09	86,5	37,8	53,1
Clorofila a	866	1467	0,97	428	167	210
Clorofila b	191	1189	1,68	94,0	137	146

Total de clorofilas	1057	2656	2,65	522	303	356
Total de carotenoides	243	154	1,73	101	29	43

CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); ¹A pré-mistura da dieta consiste, por Kg, em ácido pantotênico, vitamina D3, cianocobalamina, ácido fólico, vitamina K3, ácido nicotínico, vitamina B6, vitamina A, vitamina B1, vitamina E, vitamina B2, cobre, ferro, iodo, manganês, selênio e zinco.

No 35º dia, o último dia do ensaio, o animal com o peso médio de cada gaiola foi selecionado para o abate. A insensibilização foi feita por eletronarcolese, sucedida por destroncamento do pescoço e finalmente, o sangramento. Após o abate, recolheram-se amostras dos músculos peitorais e da coxa, para determinação da qualidade da carne. As amostras de carne foram conservadas a -20 °C para posterior análise, à exceção das amostras utilizadas para a avaliação da oxidação lipídica, conservadas a -80 °C.

4.2 Determinação de pH e cor

A determinação do pH e da cor da carne permite avaliar a qualidade da carcaça. Retirou-se os ossos e a pele do músculo da coxa e do peito dos frangos. As amostras estiveram em arrefecimento durante 24 horas *post-mortem*, a 4 °C, seguido de uma hora de exposição ao ar para estabilização das mesmas. Realizaram-se três medições em 3 zonas diferentes do músculo para garantir a fiabilidade dos resultados obtidos. A cor das amostras foi avaliada com o colorímetro Minolta CR-300 Chromameter (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japão), que utiliza o espaço de cor CIELAB para medir a luminosidade (L*), vermelho (a*) e amarelo (b*). Os níveis de pH foram determinados com o uso de um elétrodo de penetração de vidro, modelo HI9025 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA), como descrito por Pestana (2020).

4.3 Determinação da oxidação lipídica

A estabilidade oxidativa da carne de peito de frango foi avaliada pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, reage com o TBA formando um composto cromogénico rosado, que serve como indicador do nível de peroxidação e avalia o stress oxidativo na carne ao longo do tempo. Utilizou-se um método espectrofotométrico descrito por Mercier *et al.* (2004) para quantificação deste composto. A leitura da absorvência foi feita num comprimento de onda específico de 532nm utilizando um espectrofotómetro UV/Visível (Genesys 150, Thermo Scientific, Madison, EUA). As amostras de carne foram inicialmente envolvidas em papel de alumínio e acondicionadas em sacos plásticos, sendo posteriormente expostas ao ar e armazenadas a 4 °C. A avaliação da estabilidade oxidativa foi realizada em 2 períodos:

no dia 0 e no dia 8, a partir do início do armazenamento. O procedimento consiste em pesar 1,5g de carne para 2 tubos (duplicado) de 50mL e adicionou-se 1mL da solução aquosa de ácido etilendiamina tetra-acético (EDTA) a 0,3%, 5 mL de hidroxitolueno butilado (BHT) em n-hexano a 0,8%, 8 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, agitando com cuidado. Seguidamente, homogeneizou-se a suspensão com Ultra-Turrax (haste S25N-10G), sobre gelo, durante 30 segundos (3x10") a 20000 rpm e centrifugou-se o homogeneizado durante 5 minutos, a 1900 g e 5 °C (Hearaeus, Biofuge 28 RS, Netherlands). Logo após, descartou-se a fase superior (n-hexano) e o volume restante foi filtrado através de um filtro Whatman nº 1 (125 mm, Whatman, VWR, Portugal) para um tubo graduado de 15mL. O volume do filtrado foi ajustado para 10 ml com a solução de TCA a 5% e agitado. A fase seguinte consistiu em retirar 3 ml da mistura anterior para um tubo de vidro de 16 ml e adicionar 2 ml de TBA a 0,8%. A seguir, incubou-se a mistura em banho-maria a 70 °C por 30 minutos, com leve agitação. No fim da reação, os tubos foram arrefecidos em água. Finalmente, a mistura foi transferida para cuvettes de plástico transparente e leram-se as absorvências em função do branco (3 ml de TCA 5% + 2 ml de TBA 0,8%). Os resultados foram expressos e. As amostras utilizadas ficaram armazenadas em frio positivo, 4 °C, para repetição deste procedimento no dia 8. A quantificação dos TBARS foi feita a partir de uma curva de calibração utilizando o padrão externo 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Fluka, Neu Ulm, Alemanha).

4.4 Determinação do teor de lípidos totais e composição do perfil de ácidos gordos

As amostras de carne de peito e coxa foram previamente pesadas, congeladas por 24 horas a -20 °C e, finalmente, liofilizadas por 48 horas a -55 °C para a determinação do teor de lípidos totais e da composição de ácidos gordos. O método desenvolvido por Folch *et al.* (1957) foi utilizado e é composto por duas fases combinadas: a extração (com uma solução de diclorometano e metanol na proporção de 2:1) e a transesterificação (conversão dos ácidos gordos em ésteres metílicos). O procedimento exigiu a preparação de material, por isso balões de fundo redondo foram colocados na estufa a 70 °C durante a noite para serem tarados. Em seguida, foram arrefecidos por 1 hora no exsiccador e, finalmente, pesados. A extração e quantificação dos lípidos totais iniciou-se com a pesagem de 0,150 g de músculo liofilizado para um tubo de vidro de 16mL, adicionando-se 1,5 mL de metanol e deixando-se humedecer por 5 minutos. A mistura foi agitada por 10 segundos no vórtex e colocada no banho de ultrassons (Grant, modelo MXB14; Grant Instruments, Cambridge, Inglaterra) por 5 minutos a 30°C, agitando sempre a mistura na metade do tempo. Para aumentar a o rendimento da reação, fizeram-se 3 extração consecutivas. A primeira extração iniciou-

se com a adição de 3 mL de diclorometano à mistura inicial, agitou-se no vórtex por 10 segundos e incubou-se no banho ultrassons, durante 10 minutos a 30°C. Seguidamente, a mistura foi centrifugada (Gyrozen, 1580R, USA) durante 5 min a 2500 rpm. O solvente foi separado da fase sólida através da filtração da mistura com um filtro Whatman nº 1 (125 mm, Whatman, VWR, Portugal) para um novo tubo de vidro de 16mL. Logo depois, iniciou-se a segunda extração, adicionando à fase sólida 4,5 mL de diclorometano: metanol (2:1), agitou-se no vórtex por 10 segundos e incubou-se no banho ultrassons, durante 10 minutos a 30°C. Centrifugou-se durante 5 min a 2500 rpm e filtrou-se a mistura novamente para o tubo de vidro novo. Este passo foi repetido mais uma vez. Ao filtrado obtido, adicionou-se 2,7 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) a 0,8%, agitou-se no vórtex (10 seg) e centrifugou-se (5 min a 2500 rpm). Depois, descartou-se o sobrenadante e o filtrado foi colocado no balão previamente tarado, com a ajuda de um funil e um filtro separador de fases Whatman (90mm, VWR, Portugal). O solvente foi evaporado num rotoevaporador (VWR, IKA RV 10) a 40 °C e o resíduo lipídico resultante secou-se na estufa durante 2 horas a 40 °C. Finalmente, arrefeceu-se o balão durante 1 hora no exsiccador e pesou-se o balão para determinar o teor lípidos totais. Para garantir a confiabilidade dos resultados cada amostra foi feita em duplicado e utilizou-se a média das pesagens. Os resultados foram apresentados em g de lípidos /100g de carne. A composição do perfil de ácidos gordos foi determinada por transesterificação que transforma os ácidos gordos na sua forma de ésteres metílicos (FAME). O processo inicia-se com a dissolução do resíduo lipídico num 1mL de tolueno, com agitação no vórtex. Transferiu-se a solução para um tubo de vidro de 16mL e adicionou-se 200 µl do padrão interno C21:0 (ácido heneicosáenóico metilado, 1mg/ml em n-hexano de grau cromatográfico) e 3mL de metóxido de sódio. O tubo foi agitado novamente no vórtex por 10 segundos e colocado num banho-maria a 50 °C durante 30 minutos. Após o arrefecimento da solução em água ou gelo, adicionaram-se mais 2 mL de ácido clorídrico, e o tubo foi novamente incubado no banho-maria a 80 °C por 15 minutos. Estas etapas correspondem a fases de metilação, respetivamente. Simultaneamente, em novos tubos de vidro de 16 mL, pesou-se 0,5g de sulfato de sódio anidro e carvão para amostras pigmentadas. No final da reação, adicionou-se 2mL de carbonato de potássio para neutralizar a solução, e agitou-se no vórtex por 10 segundos. Foram ainda adicionados 3mL de n-hexano à solução, seguido de agitação no vórtex por 1 minuto e centrifugação durante 5 minutos a 2500rpm. Seguidamente, transferiu-se a fase orgânica (sobrenadante) para os novos tubos de vidro previamente preparados e fez-se mais uma centrifugação nas mesmas condições. Finalmente, o solvente foi evaporado sob uma corrente de azoto (Stuart, SBH200D/3, Block Heater) a 37 °C, e o resíduo resultante foi ressuspenso em 1 mL de n-hexano para um vial de cromatografia

de fase gasosa (GC).

A análise dos FAME foi realizada por GC com o equipamento 7890A, Agilent Technologies, California, USA. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar Supelcowax[®] TM10 (30 m; 0,20 mm de diâmetro interno; 0,20 mm de espessura capilar) e um detetor de ionização de chama (FID), utilizando o hélio como gás de arraste. As condições de corrida definidas foram as seguintes: 250 °C e 280 °C como temperaturas do injetor e do detetor, respectivamente; o fluxo de 1mL/minuto; início da corrida a 50 °C e aumento de 4 °C por minuto até atingir a 275 °C. A identificação e quantificação dos FAME foi feita com recurso a um padrão interno C21:0 (1mg/ml em n-hexano; FAME mix of 37 components, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) permitindo a comparação dos tempos de retenção dos picos dos ácidos gordos e da conversão das áreas relativas dos picos em concentração, respetivamente. Os resultados foram expressos em % do total de ácidos gordos.

4.5 Determinação do teor de colesterol, vitaminas lipossolúveis e β -caroteno

A separação, identificação e quantificação do colesterol total, dos homólogos da vitamina E e β -caroteno foram realizadas nas amostras de carne de peito e coxa, de acordo com o método descrito por Prates *et al.* (2006). Este método baseia-se na saponificação direta dos lípidos e numa extração com n-hexano. As amostras foram preparadas em duplicado e utilizou-se um padrão externo (curva-padrão: área dos picos em relação à concentração), para garantir a fiabilidade dos resultados. Inicialmente, pesaram-se 0,750 g de carne fresca e 0,20 g de ácido ascórbico em tubos de vidro de 16mL. Em simultâneo, preparou-se a solução de saponificação (55% etanol absoluto com 11% hidróxido de potássio e 45% de água destilada) e adicionaram-se 5,5mL desta solução aos tubos com as amostras. Agitaram-se os tubos imediatamente para evitar aglomeração das amostras, o ar nos tubos foi substituído por azoto para criar uma atmosfera antioxidante, e os tubos foram novamente agitados no vórtex durante 1 minuto. Seguidamente, os tubos foram incubados em banho-maria a 80°C durante 15 minutos com agitação, promovendo a saponificação. Após a reação, os tubos foram arrefecidos em água fria. Em novos tubos de vidro de 16mL, pesaram-se 0,5g de sulfato de sódio anidro. No passo seguinte, adicionaram-se 1,5 mL de água destilada e 3 mL de n-hexano nos tubos com as amostras, que foram agitados vigorosamente no vórtex por 2 minutos. Após uma centrifugação durante 5 minutos a 2500rpm, aspirou-se a fase sobrenadante (n-hexano) para os tubos com anidro, agitou-se novamente no vórtex e, em seguida, centrifugou-se por 2 minutos a 2500 rpm. Finalmente, uma alíquota da fase superior foi filtrada através de um filtro hidrofóbico de 0,45 μ m (Sigma-Aldrich, MI, EUA)

para um vial âmbar de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de modo a evitar os efeitos da luz. A análise simultânea dos compostos foi realizada num cromatógrafo líquido (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) em fase normal, numa coluna Agilent Zorbax RX-Sil (25 cm de comprimento; 5 µm de tamanho das partículas; 4,6 mm de diâmetro interno; duração da corrida de 17 minutos a 20 °C). O HPLC estava equipado com um detetor de fluorescência (para a deteção e quantificação da vitamina E) e 2 detetores de díodo UV-VIS (para a identificação e quantificação do colesterol a 202 nm e do β-caroteno a 450 nm).

4.6 Determinação do teor de pigmentos

O método descrito por Hynstova (2018) e modificado por Pestana (2020) foi aplicado para a determinação de carotenoides. O procedimento iniciou-se com a pesagem de 2 g das amostras de carne de peito e coxa fresca em tubos de plástico de 50mL, aos quais se adicionou 4mL de acetona. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada com o Ultra-Turrax (haste S25N-10G) sobre gelo, por 30 segundos (3x10") a 20000 rpm, e o homogeneizado foi centrifugado durante 10 minutos a 3.500 rpm (Hearaeus, Biofuge 28 RS, Netherlands). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL e novamente centrifugado (Eppendorf, MiniSpin) a 12000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, verteu-se o conteúdo do eppendorf para cuvettes BRAND, específicas para acetona, e as leituras foram realizadas a 470 nm num espectrofotómetro UV/Visível (Genesys 150, Thermo Scientific, Madison, EUA). Os resultados foram expressos µg/100 g de carne.

4.7 Análise estatística

A unidade experimental considerada para a determinação dos parâmetros de qualidade e estabilidade oxidativa da carne foi a gaiola. A análise estatística foi efetuada no software SAS (Institute Inc., Cary, NC, USA). Utilizou-se o General Linear Models (GLM) para a análise estatística das determinações (a dieta administrada corresponde ao fator fixo do modelo), exceto a oxidação lipídica da carne que foi analisada pelo modelo PROC MIXED, de modo a considerar a variável dependente de tempo. Aplicou-se o teste PDIFF ajustado ao método Tukey-Kramer, a fim de comparar as médias entre os diferentes grupos experimentais. Considerou-se diferenças significativas quando $p < 0,05$ e os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Performance de crescimento e eficiência alimentar

A tabela 4 apresenta os resultados referentes a performance de crescimento e eficiência alimentar dos frangos, do dia 21 ao dia 35, em função das diferentes dietas.

Tabela 4: Resultados referentes a performance de crescimento e eficiência alimentar (dia 21 ao dia 35) em função das diferentes dietas

	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	<i>p</i>
Peso do animal (g)						
Dia 21	780	777	775	779	16,1	0,996
Dia 28	1187 ^a	988 ^b	1055 ^b	1081 ^b	24,9	<0,001
Dia 35	1577 ^a	1337 ^c	1432 ^{bc}	1476 ^{ab}	33,0	<0,001
Ganho de peso corporal (g)						
Dia 21 - 28	58,2 ^a	30,2 ^c	40,0 ^{bc}	43,1 ^b	2,57	<0,001
Dia 28 - 35	57,0	49,8	54,0	56,4	3,35	0,421
Dia 21 - 35	57,3 ^a	40,0 ^c	47,0 ^{bc}	49,7 ^b	1,91	<0,001
Média de consumo diário (g/animal)						
Dia 21 - 28	290 ^a	212 ^b	270 ^a	272 ^a	7,95	<0,001
Dia 28 - 35	344	314	334	345	8,30	0,06
Dia 21 - 35	317 ^a	263 ^b	302 ^a	309 ^a	7,30	<0,001
Índice de conversão alimentar						
Dia 21 - 28	1,70 ^b	3,08 ^a	2,36 ^{ab}	2,32 ^{ab}	0,332	0,048
Dia 28 - 35	2,14	2,18	2,28	2,36	0,226	0,893
Dia 21 - 35	1,90 ^b	2,31 ^a	2,24 ^a	2,13 ^{ab}	0,075	0,003

^{abc} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média)

Todos os animais começaram a fase experimental (dia 21) nas mesmas condições, visto que, os pesos iniciais são semelhantes e não apresentam diferenças estatísticas significativas ($p=0,996$). No dia 28, os frangos do grupo CTR tinham um peso maior comparado com os animais dos grupos suplementados com Espirulina ($p<0,001$). No dia 35, os pesos dos animais dos grupos CTR e SPEZ são semelhantes, sendo o peso dos animais do grupo CTR significativamente maior que os dos grupos SP e SPEX ($p<0,001$). Os frangos do grupo CTR apresentaram maior ganho de peso corporal, comparado com o grupo SP, SPEX e SPEZ, entre os dias 21 e 35 ($p<0,001$), mas a partir do dia 28 não se encontram diferenças significativas ($p=0,421$). O peso e o ganho de peso semanal dos animais do grupo SP apresentam valores inferiores aos

restantes grupos. A média de consumo diário também é superior no grupo CTR, comparado com as dietas suplementadas com Espirulina ($p < 0.001$), ainda que a partir do dia 28 a média de consumo diário seja semelhante em todos os grupos ($p = 0.06$). O índice de conversão alimentar apresenta diferenças significativas ($p = 0.003$), entre os dias 21 e 35, onde o grupo CTR apresenta um índice mais baixo, embora não tendo sido significativamente diferente do grupo SPEZ. Os grupos SPEX e SPEZ apresentam índices numericamente inferiores aos do grupo SP. No dia 28, as diferenças entre tratamentos não foram significativas ($p = 0.893$).

5.2 pH e cor

Os resultados apresentados na tabela 5 demonstram os valores de pH e a cor das amostras de carne em função das diferentes dietas administradas.

Tabela 5: Resultados de pH e cor das amostras de peito e coxa de frango em função das diferentes dietas

	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	<i>p</i>
Coxa						
pH	5,88	5,82	5,85	5,75	0,043	0,166
L*	47,1	46,2	45,5	47,4	0,599	0,132
a*	6,72	6,02	5,56	5,58	0,456	0,313
b*	8,21 ^b	11,8 ^a	12,8 ^a	12,8 ^a	0,386	<0,001
Peito						
pH	5,71	5,66	5,71	5,69	0,024	0,453
L*	60,6	58,9	57,4	59,9	1,01	0,141
a*	5,10 ^{ab}	5,66 ^a	4,92 ^{ab}	4,33 ^b	0,271	0,011
b*	9,10 ^b	17,3 ^a	17,3 ^a	17,8 ^a	0,801	<0,001

^{ab} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média)

Os valores de pH determinados nas amostras de carne não apresentam diferenças significativas entre as dietas administradas ($p > 0.05$). As carnes de coxa não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) nos parâmetros *L** (luminosidade) e *a** (vermelho). A carne de peito, igualmente, não apresenta diferenças na luminosidade, mas no parâmetro *a** existem diferenças significativas ($p = 0.011$). O parâmetro *b** (amarelo) exibiu diferenças significativas, tanto na coxa quanto no peito ($p < 0.001$). A dieta CTR apresentou valores menores de *b** em comparação com as dietas incorporadas com Espirulina. A figura 1 ilustra a cor do peito e da coxa dos frangos,

respetivamente, alimentados com as dietas suplementadas com Espirulina e com a dieta controlo.



Figura 1: Cor da carne de peito e coxa de frangos alimentados com dieta controlo e dietas suplementadas com Espirulina

5.3 Oxidação lipídica da carne

Na tabela 6 estão representados os resultados referentes a oxidação lipídica da carne do peito em função das diferentes dietas administradas e diferentes períodos, dia 0 e dia 8.

Tabela 6: Resultados da oxidação lipídica da carne de peito em função das diferentes dietas e períodos

	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	<i>p</i>		
						dieta	período	dieta*período
	Malonaldeído, mg/kg							
Dia 0	0,22	0,076	0,25	0,17	0,106	0,733	0,007	0,361
Dia 8	0,28	0,86	0,6	0,65	0,215			

CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média)

Conforme esperado, no dia 0 os níveis de MDA foram relativamente baixos e semelhantes entre os grupos. No entanto, no dia 8, houve um aumento significativo nos níveis de MDA ($p=0.007$) na dieta CTR e nas dietas suplementas com Espirulina, como previsto. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de MDA entre a dieta controlo e as dietas suplementadas com Espirulina ($p=0.733$), indicando que a adição de Espirulina à dieta não influenciou os níveis de oxidação. Apesar dessa alteração temporal, não houve interação significativa entre a dieta e o tempo (dieta*período, $p=0,361$), o que sugere que os tratamentos alimentares não influenciaram de forma diferente a taxa de oxidação ao longo do período de armazenamento.

5.4 Teor de lípidos totais e composição do perfil de ácidos gordos

Os resultados referentes ao teor de lípidos totais e a composição de ácidos gordos estão presentes nas tabelas 7 e 8. As tabelas 7 e 8 também descrevem os

índices nutricionais e os somatórios parciais. Estes resultados são referentes às amostras retiradas do peito e da coxa dos frangos.

Tabela 7: Teor de lípidos totais e composição de ácidos gordos do peito em função das diferentes dietas

Dietas	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	p
Lípidos totais (g/100g de carne)						
Peito	1,63	1,20	1,30	1,47	0,131	0,112
Composição de ácidos gordos (% total de AG)						
12:0	0,032	0,044	0,048	0,038	0,0042	0,072
14:0	0,27 ^b	0,35 ^a	0,40 ^a	0,38 ^a	0,014	<0,001
14:1c9	0,022 ^b	0,045 ^a	0,046 ^a	0,045 ^a	0,0039	<0,001
15:0	0,089 ^b	0,106 ^a	0,100 ^{ab}	0,106 ^a	0,0041	0,017
16:0	14,3 ^b	19,0 ^a	19,8 ^a	19,7 ^a	0,37	<0,001
16:1c7	0,42	0,47	0,51	0,51	0,025	0,051
16:1c9	0,74 ^b	1,46 ^a	1,76 ^a	1,77 ^a	0,116	<0,001
17:0	0,17 ^b	0,28 ^a	0,26 ^{ab}	0,27 ^a	0,023	0,008
17:1c9	0,016 ^b	0,022 ^b	0,036 ^{ab}	0,051 ^a	0,0061	0,001
18:0	8,80 ^b	10,2 ^a	9,63 ^{ab}	9,47 ^{ab}	0,291	0,016
18:1c9	26,8	26,1	27,7	28,0	0,87	0,405
18:1c11	1,15 ^b	1,71 ^a	1,77 ^a	1,71 ^a	0,054	<0,001
18:2n-6	35,8 ^a	25,8 ^b	25,0 ^b	25,2 ^b	0,70	<0,001
18:3n-6	0,137 ^a	0,090 ^b	0,089 ^b	0,091 ^b	0,0035	<0,001
18:3n-3	0,74 ^c	0,74 ^{bc}	0,90 ^{ab}	0,97 ^a	0,042	<0,001
20:0	0,13	0,12	0,12	0,14	0,020	0,797
20:1c11	0,22 ^b	0,24 ^{ab}	0,25 ^a	0,26 ^a	0,007	0,001
20:2n-6	0,51	0,51	0,46	0,48	0,038	0,783
20:3n-6	0,51 ^b	0,80 ^a	0,74 ^a	0,74 ^a	0,042	<0,001
20:4n-6	4,44	5,57	4,55	4,32	0,407	0,131
20:3n-3	0,028 ^b	0,043 ^a	0,041 ^{ab}	0,039 ^{ab}	0,0037	0,026
20:5n-3	0,033 ^b	0,078 ^a	0,081 ^a	0,077 ^a	0,0066	<0,001
22:0	0,075	0,088	0,078	0,067	0,0053	0,070
22:1n-9	0,036	0,048	0,061	0,050	0,0107	0,447
22:5n-3	0,30 ^b	0,50 ^a	0,47 ^a	0,44 ^{ab}	0,040	0,006
22:6n-3	0,22 ^b	0,38 ^a	0,34 ^{ab}	0,34 ^{ab}	0,035	0,012
23:0	0,098	0,149	0,126	0,104	0,0138	0,050
Outros	3,82 ^b	5,01 ^a	4,68 ^{ab}	4,61 ^{ab}	0,257	0,018
Somatório						
SFA	24,0 ^b	30,4 ^a	30,6 ^a	30,3 ^a	0,53	<0,001
MUFA	29,4	30,1	32,1	32,4	1,00	0,108
PUFA	42,7 ^a	34,6 ^b	32,6 ^b	32,7 ^b	0,95	<0,001
n-6 PUFA	41,4 ^a	32,8 ^b	30,8 ^b	30,8 ^b	0,88	<0,001
n-3 PUFA	1,31 ^b	1,74 ^a	1,83 ^a	1,87 ^a	0,080	<0,001
Índices dos ácidos gordos						
PUFA/SFA	1,79 ^a	1,14 ^b	1,08 ^b	1,09 ^b	0,044	<0,001
n-6/n-3	31,9 ^a	19,1 ^b	16,9 ^b	16,7 ^b	0,67	<0,001

^{ab} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média)

Tabela 8: Teor de lipídios totais e composição dos ácidos gordos da coxa em função das diferentes dietas

Dietas	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	p
Lípidos Totais (g/100g de carne)						
Coxa	3,13 ^a	2,21 ^b	2,74 ^{ab}	2,78 ^{ab}	0,187	0,013
Composição de ácidos gordos (% total de AG)						
12:0	0,022	0,022	0,027	0,030	0,0025	0,064
14:0	0,31 ^b	0,41 ^a	0,45 ^a	0,46 ^a	0,014	<0,001
14:1c9	0,025 ^c	0,043 ^b	0,061 ^a	0,055 ^{ab}	0,0035	<0,001
15:0	0,09 ^b	0,11 ^a	0,10 ^{ab}	0,12 ^a	0,005	0,002
16:0	14,8 ^b	19,2 ^a	20,0 ^a	20,7 ^a	0,46	<0,001
16:1c7	0,49	0,54	0,57	0,59	0,028	0,057
16:1c9	1,16 ^c	1,97 ^b	2,48 ^a	2,38 ^{ab}	0,110	<0,001
17:0	0,19 ^b	0,31 ^a	0,26 ^a	0,29 ^a	0,014	<0,001
17:1c9	0,008 ^b	0,018 ^b	0,038 ^a	0,039 ^a	0,0034	<0,001
18:0*	7,57 ^b	9,30 ^a	8,31 ^{ab}	8,61 ^{ab}	0,356	0,019
18:1c9	30,2	30,4	31,0	31,9	0,66	0,218
18:1c11	1,06 ^b	1,45 ^a	1,51 ^a	1,51 ^a	0,040	<0,001
18:2n-6	37,0 ^a	28,1 ^b	27,3 ^b	25,5 ^b	1,13	<0,001
18:3n-6	0,122 ^a	0,089 ^b	0,079 ^b	0,083 ^b	0,0041	<0,001
18:3n-3	0,79	0,82	0,99	0,89	0,065	0,180
20:0	0,10	0,12	0,11	0,12	0,006	0,178
20:1c11	0,20 ^b	0,23 ^{ab}	0,25 ^{ab}	0,25 ^a	0,013	0,043
20:2n-6	0,32	0,25	0,27	0,25	0,018	0,060
20:3n-6	0,35	0,44	0,45	0,39	0,029	0,055
20:4n-6	1,90	2,09	2,02	1,73	0,214	0,645
20:3n-3	0,015	0,017	0,021	0,020	0,0021	0,245
20:5n-3	0,014 ^b	0,023 ^{ab}	0,039 ^a	0,025 ^{ab}	0,0048	0,008
22:0	0,054	0,058	0,045	0,051	0,0034	0,072
22:1n-9	0,066	0,072	0,069	0,106	0,0174	0,282
22:2n-6	0,009	0,015	0,007	0,018	0,0045	0,265
22:5n-3	0,14 ^b	0,20 ^a	0,19 ^{ab}	0,17 ^{ab}	0,017	0,037
22:6n-3	0,15	0,20	0,19	0,26	0,039	0,231
23:0	0,044 ^b	0,068 ^a	0,050 ^{ab}	0,058 ^{ab}	0,0053	0,025
Outros	2,87	3,44	3,13	3,32	0,209	0,251
Somatório						
SFA	23,2 ^b	29,6 ^a	29,3 ^a	30,5 ^a	0,75	<0,001
MUFA	33,2 ^b	34,7 ^{ab}	36,0 ^{ab}	36,8 ^a	0,79	0,010
PUFA	40,8 ^a	32,3 ^b	31,5 ^b	29,4 ^b	1,26	<0,001
n-6 PUFA	39,7 ^a	31,0 ^b	30,1 ^b	28,0 ^b	1,21	<0,001
n-3 PUFA*	1,11 ^b	1,26 ^{ab}	1,43 ^a	1,37 ^a	0,062	0,006
Índices dos ácidos gordos						
PUFA/SFA	1,77 ^a	1,10 ^b	1,08 ^b	0,98 ^b	0,066	<0,001
n-6/n-3	35,7 ^a	24,7 ^b	21,4 ^{bc}	20,6 ^c	0,86	<0,001

^{abc} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média)

A dieta CTR apresenta valores superiores de lípidos totais em comparação com as dietas suplementadas com Espirulina. Observou-se uma diferença significativa nos níveis de lipídios totais na carne da coxa ($p=0,013$), mas essa diferença não foi encontrada na carne do peito. A carne do peito tem um valor inferior de lípidos totais relativamente a carne da coxa.

As dietas suplementadas com Espirulina mostraram um aumento de ácidos gordos específicos em comparação com a dieta CTR, tanto na coxa como no peito. Entre os MUFA, destaca-se o ácido palmítico (C16:1n-3). Os PUFA, ômega-3, seguem a mesma tendência, incluindo o ácido alfa-linolénico (18:3n-3) e o ácido eicosapentaenóico (20:5n-3). No entanto, o ácido linoleico (18:2n-6), ômega-6, apresenta valores inferiores aos da dieta CTR. Os ácidos gordos saturados (SFA) ácido palmítico (16:0) e o ácido mirístico (14:0), tiveram um aumento significativo nas dietas suplementadas com Espirulina ($p<0,001$). Os rácios PUFA/SFA e $n-6/n-3$ diminuíram com as dietas suplementadas com Espirulina.

5.5 Teor de colesterol e vitaminas lipossolúveis

As tabelas 9 e 10 expõem os resultados referentes ao teor de colesterol e vitaminas lipossolúveis do peito e da coxa, respetivamente, em função das diferentes dietas administradas.

Tabela 9: Teor de colesterol e de vitaminas lipossolúveis do peito em função das diferentes dietas

Peito	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	<i>p</i>
Colesterol (mg/g)	0,569	0,541	0,553	0,523	0,0204	0,448
α-Tocoferol (ug/g)	11,8 ^a	7,42 ^b	8,12 ^b	7,4 ^b	0,753	0,0003
γ-Tocoferol+β-tocotrienol (ug/g)	0,262	0,248	0,211	0,232	0,0162	0,160
α-Tocotrienol (ug/g)	0,108 ^a	0,076 ^b	0,077 ^b	0,083 ^b	0,0052	0,0005

^{ab} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média)

Tabela 10: Teor de colesterol e de vitaminas lipossolúveis da coxa em função das diferentes dietas

Coxa	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	<i>p</i>
Colesterol (mg/g)	0,569	0,541	0,553	0,523	0,0204	0,448
α-Tocoferol (ug/g)	11,8 ^a	7,42 ^b	8,12 ^b	7,4 ^b	0,753	0,0003
γ-Tocoferol+β-tocotrienol (ug/g)	0,262	0,248	0,211	0,232	0,0162	0,160
α-Tocotrienol (ug/g)	0,108 ^a	0,076 ^b	0,077 ^b	0,083 ^b	0,0052	0,0005

^{ab} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média)

O teor de colesterol não apresenta diferenças significativas entre a dieta CTR e as dietas suplementadas com Espirulina ($p > 0,05$). O teor de α -tocoferol apresenta diferenças significativas ($p < 0,001$) entre a dieta CTR e as dietas suplementadas com Espirulina, sendo que a dieta controlo apresenta valores superiores (11,8 $\mu\text{g/g}$ para a carne de coxa e 8,67 $\mu\text{g/g}$ para o peito). A mesma tendência observa-se para o teor de γ -tocoferol+ β -tocotrienol. Apenas se detetou α -tocotrienol na carne de coxa, sem diferenças significativas entre as diferentes dietas ($p = 0,160$).

5.6 Teor de pigmentos

As carnes do peito e da coxa dos frangos alimentados com as dietas suplementadas com Espirulina apresentam valores significativamente mais altos no total de carotenoides ($p < 0,001$) do que o grupo CTR. Detetou-se β -caroteno nos grupos suplementados com Espirulina, sem diferenças significativas entre os mesmos ($p = 0,073$), para a carne do peito ($p = 0,844$) e para a coxa, mas indetetável no grupo CTR. Estes resultados estão representados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Teor de pigmentos do peito em função das diferentes dietas

Peito	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	<i>p</i>
β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	n,d,	0,039	0,050	0,054	0,005	0,073
Total de carotenoides ($\mu\text{g/g}$)	31,5 ^b	123 ^a	141 ^a	142 ^a	8,101	<,0001

^{ab} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX(dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média); n.d. (não detectado)
total de carotenoides: $(1000 \times A_{470 \text{ nm}} - 1,90 \times Ca - 63,14 \times Cb) / 214, 1157$

Tabela 12: Teor de pigmentos da coxa em função das diferentes dietas

Coxa	CTR	SP	SPEX	SPEZ	EPM	<i>p</i>
β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	n,d,	0,171	0,171	0,159	0,0170	0,844
Total de carotenoides ($\mu\text{g/g}$)	36,3 ^b	114 ^a	100 ^a	113 ^a	8,33	<,0001

^{ab} Valores que diferem dentro da linha com diferença significativa ($p < 0,05$); CRT (dieta basal), SP (dieta basal+15%de espirulina), SPEX (dieta basal+15% espirulina extrudida), SPEZ (dieta basal+15% espirulina extrudida + mistura enzimática); EPM (erro padrão da média); (não detectado)
total de carotenoides: $(1000 \times A_{470 \text{ nm}} - 1,90 \times Ca - 63,14 \times Cb) / 214, 1157$

6. DISCUSSÃO

Os resultados da performance evidenciam que os grupos experimentais SPEX e SPEZ, apresentam resultados mais parecidos ao grupo CTR e melhores que o grupo SP, relativamente aos indicadores de crescimento e de eficiência alimentar. A melhoria do desempenho produtivo ao longo do período experimental indicam adaptação dos frangos ao longo do tempo (Spínola *et al.* 2024; Mirzaie *et al.* 2024).

Estes resultados estão de acordo com o esperado, visto que, o processo de extrusão e o uso de uma mistura enzimática melhora o aproveitamento nutricional e o crescimento dos frangos (Costa *et al.* 2023). A otimização das dietas e a necessidade de estudos mais profundos sobre a interação da Espirulina com as enzimas nos processos metabólicos dos humanos e nos animais monogástricos deverão ser os próximos passos da indústria para uma melhor e clara compreensão dos resultados.

O presente trabalho avaliou a qualidade e estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com dietas suplementadas com 15% de Espirulina (não) extrudida com e sem suplementação enzimática exógena. A seguir são discutidos os resultados da qualidade da carne (pH e cor, teor de lípidos totais e composição do perfil de ácidos gordos, de colesterol e vitamina lipossolúveis e pigmentos) e da estabilidade oxidativa (oxidação lipídica).

Observou-se uma diferença no parâmetro b^* da coloração da carne, com valores de amarelo significativamente maiores nas dietas suplementadas com Espirulina em comparação com a dieta controlo (Park *et al.* 2018). Isso evidencia que a composição das dietas influencia os resultados da coloração da carne. A Espirulina contém pigmentos naturais, como os carotenoides, que se depositam nos tecidos dos frangos e impactam a coloração da carne. A exceção observada no parâmetro a^* (vermelho) da carne do peito pode ser explicada pelas propriedades antioxidantes dos carotenoides presentes na Espirulina, que influenciam a oxidação da mioglobina, responsável pela coloração vermelha na carne. O parâmetro de luminosidade não sofreu alterações, o que indica que a suplementação com Espirulina afeta apenas os mecanismos bioquímicos que se relacionam com a cor (Toyomizu *et al.* 2001; Dimitrov *et al.* 2024). A coloração amarela na carne de frango, resultante da incorporação de ingredientes naturais como a espirulina, pode ser vista positivamente por consumidores que associam essa alteração a maior qualidade nutricional e frescor do produto. No entanto, em mercados onde a carne de frango tradicionalmente apresenta uma cor mais pálida, a mudança para um tom amarelado pode gerar desconfiança, sendo necessária uma comunicação clara sobre os benefícios e a segurança dos ingredientes utilizados. Os resultados de pH estão de acordo com o pH médio das carnes de aves cruas. Os

parâmetros de qualidade da carne, como o pH, mantiveram-se estáveis em todos os tratamentos dietéticos, o que é consistente com estudos anteriores que indicam que intervenções dietéticas moderadas não afetam significativamente o pH, exceto em casos de stress extremo no abate (Pestana et al., 2020). A ausência de variações no pH sugere que a inclusão de *L. platensis*, seja extrudida ou com suplementação enzimática, não altera o metabolismo *pós-mortem* normal. O pH é um fator importante para a qualidade na carne, e afeta principalmente a textura da mesma (determina características como a suculência, maciez, etc), (Heinz & Hautzinger 2007) por isso o pH determinado é um bom indicador de qualidade, ainda que não tenha sido feita análise sensorial.

A ausência de diferenças significativas nos níveis de MDA após 8 dias de armazenamento indica que a inclusão de *L. platensis* não compromete a estabilidade oxidativa da carne de frango. Isso sugere que as propriedades antioxidantes da Espirulina, como os carotenoides e a vitamina E, ajudam a preservar a qualidade da carne, embora seus efeitos não tenham sido suficientemente pronunciados para gerar alterações significativas nos níveis de MDA (Altmann & Rosenau, 2022). Com base na análise dos dados e na revisão da literatura, conclui-se que a oxidação foi influenciada pelas condições de armazenamento e que a incorporação de Espirulina nas dietas dos frangos não compromete a qualidade oxidativa da carne (Altmann & Rosenau 2022).

A diferença observada no teor de lipídios totais nas dietas suplementadas com Espirulina sugere que os compostos ativos da Espirulina podem influenciar o metabolismo lipídico (Bortolini et al. 2022). Bonos et al. (2016) observaram que a suplementação com microalgas tende a reduzir os ácidos gordos saturados (SFA), no entanto, resultados recentes de Costa et al. (2024) demonstraram um aumento nos níveis de SFA em carnes de frangos alimentados com Espirulina, sugerindo que a microalga pode influenciar significativamente o metabolismo lipídico e a incorporação de ácidos gordos nos tecidos (Long et al. 2018). O aumento dos PUFA *n*-3 é altamente benéfico para a saúde, com destaque para o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido alfa-linolénico (ALA) (Givens 2009), que desempenham papéis cruciais na manutenção da saúde. A suplementação com Espirulina demonstra o potencial desta microalga em enriquecer nutricionalmente a carne de frango (Costa et al. 2024; Pestana et al. 2020). Os rácios *n*-6/*n*-3 e PUFA/SFA calculados indicam que a carne de frangos alimentados com Espirulina apresenta um perfil lipídico favorável, tornando-se uma opção adequada para uma alimentação saudável (Wood et al, 2004). A diferença do teor de SFA e PUFA entre os grupos experimentais suplementados com Espirulina e o grupo controlo justifica-se pelas quantidades de óleo de girassol incorporado nas diferentes dietas. O óleo de girassol é rico em PUFA, sendo que a quantidade de óleo de girassol é inferior

nas dietas suplementadas com Espirulina, justifica-se o teor de PUFA inferior.

A incorporação de Espirulina (não) extrudida e enzimas não influencia o teor de colesterol da carne. Como descrito Mirzaie *et al.* (2024) pode existir alterações no perfil lipídico provocadas pelas diferentes dietas sem que se altere o teor de colesterol, resultados que corroboram as descobertas de Costa *et al.* (2024) & Pestana *et al.* (2020). O α -tocoferol apresentou níveis inferiores nas dietas suplementadas com Espirulina em comparação com a dieta controle, refletindo a quantidade adicionada às dietas. Estudos de Pestana *et al.* (2020) e Costa *et al.* (2024) corroboram essas descobertas, indicando que as condições de cultivo da microalga influenciam significativamente seu perfil nutricional. Outros homólogos da vitamina E também mostraram valores inferiores. A carne da coxa apresentou teores mais elevados, atribuídos ao seu maior conteúdo de gordura em comparação ao peito.

O β -caroteno foi apenas detectado nos grupos suplementados com Espirulina e indetectável no grupo CTR. Estes resultados estão de acordo com o esperado, visto que o β -caroteno é um composto presente na microalga e não na dieta. Os teores superiores de carotenoides nas dietas suplementadas com Espirulina são explicados pela presença de pigmentos na microalga (Martins *et al.* 2023). As propriedades dos carotenoides podem ser utilizadas como aditivos naturais, moldando as preferências dos consumidores (Kennedy *et al.* 2005) e podem proporcionar benefícios para a saúde dos consumidores devido às suas propriedades antioxidantes. A carne da coxa apresentou teores mais elevados, atribuídos ao seu maior conteúdo de gordura em comparação ao peito.

7. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar o impacto da inclusão de 15% de Espirulina na dieta de frangos de carne, *per se* ou extrudida, suplementada com enzimas, com o intuito de melhorar o aproveitamento nutricional e analisar a qualidade nutricional e a estabilidade oxidativa da carne. Os resultados indicaram que o processo de extrusão e a suplementação enzimática minimizaram os efeitos negativos no desempenho produtivo associados à inclusão de Espirulina na dieta, resultando em uma eficiência alimentar comparável à do grupo controle. Para além disso, a qualidade geral da carne não foi comprometida, e observou-se uma melhoria em alguns parâmetros nutricionais, como o aumento dos ácidos gordos polinsaturados da família ómega-3.

Os compostos bioativos presentes na Espirulina, como o β -caroteno, contribuíram positivamente para a qualidade nutricional da carne, com potenciais benefícios para a saúde humana. A estabilidade oxidativa da carne permaneceu estável, e os níveis de colesterol não apresentaram variações significativas, demonstrando que a carne de frangos alimentados com Espirulina é uma opção alimentar tão adequada quanto a carne de frango tradicional. No entanto, a coloração amarelada da carne pode influenciar negativamente a aceitação dos consumidores. Por isso, é essencial destacar os benefícios para a saúde e o ambiente associados à inclusão de microalgas na dieta, como estratégia para melhorar a aceitação do produto.

A incorporação de *L. platensis* extrudida, suplementada com pancreatina e lisozima, revela-se uma abordagem promissora como alternativa sustentável de proteína de elevada qualidade. A adição destas enzimas melhorou a digestibilidade e a absorção de nutrientes, otimizando o crescimento dos frangos e reduzindo os efeitos negativos associados à microalga não processada. Além disso, a inclusão de *L. platensis* influenciou positivamente a qualidade da carne, aumentando o teor de carotenoides e melhorando o perfil lipídico, com maior concentração de PUFA *n*-3 e uma relação *n*-6/*n*-3 mais equilibrada. Estas alterações estão alinhadas com recomendações nutricionais, sugerindo benefícios potenciais para os consumidores. Importa ainda salientar que a estabilidade oxidativa da carne não foi comprometida, mantendo a sua qualidade ao longo do armazenamento. No entanto, são necessários estudos adicionais para aprimorar o desempenho produtivo dos animais, mantendo os benefícios observados na qualidade da carne.

Futuras investigações devem focar-se na otimização das condições de inclusão de Espirulina nas dietas, processamento da microalga e suplementação enzimática visando maximizar tanto a eficiência produtiva quanto a aceitação do consumidor, a perceção dos consumidores será essencial para a aceitação no mercado. Além disso, o

estudo de peptidases específicas para a hidrólise das proteínas de *L. platensis* poderá potencializar o seu valor nutricional, contribuindo para uma produção avícola mais sustentável e nutritiva.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed S, Ahmed O, Shah P. 2023. Biochemistry, Lipids. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525952/>.
- Altmann BA, Rosenau S. 2022. Spirulina as Animal Feed: Opportunities and Challenges. *Foods*. 11(7):965. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11070965>.
- Altmann BA, Trinks A, Mörlein D. 2023. Consumer Preferences for the Color of Unprocessed Animal Foods. *Journal of Food Science*. 88(3):909–925. doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.16485>.
- Bonos E, Kasapidou E, Kargopoulos A. 2016. Spirulina as a Functional Ingredient in Broiler Chicken Diets. *South African Journal of Animal Science*. 46(1). doi:<https://doi.org/10.4314/sajas.v46i1.12>.
- Bortolini DG, Maciel GM, Fernandes I de AA, Pedro AC, Rubio FTV, Branco IG, Haminiuk CWI. 2022. Functional Properties of Bioactive Compounds from Spirulina spp.: Current Status and Future Trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences*. 5:100134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100134>.
- Chaudhary A, Gustafson D, Mathys A. 2018. Multi-indicator Sustainability Assessment of Global Food Systems. *Nature Communications*. 9(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03308-7>.
- Chen J, Liu H. 2020. Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: a Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(16):5695. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21165695>.
- Coelho D, Lopes P, Cardoso V, Ponte P, Brás J, Madeira M, Alfaia C, Bandarra N, MGA C, Prates JAM. 2019. A two-enzyme Constituted Mixture to Improve the Degradation of *Arthrospira Platensis* Microalga Cell Wall for Monogastric Diets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 104(1):310–321. doi:<https://doi.org/10.1111/jpn.13239>.
- Costa M, Spínola MP, Tavares B, Pestana JM, Tavares JC, Martins CF, Alfaia CM, Carvalho D, Mendes AR, Ferreira JI, et al. 2024. Effects of High Dietary Inclusion of *Arthrospira platensis*, Either Extruded or Supplemented with a super-dosing multi-enzyme mixture, on Broiler Growth Performance and Major Meat Quality Parameters. *BMC Veterinary Research*. 20(1):1–21. doi:<https://doi.org/10.1186/s12917-024-04027-6>.
- Costa MM, Spínola MP, Prates JAM. 2023. Combination of Mechanical/Physical Pretreatments with Trypsin or Pancreatin on *Arthrospira Platensis* Protein Degradation. *Agriculture*. 13(1):198–198. doi:<https://doi.org/10.3390/agriculture13010198>.
- Dimitrov N, Mitova D, Dimov K, Petkov E, popova eodora P. 2024. View of Changes in Colour and Myoglobin Oxidation in Chicken Meat as Affected by Antioxidants during Storage. *Proceedingsbasbg*. 76(12). [<https://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/article/view/452/439>].
- Dineshbabu G, Goswami G, Kumar R, Sinha A, Das D. 2019. Microalgae–nutritious, Sustainable aqua- and Animal Feed Source. *Journal of Functional Foods*. 62. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103545>.
- Djuricic I, Calder PC. 2021. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: an Update for 2021. *Nutrients*. 13(7):2421. doi:<https://doi.org/10.3390/nu13072421>.
- Dolganyuk V, Belova D, Babich O, Prosekov A, Ivanova S, Katserov D, Patyukov N, Sukhikh S. 2020. Microalgae: a Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*. 10(8):1153. doi:<https://doi.org/10.3390/biom10081153>.

Domínguez R, Pateiro M, Gagaoua M, Barba FJ, Zhang W, Lorenzo JM. 2019. A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants*. 8(10):429. doi:<https://doi.org/10.3390/antiox8100429>.

FAO. 2023. *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2023*. Rome. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/6e04f2b4-82fc-4740-8cd5-9b66f5335239/content>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. *The Future of Food and Agriculture: Trends and Challenges*. Rome. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/2e90c833-8e84-46f2-a675-ea2d7afa4e24/content>.

Gerber P, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Faluccci A, Tempio G. 2013. *Tackling Climate Change through Livestock – a Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities*. Rome: FAO. <https://www.fao.org/4/i3437e/i3437e.pdf>.

Givens I. 2009. Animal Nutrition and Lipids in Animal Products and Their Contribution to Human Intake and Health. *Nutrients*. 1(1):71–82. doi:<https://doi.org/10.3390/nu1010071>.

Heinz G, Hautzinger P. 2007. *Meat Processing Technology for small-to medium- Scale Producers*. Bangkok: FAO. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/4cfabbd3-16aa-47f8-ac6f-b54a48cb8abd/content>.

Huang X, Ahn DU. 2019. Lipid Oxidation and Its Implications to Meat Quality and Human Health. *Food Science and Biotechnology*. 28(5). doi:<https://doi.org/10.1007/s10068-019-00631-7>.

Instituto Nacional de Estatística. 2024. *Estatísticas Agrícolas 2023*. Lisboa: INE. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=439500127&PUBLICACOESmodo=2.

Kennedy O, Knox B, Mitchell P, Thurnham D. 2005. Flesh Colour Dominates Consumer Preference for Chicken. *Appetite*. 44(2). doi:<https://doi.org/10.1016/j.appet.2004.11.002>.

Lichtenstein AH. 2023. Lipids (fats and oils). In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. p. 291–300. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128218488000135?via%3Dihub>.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, Antioxidants and Functional foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews*. 4(8):118–126. doi:<https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.

Long SP, Kang S-M, Wang Q, Xu Y, Pan L, Hu JF, Li M, Piao X. 2018. Dietary Supplementation with DHA-rich Microalgae Improves performance, Serum composition, Carcass trait, Antioxidant status, and Fatty Acid Profile of Broilers. *Poultry Science*. 97(6):1881–1890. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pey027>.

Madeira MS, Cardoso C, Lopes PA, Coelho D, Afonso C, Bandarra NM, Prates JAM. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*. 205:111–121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.020>.

Martins T, Barros AN, Rosa E, Antunes L. 2023. Enhancing Health Benefits through Chlorophylls and Chlorophyll-Rich Agro-Food: a Comprehensive Review. *Molecules*. 28(14):5344. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules28145344>.

Mirzaie S, Zirak-Khattab F, Hosseini S, Donyaei-Darian H. 2018. Effects of Dietary Spirulina on Antioxidant status, Lipid profile, Immune Response and Performance

Characteristics of Broiler Chickens Reared under High Ambient Temperature. 31. 4:556–563. doi:<https://doi.org/10.5713/ajas.17.0483>.

Nowicka-Krawczyk P, Mühlsteinová R, Hauer T. 2019. Detailed Characterization of the *Arthrospira* Type Species Separating Commercially Grown Taxa into the New Genus *Limnospira* (Cyanobacteria). *Scientific Reports*. 9(694). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36831-0>.

OECD, FAO. 2023. *Agricultural Outlook 2023-2032*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2023-2032_08801ab7-en.

Park JH, Lee SI, Kim IH. 2018. Effect of Dietary *Spirulina* (*Arthrospira*) *Platensis* on the Growth performance, Antioxidant Enzyme activity, Nutrient digestibility, Cecal microflora, Excreta Noxious Gas emission, and Breast Meat Quality of Broiler Chickens. *Poultry Science*. 97(7):2451–2459. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pey093>.

Pestana JM, Puerta B, Santos H, Madeira MS, Alfaia CM, Lopes PA, Pinto RMA, Lemos JPC, Fontes CMGA, Lordelo MM, et al. 2020. Impact of Dietary Incorporation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and Exogenous Enzymes on Broiler performance, Carcass traits, and Meat Quality. *Poultry Science*. 99(5):2519–2532. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.069>.

Petrescu D, Vemir I, Petrescu-Mag R. 2019. Consumer Understanding of Food Quality, Healthiness, and Environmental Impact: A Cross-National Perspective. *International Journal of Environmental Health and Public Health*. 17(1). doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph17010169>.

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. *Poultry Science*. 87(1):80–88. doi:<https://doi.org/10.3382/ps.2007-00148>.

Ramadan F, Asker M, Ibrahim Z. 2008. Functional Bioactive Compounds and Biological Activities of *Spirulina Platensis* Lipids. *Czech Journal of Food Sciences*. 26(3). doi:<https://doi.org/10.17221/2567-CJFS>.

Soriano J. 2010. Chemical Composition and Nutritional Content of Raw Poultry Meat. *Handbook of Poultry Science and Technology*. 1:467–484. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470504451.ch25>.

Spínola MP, Costa MM, Prates JAM. 2022. Digestive Constraints of *Arthrospira Platensis* in Poultry and Swine Feeding. *Foods*. 11(19):2984–2984. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11192984>.

Spínola MP, Costa MM, Prates JAM. 2023. Studies on the Impact of Selected Pretreatments on Protein Solubility of *Arthrospira Platensis* Microalga. *Agriculture*. 13(1):221–221. doi:<https://doi.org/10.3390/agriculture13010221>.

Spínola M, Alfaia CM, Costa MM, Pinto RM, Lopes PA, Pestana JM, Tavares JC, Mendes AR, Mourato MP, Tavares B, et al. 2024. Impact of High *Spirulina* diet, Extruded or Supplemented with enzymes, on Blood cells, Systemic metabolites, and Hepatic Lipid and Mineral Profiles of Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*. 11. doi:<https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1342310>.

Swapnil P, Meena M, Singh SK, Dhuldhaj UP, Harish, Marwal A. 2021. Vital Roles of Carotenoids in Plants and Humans to Deteriorate Stress with Its structure, biosynthesis, Metabolic Engineering and Functional Aspects. *Current Plant Biology*. 26:100203. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100203>.

Toyomizu M, Sato K, Taroda H, Kato T, Akiba Y. 2001. Effects of Dietary Spirulina on Meat Colour in Muscle of Broiler Chickens. *British Poultry Science*. 42(2):197–202. doi:<https://doi.org/10.1080/00071660120048447>.

Whitney E, Rolfes S. 2010. *Understanding Nutrition*. 12th ed. Cengage Learning.

Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR, Enser M. 2004. Effects of Fatty Acids on Meat quality: a Review. *Meat Science*. 66(1):21–32. doi:[https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(03)00022-6).