



**Catarina Pinto
Rodrigues**

**Utilização de subprodutos de segurelha como
promotores de crescimento e/ou substitutos dos
coccidiostáticos em rações para frangos**



**Catarina Pinto
Rodrigues**

**Utilização de subprodutos de segurelha como
promotores de crescimento e/ou substitutos dos
coccidiostáticos em rações para frangos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Coelho, Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e supervisão empresarial da Mestre Susana Cláudia Santos, Diretora do Departamento Técnico e do Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Ovargado, S.A.



PROGRAMA DE
DESENVOLVIMENTO
RURAL 2014 · 2020



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu Agrícola
de Desenvolvimento Rural

A Europa Investe nas Zonas Rurais

**Dedico este trabalho aos meus pais pelo incansável apoio ao longo de todo o meu
percurso académico.**

O júri

Presidente

Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques
Domingues

Professora Associada com Agregação, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho

Investigadora Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Professor Doutor Jorge Belarmino Ferreira Oliveira

Professor Coordenador do Departamento de Zootecnia, Engenharia Rural e Veterinária da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu

Agradecimentos

Agradeço às minhas orientadoras Doutora Elisabete Coelho e Mestre Susana Santos pela disponibilidade, apoio e conhecimento transmitido ao longo desta etapa.

Agradeço também ao João, que apesar de não ter o título oficial de meu orientador, orientou-me incondicionalmente durante todo o percurso. Obrigada por me teres ensinado tanto, por estares sempre disponível e disposto a ajudar.

Agradeço à empresa Ovargado S.A., pela oportunidade de estágio e cooperação ao longo dos meses que lá estive.

Aos parceiros do projeto Waste2Value (PDR 2020 – 1.0.1-031824), por terem aceitado a minha integração no projeto.

À empresa Ervital – Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda. por fornecer os subprodutos de *Satureja montana*.

À Ana e ao Renato, por toda a paciência que tiveram comigo e por todos os ensinamentos ao longo deste percurso.

A todos os colaboradores da Ovargado S.A., pela boa disposição e ajuda constantes.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares por todo o apoio e carinho, não só nesta etapa, mas ao longo de toda a minha vida.

Ao meu namorado, Paulo Alexandre Silva Correia, pelo apoio infinito, por nunca me deixar desistir, por me fazer acreditar em mim e me puxar para cima.

Agradeço aos meus pais, Manuel Silva Rodrigues e Paula Maria Pereira Pinto, por serem os meus pilares e por fazerem tudo por mim. Sem vocês eu não era nada, sem vocês nada disto teria sido possível. Não há palavras que possam transmitir toda a minha gratidão.

A todos vocês, um sincero obrigada!

palavras-chave

Alimentação animal, Frangos de carne, Coccidiose, Coccidiostáticos, Fitobióticos, Subprodutos de *Satureja montana*

resumo

Os fitobióticos têm sido investigados como promotores do crescimento e como alternativas naturais aos coccidiostáticos na indústria avícola. A planta *Satureja montana* é rica em terpenos fenólicos como o carvacrol e o timol. Os efeitos benéficos obtidos com a incorporação de plantas também podem ser alcançados com a incorporação dos seus subprodutos, uma vez que certos fitobióticos também estão presentes neles. Sendo assim, o objetivo deste trabalho, integrado no âmbito do estágio na empresa Ovargado S.A., é a utilização de subprodutos de *Satureja montana* como promotores de crescimento e/ou possíveis substitutos dos coccidiostáticos em rações para frangos de carne. As rações foram produzidas na Ovargado e adaptadas às diferentes fases de crescimento dos frangos. Estas foram analisadas nutricionalmente por metodologia NIR e foi também realizada a análise microbiológica dos produtos. As rações foram administradas num ensaio experimental em frangos que decorreu no Instituto Politécnico de Viseu. Este ensaio teve como principal objetivo avaliar o efeito da suplementação da dieta de frangos de carne com subprodutos moídos de *Satureja montana* sobre o seu desempenho produtivo. Foram avaliados 16 frangos, que foram aleatoriamente distribuídos por 4 grupos experimentais distintos: dieta basal contendo 0 % (controlo), 1 %, 2 % e 4 % do subproduto de segurelha moído. Os resultados nutricionais obtidos por NIR para as rações de crescimento variam entre 18,5 – 19,0 % para a proteína, 3,5 – 4,2 % para a fibra, 3,5 – 3,7 % para a gordura, 5,7 – 6,2 % para as cinzas, 1,02 – 1,07 % para o cálcio e 0,59 – 0,60 % para o fósforo. Já para as rações de acabamento os valores variam entre 16,0 – 16,4 % para a proteína, 3,4 – 3,9 % para a fibra, 2,3 – 3,3 % para a gordura, 5,2 – 5,6 % para as cinzas, 0,85 – 0,94 % para o cálcio e 0,56 – 0,58 % para o fósforo. Tanto para a ração de crescimento como para a de acabamento, os valores de proteína, gordura, amido, cálcio e fósforo não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre as formulações. Já os teores de fibra e cinzas foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Em Portugal, existe legislação apenas para a presença de *Salmonella* em alimentos para animais, sendo os restantes limites microbiológicos definidos internamente pela empresa. Os níveis obtidos de coliformes, bolores, leveduras e *Salmonella spp.* encontram-se dentro dos limites estabelecidos. A análise microbiológica realizada às formulações com adição de 4 % do subproduto de segurelha, parece mostrar uma ligeira redução em praticamente todos os microrganismos avaliados. Estes resultados sugerem que a segurelha poderá contribuir para melhorar a segurança microbiológica das rações. Os parâmetros produtivos avaliados durante o ensaio (ganho médio diário de peso, ingestão média diária de ração, ICA e peso corporal) não foram significativamente ($p > 0,05$) afetados pelos tratamentos, no entanto, os resultados sugerem que a inclusão de 1 % de subproduto de segurelha na dieta de frangos promove um melhor índice de conversão alimentar (1,95) comparativamente aos restantes tratamentos (controlo - 2,14; 2 % - 2,11; 4 % - 2,38), podendo vir a ser usado como promotor de crescimento e/ou como uma possível alternativa aos coccidiostáticos na alimentação de frangos de carne.

keywords

Animal Feed, Broiler Chickens, Coccidiosis, Coccidiostats, Phytobiotics, By-products of *Satureja montana*

abstract

Phytobiotics have been investigated as growth promoters and as natural alternatives to coccidiostats in the poultry industry. *Satureja montana* is a plant rich in phenolic terpenes such as carvacrol and thymol. The beneficial effects obtained with the incorporation of plants can also be achieved by incorporating their by-products, since certain phytobiotics are also present in them. Therefore, the objective of this work, integrated within the scope of the internship at Ovargado S.A., is the utilization of *Satureja montana* by-products as growth promoters and as possible substitutes for coccidiostats in feed formulations for broiler chickens. The rations were produced at Ovargado and adapted to the different growth stages of the chickens. These rations were analyzed nutritionally by NIR methodology and the microbiological analysis of the products was also performed. The rations were administered in an experimental assay on chickens that took place at Instituto Politécnico de Viseu. This assay had as main objective to evaluate the effect of supplementation the diet of broilers with grinded *Satureja montana* by-products on their productive performance. 16 chickens were evaluated, which were randomly assigned to 4 different experimental groups: basal diet containing 0 % (control), 1 %, 2 % and 4 % of the grinded savory by-products. The nutritional results obtained by NIR for the growth formulations vary between 18.5 – 19.0 % for protein, 3.5 - 4.2 % for fiber, 3.5 – 3.7 % for fat, 5.7 – 6.2 % for ash, 1.02 - 1.07 % for calcium and 0.59 - 0.60 % for phosphorus. For the finishing diets, the values vary between 16.0 - 16.4 % for protein, 3.4 - 3.9 % for fiber, 2.3 - 3.3 % for fat, 5.2 - 5.6 % for ash, 0.85 - 0.94 % for calcium and 0.56 - 0.58 % for phosphorus. For both growth and finishing diets, the values of protein, fat, starch, calcium, and phosphorus were not significantly different ($p > 0.05$) between formulations. The contents of fiber and ash were significantly different ($p < 0.05$). In Portugal, there is legislation only for the presence of *Salmonella* in animal feed, the remaining microbiological limits being defined internally by the company. The levels obtained from coliforms, molds, yeasts, and *Salmonella* spp. are within the established limits. The microbiological analysis performed on the formulations with the addition of 4 % of the savory by-products, seems to show a slight reduction in almost all the microorganisms evaluated. These results suggest that savory may contribute to improve the microbiological safety of feeds. The productive parameters evaluated during the trial (average daily weight gain, average daily feed intake, FCR and body weight) were not significantly ($p > 0.05$) affected by the treatments, however, the results suggest that the inclusion of 1 % of savory by-products in the chicken diet promotes a better feed conversion rate (FCR – 1.94) compared to the other treatments (control - 2.14; 2 % - 2.11; 4 % - 2.38), which may be used as a growth promoter and / or as a possible alternative to coccidiostats in broiler chicken feeds.

Índice Geral

1. Introdução.....	1
1.1. Ovargado, S.A.....	3
1.2. Frangos de carne.....	4
1.2.1. Sistema digestivo	4
1.2.2. Necessidades nutricionais	6
1.2.3. Matérias-primas utilizadas na alimentação de frangos de carne.....	16
1.3. Utilização de coccidiostáticos em formulações para frangos.....	18
1.3.1. Coccidiose.....	19
1.3.2. Ciclo de vida dos coccídeos	21
1.3.3. Estratégias para controlo da coccidiose	22
1.3.4. Tipos de coccidiostáticos e mecanismo de ação	23
1.4. Alternativas naturais aos coccidiostáticos na produção de aves	28
1.5. Utilização dos fitobióticos na nutrição de frangos de carne.....	28
1.5.1. Propriedades antimicrobianas	30
1.5.2. Propriedades anticoccidianas	31
1.5.3. Propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias	33
1.5.4. Efeito dos fitobióticos como promotores do crescimento e da saúde	34
1.6. Efeito fitobiótico de subprodutos agroalimentares na nutrição de aves	35
1.7. Segurelha (<i>Satureja montana</i>) e os seus subprodutos.....	38
1.7.1. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de segurelha	39
1.7.2. Utilização da segurelha na alimentação de frangos	41
1.8. Objetivos	46
2. Materiais e Métodos	47
2.1. Origem dos materiais	47
2.2. Tratamento dos subprodutos de ervas aromáticas para aplicação nas rações	47
2.3. Caracterização química das rações (de crescimento e de acabamento) por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR).....	47
2.4. Análise microbiológica das rações controlo e das rações com adição de 4 % de subproduto de segurelha	48
2.5. Animais e alojamento.....	49
2.6. Tratamentos dietéticos.....	49

2.7. Parâmetros usados para avaliar o desempenho produtivo dos animais.....	51
2.8. Análise estatística.....	51
3. Resultados e Discussão	53
3.1. Caracterização química das rações (de crescimento e de acabamento) por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR).....	53
3.1.1. Formulações para o período de crescimento (A-105 Migalha)	58
3.1.2. Formulações para o período de acabamento (A-115 E Fr)	59
3.2. Análise microbiológica das rações	60
3.3. Parâmetros de desempenho dos frangos.....	65
4. Considerações finais.....	71
5. Trabalho futuro.....	73
6. Referências Bibliográficas	74

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema sobre sustentabilidade e economia circular (Fonte: http://waste2value.pt/index.php).	1
Figura 2 - Unidades fabris da Ovargado, S.A. (Fonte: http://ovargado.com/).	3
Figura 3 – Principais órgãos constituintes de <i>Gallus gallus domesticus</i> . (Adaptada de: http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/digestive-system/).	5
Figura 4 – Ciclo de vida de <i>Eimeria spp.</i> (Adaptada de [29]).	21
Figura 5 – Estruturas moleculares dos coccidiostáticos ionóforos autorizados.	26
Figura 6 – Estruturas moleculares dos coccidiostáticos sintéticos autorizados.	27
Figura 7 - Estrutura química de alguns dos principais componentes do óleo essencial de <i>Satureja montana</i>	40
Figura 8 - NIRSystems 5000 (lado esquerdo) e célula de análise retangular (lado direito) utilizados para análise de alimentos para frangos de carne.	48
Figura 9 – Boxes onde os frangos foram alojados, cada uma contendo um bebedouro e um comedouro.	49
Figura 10 – Aspeto visual das formulações para a fase de crescimento (lado esquerdo) e para a fase de acabamento (lado direito).	50

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Necessidades nutricionais para frangos de carne de produção industrial (Adaptada de Necesidades Nutricionales para Avicultura: Normas FEDNA 2ª edición [15]).	7
Tabela 2 - Recomendações de vitaminas e oligoelementos para frangos de carne (Adaptada de Necesidades Nutricionales para Avicultura: Normas FEDNA 2ª edición [15]).	8
Tabela 3 – Resumo das funções desempenhadas pelas vitaminas nos frangos de carne [19], [20].	15
Tabela 4 – Constituintes nutricionais das principais matérias-primas que integram a composição dos alimentos compostos para frangos de carne	18
Tabela 5 – Principais características das espécies de <i>Eimeria</i> identificadas em frangos. ...	20
Tabela 6 - Resumo de estudos que avaliaram os efeitos fitobióticos resultantes da incorporação de subprodutos na dieta de frangos.	36
Tabela 7 – Gama de concentração (%) em que ocorrem os principais constituintes químicos presentes nos óleos essenciais obtidos das partes aéreas [8] e dos subprodutos de <i>S. montana</i> [69].	40
Tabela 8 – Resumo de alguns estudos em que avaliaram os efeitos da suplementação dietética com segurelha na alimentação de frangos de carne.	44
Tabela 9 – Composição da dieta de crescimento, A-105 Migalha, e da dieta de acabamento, A-115 Especial Farinha.	50
Tabela 10 – Constituintes analíticos (%) declarados no rótulo do A-105 Migalha e do A-115 Especial Farinha.	51
Tabela 11 – Aditivos por quilograma de alimento para cada formulação.	52
Tabela 12 - Análise química das rações obtida por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR). Valores expressos em %, da média de 4 amostras.	54
Tabela 13 – Constituintes nutricionais de folhas provenientes da planta segurelha-de-verão, secas e moídas, por 100 g (Adaptada da base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA).	55
Tabela 14 – Comparação entre os constituintes analíticos obtidos por análise de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) (%) e os declarados no rótulo (%) para ambas as formulações.	56
Tabela 15 - Limites legais quanto ao valor declarado no rótulo (Adaptado do Regulamento (CE) nº 767/2009 de 13 de julho de 2009).	56

Tabela 16 – Critérios microbiológicos: Limites Máximos Admissíveis pela empresa Ovargado S.A.	61
Tabela 17 – Resultados da análise microbiológica realizada ao A-105 Migalha: controlo e com a adição de 4 % de subproduto moído de segurelha.	61
Tabela 18 – Resultados da análise microbiológica realizada ao A-115 Especial Farinha: controlo e com a adição de 4 % de subproduto moído de segurelha.	61
Tabela 19 – Efeito dos diferentes tratamentos dietéticos no desempenho produtivo dos frangos de carne. Valores expressos pela média de 4 animais.	65

Lista de Abreviaturas

FVE – Federação de Veterinários da Europa

UE – União Europeia

FDA – Food and Drug Administration

OEs – Óleos Essenciais

OE – Óleo Essencial

TGI – Trato Gastrointestinal

Gly – Glicina

Ser – Serina

EMA – Energia Metabolizável Aparente

EMAn – Energia Metabolizável Aparente corrigida pelo balanço de nitrogénio

AA – Aminoácidos

PB – Proteína Bruta

MOs – Microrganismos

HCs – Hidratos de carbono

CMIs – Concentrações Mínimas Inibitórias

IC50 – 50 % da concentração inibitória máxima

NIR – Espectroscopia de Infravermelho Próximo

PNA – Polissacarídeos Não Amiláceos

FD – Fibra Dietética

FEDNA – Fundação Espanhola para o Desenvolvimento da Nutrição Animal

ICA – Índice de Conversão Alimentar

UI – Unidades Internacionais

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

PSS - pó obtido do subproduto de segurelha

1. Introdução

A produção agrícola e o setor agroindustrial geram uma grande quantidade de subprodutos e resíduos, cujo processamento, seja pela indústria alimentar ou por entidades especializadas no tratamento de resíduos, tem fortes impactos ambientais, económicos e sociais [1]. Atualmente cerca de um terço da quantidade de alimentos produzidos mundialmente para consumo humano é desperdiçada, correspondendo a uma produção mundial de resíduos alimentares de cerca de 1,3 mil milhões de toneladas por ano [2]. Na UE, a produção total de resíduos agrícolas (isto é, resíduos de colheita ou partes das plantas que não são consumidas como alimento) representa 367 milhões de toneladas por ano [3]. Nesse sentido, a valorização de resíduos e subprodutos agroalimentares apresenta-se atualmente, não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos, que podem constituir uma fonte de compostos com valor económico acrescentado como proteínas, lipídios, fibras, micronutrientes ou compostos bioativos [2].

O esgotamento de recursos renováveis, a redução de terras para cultivo, o crescimento contínuo da população mundial e a acumulação excessiva de resíduos são fatores que motivam o aproveitamento desses subprodutos por parte do setor alimentar, principalmente através da alimentação animal [1]. Neste âmbito, existem uma série de requisitos e orientações, onde se incluem:

- Utilização de subprodutos contribuindo para uma maior sustentabilidade;
- Economia circular que promove a minimização do desperdício;
- Minimização do recurso a antiparasitários (coccidiostáticos) na alimentação animal;
- Minimização da utilização de cereais/grãos (milho, soja, trigo, cevada);
- Minimização de alergias (como por exemplo: a alergia ao glúten).



Figura 1 – Esquema sobre sustentabilidade e economia circular (Fonte: <http://waste2value.pt/index.php>).

Os coccidiostáticos são agentes antiparasitários utilizados há muito tempo como estratégia principal para controlo da coccidiose, uma das doenças mais comuns e com maior impacto económico na indústria avícola em todo o mundo. Esta doença causa anualmente uma perda global de mais de 2,4 mil milhões de dólares na indústria avícola [4]. Atualmente, existem 11 coccidiostáticos diferentes aos quais foram concedidas 25 autorizações distintas para espécies distintas, sob determinadas condições de utilização (Regulação Europeia (CE) nº 1831/2003, Anexo I: Lista de aditivos) [5].

Embora a utilização de coccidiostáticos seja economicamente viável e bem-sucedida, o seu uso na alimentação animal resultou em problemas como desenvolvimento de espécies de *Eimeria* resistentes a estes compostos e contaminação dos produtos aviários com resíduos destes, o que pode desencadear reações adversas em consumidores com hipersensibilidade. Além disso, nos países europeus, o uso profilático de coccidiostáticos como aditivos alimentares para a alimentação animal tem sido estritamente limitado desde 2006 [4].

Para além das razões acima apresentadas, num documento de posicionamento, a FVE aponta que os coccidiostáticos ionóforos poderão ser usados no futuro, para o controlo do cancro, havendo estudos que atribuem à monensina um efeito inibidor na propagação de células cancerígenas nos rins [6]. O potencial dos coccidiostáticos no controlo do cancro em humanos, poderá implicar grandes restrições ao seu uso na alimentação animal.

Sendo assim, várias classes de alternativas naturais têm sido propostas e investigadas quanto ao seu potencial para substituir esses compostos. Nos últimos anos, os fitobióticos têm sido discutidos como uma alternativa promissora devido às suas propriedades antimicrobianas, tendo também sido demonstrado o seu efeito como promotores de crescimento em diversos estudos [4]. A obtenção de fitobióticos pode ser alcançada através da utilização de subprodutos da indústria agroalimentar, promovendo uma economia circular. Sendo assim, integrado no estágio curricular na empresa Ovargado S.A., o objetivo deste trabalho é a utilização de subprodutos de *Satureja montana*, provenientes da empresa Ervital, como promotores de crescimento e/ou possíveis substitutos dos coccidiostáticos em formulações para frangos de carne.

1.1. Ovargado, S.A.

No âmbito do Mestrado em Bioquímica Alimentar na Universidade de Aveiro, surge a empresa onde está a ser realizado o meu estágio curricular, a Ovargado S.A., uma empresa que se insere no ramo da alimentação animal e que fica localizada no concelho de Ovar. A Ovargado é uma empresa com décadas de conhecimento no setor agroalimentar, contando com mais de 30 anos de experiência na produção de alimentos para todas as espécies zootécnicas terrestres.

É constituída por duas unidades fabris, como pode ser observado pela **Figura 2**, que produzem alimentos farinados, granulados, extrudados e multi-particulados. A primeira unidade fabril (imagem do lado esquerdo) é responsável pelo fabrico de alimentos compostos e misturas de cereais para animais destinados ao consumo humano, isto é, aves, bovinos, suínos, ovinos, coelhos e a segunda unidade fabril (imagem do lado direito) é responsável pela produção de alimentos compostos para animais de companhia, isto é, cães, gatos, pássaros e roedores. Desde julho de 2019, é uma empresa com certificação FSSC 22000 na sua unidade de produção de alimentos para animais de companhia.



Figura 2 - Unidades fabris da Ovargado, S.A. (Fonte: <http://ovargado.com/>).

A Ovargado tem registadas e comercializa uma série de marcas próprias de entre as quais se destacam: Internutri, Avipar, Bricopet, Bobby & Tareco, Hiperpet e Lavoura. Também dispõe de uma área comercial com produtos em armazém relacionados com as áreas *pet food*, pecuária e horta-jardim para a venda a público e revenda, chamada de PetPlanet, que fica também situada no concelho de Ovar.

1.2. Frangos de carne

A pecuária é um setor que está em constante crescimento, contribuindo com 40 % do valor global da produção agrícola atual, servindo como meio de subsistência de quase 1,3 mil milhões de pessoas. Em todo o mundo, em 2014 foram produzidas mais de 100 milhões de toneladas de carne de frango, um aumento de 40 milhões de toneladas face a 2000 [7]. Estes níveis de produção mundial são sustentados principalmente por grandes produções, onde os frangos de carne (*Gallus gallus domesticus*, penas brancas e pele amarelada) são frequentemente alojados em locais de elevada densidade animal, sendo criados especificamente para consumo humano. O principal objetivo dos produtores de carne é o aumento do peso dos animais, de modo a que estes estejam rapidamente preparados para o abate [8].

A indústria avícola é uma das principais fontes mundiais de alimento, particularmente, a nível de proteínas e gorduras. A procura crescente por carne de frango está relacionada com o aumento da população mundial e com o facto de que a produção deste tipo de carne é mais barata e rentável do que outros tipos. Embora o fornecimento mundial de carne tenha aumentado, ainda existem fatores que limitam o progresso desta indústria [9].

1.2.1. Sistema digestivo

Nas aves, o sistema digestivo consiste numa estrutura tubular longa, que começa no bico e termina com a cloaca na região abdominal (**Figura 3**). Este sistema é responsável pela ingestão de alimento, a decomposição em nutrientes e a sua absorção na corrente sanguínea e a eliminação de resíduos não aproveitados desse processo. O pâncreas e o fígado são órgãos acessórios do trato gastrointestinal (TGI). O fígado produz biliar e está associado ao metabolismo de nutrientes. A principal função do pâncreas é a produção de enzimas digestivas e de hormonas [10].

Os frangos são animais que apresentam um sistema digestivo monogástrico, isto é, o estômago apresenta uma estrutura simples que consiste num único compartimento, enquanto que no caso dos poligástricos, este é multicavitário e bastante diferenciado, distinguindo-se 4 partes. As aves, no entanto, distinguem-se de outros animais monogástricos, pois o seu sistema digestivo inclui órgãos, como o papo e a moela, que não são encontrados noutras espécies [11].

Segundo Bertechini (1991) os animais monogástricos são caracterizados por várias particularidades digestivas e alimentares, nomeadamente: (i) a capacidade de armazenamento de alimentos é reduzida e, como consequência, devem ter acesso contínuo à alimentação; (ii) a taxa de passagem dos alimentos no TGI é relativamente rápida e desta forma, os nutrientes devem estar prontamente disponíveis para serem aproveitados; (iii) baixa capacidade de digerir materiais fibrosos devido à reduzida microflora existente no trato digestivo; (iv) pequena capacidade de síntese gastrointestinal e como consequência, todos os nutrientes exigidos para o máximo desempenho devem estar presentes na dieta; (v) a digestão dos alimentos faz-se por intermédio de enzimas digestivas produzidas pelo animal [12].

As aves não mastigam o alimento na boca, ao contrário de muitas outras espécies (como por exemplo os suínos), pois não possuem dentes, no entanto, possuem um divertículo chamado papo que humidifica e amolece o alimento. De seguida, após passar pelo proventrículo, o bolo alimentar atinge a moela, também chamada de estômago muscular devido aos potentes músculos que auxiliam na desintegração dos alimentos, preparando o bolo alimentar para a digestão intestinal. É neste órgão que ocorre a digestão gástrica das proteínas. Já a digestão de hidratos de carbono (HCs) é quase nula, pois as enzimas responsáveis pela sua hidrólise são inibidas a pH ácido (por exemplo, amílase). Pode ocorrer alguma fermentação residual de HCs pela atuação de *Lactobacillus* [12].

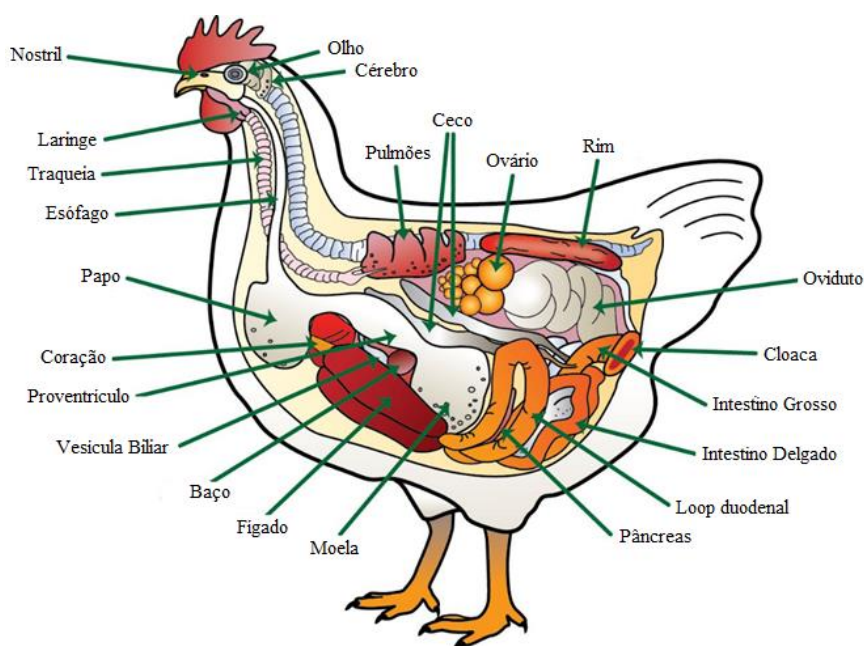


Figura 3 – Principais órgãos constituintes de *Gallus gallus domesticus*. (Adaptada de: <http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/digestive-system/>).

O intestino delgado tem várias funções muito importantes: (i) produz uma série de enzimas envolvidas no processo digestivo; (ii) é o local de grande parte da digestão dos alimentos, sendo responsável pela digestão final de HCs, lípidos e proteínas; (iii) é o local de maior da absorção de nutrientes [10], [12].

O intestino grosso tem como função primária a excreção de resíduos alimentares não aproveitados no intestino delgado, no entanto, neste compartimento ocorre também uma elevada absorção de água, eletrólitos e a fermentação de HCs complexos. Esta fermentação é realizada por MOs anaeróbicos que produzem vitaminas, ácidos gordos de cadeia curta e aminoácidos. As aves são também capazes de digerir até 25 % da fibra presente na ração, dependendo da composição da estrutura da parede celular, da adição de probióticos e de enzimas exógenas [12]. O intestino grosso termina com a cloaca. Esta é uma cavidade tubular que se abre para o exterior do corpo e é comum tanto ao trato digestivo como urogenital [10].

1.2.2. Necessidades nutricionais

A absorção de nutrientes é um elemento-chave no funcionamento normal do animal, consequentemente, a dieta deve ser de boa qualidade e consistir em ingredientes de fácil digestão. Nas produções intensivas, existem também outros parâmetros a considerar, como a ausência de fatores anti-nutricionais ou tóxicos, a palatabilidade e os custos [13].

Os ingredientes que compõem a dieta das aves, juntamente com a água, fornecem a energia e os nutrientes essenciais para o seu crescimento e reprodução. A energia necessária para manter o metabolismo geral dos frangos de carne e acompanhar o seu rápido crescimento é fornecida pelos componentes alimentares que produzem energia, principalmente HCs e gorduras, mas também proteínas [14].

Na **Tabela 1** e na **Tabela 2** estão resumidas as necessidades nutricionais dos frangos de carne a nível industrial, isto é, cujo abate se procederá até aos 42 dias de idade. Os níveis indicados são aceitáveis para frangos com um crescimento diário em torno de 61-66 g/dia [15].

Tabela 1 - Necessidades nutricionais para frangos de carne de produção industrial
(Adaptada de Necesidades Nutricionales para Avicultura: Normas FEDNA 2ª edición [15]).

		Iniciação (0 a 14d)	Crescimento (15 a 23d)	Acabamento (24 a 36d)	Retirada (>37d)
Peso vivo inicial	g	42	480	1.082	2.239
Peso final	g	480	1.082	2.239	2.997
EMAn	kcal/kg	2.950	3.050	3.100	3.120
Fibra bruta, mín.-máx.	%	2,85-3,87	3,0-4,1	3,05-4,3	3,05-4,4
Ác. Linoleico, mín.-máx.	%	0,8-livre	0,6-livre	0,6-2,6	0,5-2,3
Proteína bruta mín.	%	21,2	20,0	18,5	17,5
Aminoácidos digeríveis					
Lisina dig.	%	1,22	1,10	1,00	0,92
Metionina dig.	%	0,49	0,45	0,41	0,38
Metionina+cisteína dig.	%	0,90	0,84	0,76	0,70
Treonina dig.	%	0,79	0,73	0,66	0,61
Triptofano dig.	%	0,21	0,20	0,18	0,17
Isoleucina dig.	%	0,82	0,75	0,68	0,63
Valina dig.	%	0,96	0,87	0,79	0,73
Arginina dig.	%	1,28	1,17	1,06	0,98
Glicina equivalente dig. ¹	%	1,54	1,30	1,18	1,09
Aminoácidos totais					
Lisina total	%	1,38	1,25	1,13	1,04
Metionina total	%	0,55	0,51	0,46	0,43
Metionina+cisteína total	%	1,02	0,95	0,86	0,79
Treonina total	%	0,90	0,83	0,75	0,69
Triptofano total	%	0,23	0,23	0,20	0,19
Isoleucina total	%	0,92	0,85	0,77	0,71
Valina total	%	1,08	0,99	0,89	0,82
Arginina total	%	1,45	1,33	1,20	1,10
Glicina equivalente total	%	1,74	1,48	1,34	1,23
Cálcio, mín.-máx.	%	0,98-1,05	0,90-0,95	0,75-0,85	0,70-0,80
Fósforo total	%	0,66	0,58	0,56	0,52
Fósforo disponível	%	≥0,48	0,43	0,38	0,35
Fósforo digerível	%	0,45	0,40	0,34	0,32
Cloro, mín.-máx.	%	0,17-0,27	0,17-0,28	0,16-0,32	0,15-0,32
Sódio, mín.-máx.	%	0,19-0,23	0,17-0,20	0,16-0,19	0,15-0,18
Potássio, mín.-máx.	%	0,51-1,15	0,50-1,10	0,46-1,05	0,40-1,00

¹Glicina equivalente = Gly (%) + 0,7143 Ser (%)

Tabela 2 - Recomendações de vitaminas e oligoelementos para frangos de carne
(Adaptada de Necesidades Nutricionales para Avicultura: Normas FEDNA 2ª edición)

		0 a 14 dias		14 a 36 dias		36 a 44 dias	
		Recom.*	Intervalo	Recom.*	Intervalo	Recom.*	Intervalo
Vitamina A	10 ³ UI ¹	10	9-15	9	7-10	7	6-8
Vitamina D3	10 ³ UI ¹	3,5	3-4,5	3	2,4-3,8	2,5	2,0-3,4
Vitamina E	UI ¹	25	20-50	25	15-40	20	12-30
Vitamina K3	mg/kg	2,5	2-3,5	2,2	1,8-3	1,8	1,2-2
Tiamina (B1)	mg/kg	2,0	1-3	1,5	0,6-2	0,6	0,3-2
Riboflavina (B2)	mg/kg	6,5	5-8	5,5	4-7	3,1	2-5
Piridoxina (B6)	mg/kg	3,0	2,3-4,5	2,5	2,5-3,6	1,0	1-2
Cobalamina (B12)	µg/kg	16	16-23	15	12-18	11	10-13
Ácido fólico	mg/kg	1	1-1,6	0,8	0,7-1,1	0,45	0,3-0,5
Niacina	mg/kg	45	40-65	35	30-45	21	15-25
Ácido pantoténico	mg/kg	12	10-16	11	10-13	8	6-10
Biotina (H)	mg/kg	130	90-180	100	70-130	30	10-30
Colina total	mg/kg	1.250	---	1.200	---	1.100	---
Colina adicionada	mg/kg	270	270-400	230	160-310	160	80-180
Ferro	mg/kg	33	20-50	30	15-40	25	15-30
Cobre	mg/kg	8	5-10	7	5-8	5	4-8
Zinco	mg/kg	75	60-80	65	55-80	55	45-65
Manganês	mg/kg	90	70-120	70	65-105	65	55-80
Selénio	mg/kg	0,34	0,30-0,35	0,34	0,25-0,35	0,34	0,25-0,35
Iodo	mg/kg	1,1	0,6-1,3	0,85	0,6-1,0	0,55	0,5-0,9

[15]).

*Recomendável; ¹Unidades internacionais.

Necessidades energéticas

A energia não é um nutriente, mas sim a capacidade calorífica de cada nutriente. Os nutrientes produzem energia quando são oxidados durante o metabolismo. As proteínas e os hidratos de carbono apresentam um valor calorífico de 4 kcal/g, enquanto que os lípidos apresentam um valor calorífico de 9 kcal/g. O valor energético de uma dieta pode ser expresso de diversas formas, no entanto, o método mais comum para expressar o conteúdo energético da ração para frangos de carne é através do nível de Energia Metabolizável Aparente corrigida pelo balanço de nitrogénio (EMAn) [14], [15].

A energia metabolizável aparente (EMA) é equivalente à subtração da energia do alimento consumido pela energia contida nas fezes, na urina e nos produtos gasosos obtidos

da digestão. Para aves, os produtos gasosos são, geralmente, insignificantes; portanto, a EMA representa a energia da ração menos a energia dos excrementos. Uma correção para o nitrogénio retido no corpo é geralmente aplicada para produzir um valor de EMA corrigido pelo balanço de nitrogénio (EMAn) [14]. Em produções industriais intensivas de frangos, não é convencional utilizar alimentos com menos de 2,950 kcal EMAn/kg na iniciação, podendo ir até 3,050 kcal EMAn/kg no acabamento (**Tabela 1**), pois a utilização de alimentos com níveis inferiores de EMAn reduziriam o crescimento diário e aumentariam o índice de conversão alimentar. Este índice consiste no coeficiente entre a quantidade média diária de ração ingerida pelos animais e o seu ganho médio diário de peso. Um aumento no índice de conversão alimentar significa que o desempenho dos animais foi menos eficaz pois foi consumida mais ração para a produção de um quilo de frango [15].

Necessidades em proteína bruta e aminoácidos

Tem havido debate crescente em relação ao teor de proteína bruta (PB) nos alimentos compostos para frangos de carne, com vários autores a defender uma redução do teor de proteína, aliada a uma suplementação adequada e a um maior equilíbrio nos teores de aminoácidos (AA) que fazem parte da sua composição. Portanto, os níveis de PB podem reduzir-se de forma considerável, quando a formulação apresenta elevados níveis de aminoácidos digeríveis. De facto, não se observam efeitos negativos na produtividade de frangos quando se utiliza alimentos equilibrados em AA com níveis de proteína bruta inferiores aos valores tabelados para cada etapa de desenvolvimento [15].

Os aminoácidos obtidos a partir da dieta são utilizados pelas aves para desempenhar uma diversidade de funções. Por exemplo, os aminoácidos são constituintes primários das enzimas dos tecidos estruturais e protetores, como pele, penas, matriz óssea e ligamentos, bem como dos tecidos moles, incluindo órgãos e músculos. Além disso, aminoácidos e pequenos peptídeos resultantes da absorção do processo digestivo podem também servir como precursores de muitos constituintes não-proteicos importantes no corpo. Como as proteínas do corpo estão num estado dinâmico, com a síntese e a degradação a ocorrer continuamente, é necessária uma ingestão adequada de aminoácidos na dieta. Se a proteína da dieta é inadequada, há uma redução ou interrupção do crescimento ou da produtividade. Nutricionalmente, os aminoácidos podem ser divididos em duas categorias: aqueles que as aves não conseguem sintetizar ou que não conseguem sintetizar com rapidez suficiente para

atender às necessidades metabólicas (**essenciais**) e aqueles que podem ser sintetizados a partir de outros aminoácidos (**não essenciais**). Os aminoácidos essenciais devem ser fornecidos pela dieta. A presença de quantidades adequadas de aminoácidos não essenciais na dieta reduz a necessidade de sintetizá-los a partir de aminoácidos essenciais [14]. Bedford e Summers estimaram que a fim de manter produtividades ótimas, em frangos de carne, a relação entre AA essenciais e AA não essenciais do alimento deve estar em torno de 55:45 [15].

As necessidades em proteínas e aminoácidos variam consideravelmente de acordo com o estado produtivo da ave. Como se pode observar pela **Tabela 1**, todos os aminoácidos são necessários em maiores percentagens na fase de crescimento, enquanto que as necessidades no período de acabamento diminuem. São necessárias concentrações relativamente elevadas de aminoácidos na dieta para suportar o rápido crescimento dos frangos de carne. O peso corporal deste tipo de frangos aumenta 50 a 55 vezes, 6 semanas após a eclosão, sendo esse aumento de peso acompanhado pela formação de uma elevada quantidade de tecido muscular e, por isso, as necessidades dos animais em PB são mais elevadas na fase de crescimento [14].

Necessidades em fibra dietética

A fibra dietética (FD) consiste numa mistura complexa de polissacarídeos não amiláceos (PNA), tipicamente encontrados na parede celular das plantas e capazes de se associarem a uma variedade de outros compostos, nomeadamente, proteínas, lenhinas, ácidos gordos ou ceras. Os efeitos fisiológicos da FD estão implicitamente ligados à sua estrutura e às interações químicas que estabelece, sendo a propriedade com maior relevância, a solubilidade. É a partir desta que se faz a principal divisão na FD, distinguindo-se entre PNA solúveis e PNA insolúveis [16].

As necessidades do frango em fibra são ainda objeto de estudo e não se encontram bem definidas. Os frangos são animais granívoros e, portanto, o seu aparelho digestivo está preparado para processar alimentos moderadamente ricos em fibra [15]. A FD proporciona um efeito estimulante na moela, em particular pela fibra mais insolúvel, e tem também efeitos benéficos sobre a microflora [16]. Por outro lado, a presença de fibra aumenta o tempo de permanência no TGI, permitindo uma melhor digestão da ração e a ocorrência de fermentação microbiana, principalmente pelas espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* que

são responsáveis pela produção de ácido láctico e ácidos gordos de cadeia curta. Isso promove um pH baixo, que mantém a população normal de microrganismos no trato gastrointestinal, impedindo o crescimento de *Salmonella* e de outros MOs patogénicos transmitidos pelos alimentos, pelo contacto com animais doentes e pelo contacto com dejetos [17].

Alimentos excessivamente baixos em fibra (< 3,0 %) retardam o desenvolvimento da moela e prejudicam a motilidade e a saúde intestinal das aves. Por outro lado, um excesso de fibra também pode ser prejudicial. As fontes de fibra solúvel em excesso, tal como a polpa de beterraba, tendem a reduzir o consumo de alimento, devido à sua elevada capacidade de retenção de água [15].

Não é aconselhável traçar limites estreitos para as necessidades do frango em fibra insolúvel, já que os seus efeitos sobre a produtividade variam consoante o estado de saúde do animal e as condições de manejo, principalmente, o estado das camas. As camas consistem numa mistura de material absorvente usado no piso do local de alojamento dos animais mais o material excretado pelas aves (dejetos, penas, restos de ração, água dos bebedouros, etc.). Por essa razão, quando a incidência de camas húmidas é baixa, as necessidades em fibra insolúvel aumentam, podendo ser recomendado ultrapassar 3-4 % no alimento [15].

Na indústria de alimentação animal é mais comum a utilização do conceito de fibra bruta. Esta consiste na porção de hidratos de carbono totais resistentes ao tratamento sucessivo com ácido e base diluídos, sendo a maior parte consistida por celulose. Na **Tabela 1** encontram se apresentadas as necessidades dos frangos de carne em fibra bruta, sendo que, à medida que os animais vão crescendo e o TGI se desenvolve, as necessidades de fibra bruta vão aumentando.

Necessidades em ácido linoleico e gordura

Na literatura, não são apresentadas necessidades específicas dos frangos em gordura, no entanto, na produção industrial, estão definidos valores aconselháveis para lípidos insaturados, principalmente para o ácido linoleico. No entanto, a inclusão de gorduras nos alimentos compostos é fundamental para permitir a absorção de vitaminas e outros compostos lipossolúveis. Por outro lado, apresenta também efeitos benéficos na palatabilidade e na formação de *pellets*, reduzindo perdas de alimento (através da aglomeração de “finos”) [15]. Para além disso, esta é também adicionada à ração para

aumentar a concentração geral de energia e, por sua vez, melhorar a produtividade dos animais. A oxidação de gordura é um meio eficiente para as células obterem energia em grandes quantidades, sendo que, a acumulação de lipídios ocorre maioritariamente no tecido adiposo; no entanto, a multiplicação celular também requer uma matriz de lípidos para formar as membranas celulares. Esses dois usos podem ocorrer simultaneamente; no entanto, a extensão de cada um pode variar consideravelmente [14].

O ácido linoleico (18:2, n-6) e o ácido α -linolénico (18:3, n-3) são reconhecidos como ácidos gordos metabolicamente essenciais. A posição das ligações duplas nesses ácidos gordos polinsaturados é única, uma vez que as aves não possuem os mecanismos necessários para formar essas ligações. Estes ácidos gordos essenciais são convertidos em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa através de uma série de etapas de dessaturação (adição de uma ligação dupla) e alongamento (alongamento da cadeia com 2 carbonos). Estes ácidos gordos polinsaturados derivados dos ácidos linolénico e α -linolénico são precursores dos eicosanóides, que são classificados em prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Estes compostos são importantes no desenvolvimento embrionário, reprodução, respostas imunológicas e desenvolvimento ósseo [14].

A necessidade de ácido α -linolénico ainda não foi determinada para as aves, sendo o ácido linoleico o único ácido gordo essencial para o qual estão tabelados valores na dieta [14]. As necessidades mínimas em ácido linoleico para frangos em iniciação e crescimento são de 0,6 %. Já para frangos de acabamento varia entre 0,5 e 2,6 % (**Tabela 1**).

Necessidades em minerais

Os minerais constituem a parte inorgânica dos alimentos. Geralmente, são divididos em duas categorias, com base na quantidade necessária na dieta: os macrominerais e os oligoelementos. As necessidades em macrominerais são, normalmente, declaradas como uma percentagem da dieta (**Tabela 1**), enquanto as necessidades em oligoelementos são expressas em miligramas por quilograma de dieta ou em partes por milhão (**Tabela 2**) [14].

Os macrominerais como o cálcio e o fósforo são essenciais para a formação e manutenção do esqueleto. Outras funções do cálcio incluem papéis na coagulação do sangue e como mensageiro secundário em comunicações intracelulares. O fósforo, por sua vez, também é necessário para o metabolismo energético e nos componentes estruturados das células. Exemplos de compostos contendo fósforo são o 5'-trifosfato de adenosina (ATP) e

os fosfolípidos. Essas formas de fósforo, quando presentes nas plantas, podem ser digeridas pelas aves; no entanto, essas formas digeríveis geralmente representam apenas 30 a 40 % do fósforo total. O fósforo restante está presente na dieta complexado com o fitato (fósforo fítico), e é pouco digerível. Apenas cerca de 10 % do fósforo fítico presente no milho e no trigo é absorvido pelas aves. Outros minerais, como o sódio, o potássio, o magnésio e o cloro funcionam com os fosfatos e o bicarbonato para manter a homeostase das relações osmóticas e do pH em todo o corpo do animal. Já os oligoelementos são particularmente importantes como co-fatores enzimáticos [14].

Um excesso de cálcio na dieta interfere na disponibilidade de outros minerais, pois pode atuar como um antagonista, dificultando a absorção de fósforo, magnésio, manganês e zinco [18]. Uma razão de aproximadamente 2 de cálcio para 1 de fósforo não-fítico é apropriada para a maioria das dietas para aves, uma vez que o cálcio e o fósforo formam complexos no intestino, tornando o fósforo menos disponível e dificultando a sua absorção [14].

O sódio e o cloro também são essenciais para todos os animais. As concentrações de sal usadas nos alimentos compostos estão, geralmente, otimizadas para a taxa máxima de crescimento. Concentrações mais elevadas levam ao consumo excessivo de água e a problemas decorrentes do controle da ventilação e fezes húmidas [14].

Oligoelementos, incluindo o cobre, o iodo, o ferro, o manganês, o selênio e o zinco são necessários em pequenas quantidades na dieta (**Tabela 2**). O cobalto também é necessário sendo obtido através da suplementação com vitamina B12 [14].

Da mesma maneira que os aminoácidos, os oligoelementos e os macrominerais também são necessários em maiores quantidades na fase de crescimento dos frangos de carne, diminuindo, embora que ligeiramente, nas fases de acabamento e retirada (**Tabela 1** e **Tabela 2**). Esse nível mais elevado de minerais na fase inicial e de crescimento dos frangos, é essencial para assegurar uma boa formação do esqueleto. A suplementação mineral inadequada durante a fase de crescimento, resulta em desequilíbrio na homeostase mineral e no desenvolvimento inadequado dos ossos [18].

Necessidades em vitaminas

As vitaminas são geralmente classificadas em dois grupos: vitaminas solúveis em gordura, A, D, E e K, e vitaminas solúveis em água, que incluem o chamado complexo B e a vitamina C. A vitamina C, ou ácido ascórbico, é sintetizada pelas aves e, conseqüentemente, não é considerada um nutriente essencial na dieta [14].

As necessidades dietéticas para a maioria das vitaminas são geralmente dadas em termos de miligramas por quilograma de dieta (**Tabela 2**). As exceções são as vitaminas A, D e E, para as quais as necessidades dietéticas são, geralmente, declaradas em unidades internacionais (UI), uma vez que a sua suplementação é frequentemente efetuada através de moléculas precursoras, para as quais as UI permitem a medição da atividade biológica [14].

As necessidades em vitamina A são expressas em unidades internacionais por quilograma de dieta. Os padrões internacionais para a atividade de vitamina A são: 1 UI de vitamina A = atividade de vitamina A de 0,30 µg de álcool cristalino de vitamina A (retinol), 0,34 µg de acetato de vitamina A ou 0,55 µg de palmitato de vitamina A. Uma UI de atividade da vitamina A é também equivalente à atividade de 0,60 µg de β-caroteno.

A vitamina D para aves deve estar na forma de vitamina D₃, que é encontrada naturalmente no óleo de fígado de peixe ou pode ser sintetizada por irradiação do colesterol animal. Uma UI de vitamina D₃ é definida como a atividade de 0,025 µg de vitamina D₃ (colecalfiferol).

A necessidade na dieta de vitamina E é altamente variável e depende: (i) da concentração e do tipo de gordura presente na dieta; (ii) da concentração de selênio; (iii) da presença de pro-oxidantes e antioxidantes. Uma UI de vitamina E é a atividade de 1,00 mg de acetato de DL-α-tocoferol sintético, 0,73 mg de acetato de D-α-tocoferol, 0,67 mg de D-α-tocoferol ou 0,91 mg de DL-α-tocoferol.

A atividade da vitamina K é exibida por vários compostos sintéticos e naturais, com solubilidades variadas em gordura e água. A menadiona (vitamina K₃) é um composto sintético solúvel em gordura que pode ser considerado o padrão de referência para a atividade da vitamina K. Na **Tabela 3** estão apresentadas as principais funções que cada vitamina exerce no metabolismo dos frangos de carne. Assim como para os minerais, as vitaminas também são necessárias em maior quantidade durante a fase de crescimento (**Tabela 2**).

Tabela 3 – Resumo das funções desempenhadas pelas vitaminas nos frangos de carne [19], [20].

Vitamina	Função
Vitamina A	Atua no crescimento, saúde ocular e superfícies húmidas do corpo
Vitamina D	Essencial para a utilização de cálcio e fósforo no desenvolvimento ósseo
Vitamina E	Atua como antioxidante e ajuda a manter uma estrutura cerebral normal
Vitamina K	Atua no mecanismo de coagulação sanguínea
Vitamina B1	Ajuda na digestão e na manutenção do apetite; para além disso, atua na preservação da saúde dos nervos
Vitamina B2	Cofator de enzimas envolvidas no metabolismo de HCs, gorduras e proteínas; Atua como um intermediário nas reações de oxidação-redução; Auxilia na formação de ATP
Vitamina B12	Cofator enzimático em reações que envolvem transferência ou síntese de unidades de carbono; promove a síntese de glóbulos vermelhos e ajuda a manter a integridade do sistema nervoso
Ácido fólico	Atua no metabolismo de AA e ácidos nucleicos (necessários para a divisão celular); participa em reações de transferência de unidades de 1 carbono
Ácido pantoténico	É um constituinte de duas coenzimas importantes: coenzima A e proteína de transporte de grupos acil, que estão envolvidas no metabolismo de HC, proteínas e lípidos e na síntese de lípidos, neurotransmissores e hormonas
Piridoxina	Desempenha um papel essencial na interação do metabolismo de AA, HC e ácidos gordos com o ciclo de produção de energia (ciclo de Krebs)
Colina	Essencial para a manutenção da estrutura celular (é uma parte estrutural da fosfatidilcolina e esfingomielinas); essencial para a formação de acetilcolina (substância que possibilita a transmissão de impulsos nervosos)
Biotina	Coenzima essencial no metabolismo de HC, gorduras e proteínas
Niacina	A sua principal função é nas formas de coenzima da nicotinamida: NAD e NADP; as enzimas que contêm NAD e NADP participam em reações metabólicas de fornecimento de energia

Necessidade em água

A água é considerada um nutriente essencial, e as suas necessidades dependem de vários fatores como, a temperatura ambiente, a humidade relativa, a composição da dieta, a taxa de crescimento e a eficiência de reabsorção renal da água. De modo geral, considera-se que as aves ingerem aproximadamente o dobro da água face à quantidade de alimento consumido [14].

1.2.3. Matérias-primas utilizadas na alimentação de frangos de carne

A produção de alimentos compostos destinados à avicultura serve-se de uma vasta gama de diferentes matérias-primas, com o objetivo de responder às suas necessidades nutricionais. Este grupo envolve cereais, subprodutos de cereais, bagaços de oleaginosas, farinha de bolacha, aditivos alimentares, entre outros. Na **Tabela 4** está representado o perfil nutricional de algumas matérias-primas comuns na alimentação de frangos de carne.

O conceito de cereal engloba todas as espécies de gramíneas, cultivadas pelas suas sementes, como o milho, o trigo e a cevada. Os grãos dos cereais possuem uma quantidade de proteína baixa e uma quantidade elevada de hidratos de carbono, principalmente amido. A aveia é um dos cereais mais ricos em proteína e em lisina, contudo, o seu uso em avicultura é reduzido. A principal desvantagem do uso de aveia é o elevado teor de fibra, relativamente a outros cereais. Esta fibra é particularmente rica em β -glucanas e pode provocar um aumento da viscosidade no trato gastrointestinal das aves, resultando numa diminuição da ingestão de alimento e da absorção de outros nutrientes, afetando, principalmente, o crescimento de aves jovens.

As fontes de proteína vegetal usadas na alimentação de frangos são principalmente os bagaços de oleaginosas, como a soja, o girassol e a colza. Os bagaços de colza e girassol são uma boa fonte de proteína (33,8 % e 30 % PB, respetivamente), ricos em metionina e cisteína. Estes subprodutos, no entanto, têm um teor de fibra muito elevado, o que condiciona a sua utilização na alimentação aviária.

A soja integral, previamente processada por calor, também é muito utilizada na alimentação de frangos de carne, pois possui uma elevada quantidade de proteína, como pode ser visto pela **Tabela 4**, que por sua vez é rica em lisina, permitindo compensar as carências deste aminoácido nos cereais.

Subprodutos da indústria alimentar humana, como os subprodutos de cereais, a farinha de bolacha e o melaço de cana-de-açúcar são também frequentemente utilizados na alimentação destes animais. Os subprodutos de cereais incluem sêmea de arroz e sêmea de trigo, que são provenientes das moagens do trigo e do arroz. Estes são boas fontes de minerais e fibra, sendo também mais ricos em proteína do que os cereais, mas a remoção do amido torna-os menos energéticos. A farinha de bolacha obtém-se de desperdícios da

indústria de panificação e pastelaria, e o melaço de cana-de-açúcar, consiste no resíduo que permanece nas cubas após a extração da maioria dos açúcares de cana.

Para além disso, é também utilizada uma ampla gama de aditivos alimentares, que são incluídos, principalmente, para melhorar a eficiência de crescimento, prevenir doenças e aprimorar a utilização de alimentos. Estes aditivos estão divididos em quatro categorias:

- **Aditivos tecnológicos**, que incluem os seguintes grupos funcionais: (a) conservantes; (b) antioxidantes; (c) emulsionantes; (d) estabilizantes; (e) espessantes; (f) gelificantes; (g) aglutinantes; (h) substâncias para o controlo da contaminação por radionuclídeos; (i) antiaglomerantes; (j) reguladores de acidez; (k) aditivos de silagem; (l) desnaturantes; (m) substâncias para a redução da contaminação dos alimentos para animais por micotoxinas; (n) melhoradores das condições de higiene; (o) outros aditivos tecnológicos.
- **Aditivos organoléticos**, que apresentam os seguintes grupos funcionais: (a) corantes; (b) compostos aromatizantes.
- **Aditivos nutritivos**, nos quais se incluem os seguintes grupos funcionais: (a) vitaminas, pró-vitaminas e substâncias quimicamente bem definidas de efeito semelhante; (b) compostos de oligoelementos; (c) aminoácidos, os seus sais e análogos; (d) ureia e seus derivados.
- **Aditivos zootécnicos**, que incluem os seguintes grupos funcionais: (a) melhoradores de digestibilidade; (b) estabilizadores da flora intestinal; (c) substâncias que afetam favoravelmente o ambiente; (d) outros aditivos zootécnicos; (e) estabilizadores da condição fisiológica.
- **Coccidiostáticos e histomonostáticos.**

Tabela 4 – Constituintes nutricionais das principais matérias-primas que integram a composição dos alimentos compostos para frangos de carne
(Fonte: <http://www.fundacionfedna.org/ingredientes-para-piensos>).

Matéria-prima	Proteína Bruta (%)	Fibra (%)	Matéria Gorda (%)	Amido (%)	Açúcares (%)
Milho	7,3	2,1	3,3	63,8	1,7
Trigo	11,2	2,4	1,4	60,4	1,5
Cevada	9,6	4,7	1,7	52,5	1,6
Aveia	9,9	12,8	4,9	36,1	1,5
Soja integral	37,0	9,3	18	0	6,0
Bagaço de colza	33,8	12,4	2,2	0	8,0
Bagaço de girassol	30,0	23,3	1,5	1,8	4,1
Bagaço de soja	44,0	5,9	1,9	0,5	7,0
Sêmea de Trigo	15,1	9,8	3,5	19,7	3,2
Sêmea de Arroz	13,8	7,7	13,9	27,0	5,0
Farinha de Bolacha	10,2	2,2	7,7	46	11,3
Melaço de cana de açúcar	4,3	0	0,1	0	46,0

1.3. Utilização de coccidiostáticos em formulações para frangos

Numa indústria que produz aproximadamente 40 mil milhões de frangos anualmente, a coccidiose resulta em perdas económicas anuais de aproximadamente 2,4 mil milhões de euros, distribuídas pelos impactos diretos da mortalidade e da morbilidade, custos de prevenção e tratamento da doença. A coccidiose é uma das principais causas de mortalidade, baixo desempenho e perda de produtividade na avicultura. Aspetos associados às formas de produção intensivas, principalmente a elevada densidade animal, auxiliam a dispersão do parasita [9].

1.3.1. Coccidiose

A coccidiose é uma doença parasitária provocada por várias espécies do parasita protozoário do género *Eimeria* (família *Eimeriidae*), pertencente ao filo Apicomplexa. Este filo compreende muitos membros de doenças parasitárias em humanos e animais com uma ampla distribuição ambiental. Os organismos pertencentes a este filo são parasitas intracelulares obrigatórios caracterizados por possuírem organelos especializados únicos, principalmente aqueles dentro do complexo apical, que proporcionam a estabilidade estrutural necessária durante o processo de invasão do hospedeiro [21],[22].

As infeções não são causadas por uma única espécie de *Eimeria*, mas por uma mistura de *Eimeria spp.* Os coccídeos são específicos para cada espécie hospedeira, isto é, coccídeos que afetam frangos não afetam outros animais. Até agora, nove espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. mitis*, *E. tenella*, *E. mivati* e *E. hagani*, foram identificadas em frangos [4].

Os coccídeos desenvolvem-se em diferentes regiões do intestino e, dependendo da magnitude da infeção, podem causar lesões leves a graves. Cada espécie de parasita prolifera em locais específicos do trato gastrointestinal, por exemplo: (i) *E. acervulina* desenvolve-se nas células epiteliais da porção anterior do intestino delgado, principalmente no duodeno; (ii) *E. brunetti* fixa-se na mucosa da porção inferior do intestino delgado, ceco e reto; (iii) *E. tenella* está presente no ceco; (iv) *E. necatrix* ocorre no jejuno, íleo, ceco e outras partes do intestino grosso. Consoante o local onde se manifesta a infeção, distinguem-se três tipos de coccidiose:

- Coccidiose intestinal devido a *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. mivati*, *E. acervulina*
- Coccidiose cecal devido principalmente a *E. tenella* e *E. necatrix*
- Coccidiose retal devido a *E. brunetti* e *E. tenella* que é a espécie mais patogénica e causa doenças graves em aves [23], [24].

As espécies de *Eimeria* com elevada patogenicidade são *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*. As espécies relatadas como moderadamente patogénicas incluem *E. acervulina*, *E. mitis* e *E. mivati*, enquanto *E. praecox* e *E. hagani* são consideradas as menos patogénicas (**Tabela 5**) [25].

Tabela 5 – Principais características das espécies de *Eimeria* identificadas em frangos.

Espécie	Local de desenvolvimento	Patogenicidade	Lesões	Referência
<i>E. praecox</i>	Duodeno, jejuno	Patogenicidade reduzida	Conteúdos intestinais aquosos; Muco	[21]
<i>E. hagani</i>	Duodeno, jejuno e íleo	Patogenicidade reduzida	Petéquias e opacidades brancas no intestino delgado superior; O conteúdo intestinal pode ser cremoso ou aquoso	[26]
<i>E. mivati</i>	Duodeno, reto	Patogenicidade moderada	Petéquias vermelhas e manchas brancas redondas; Desnudar grave da mucosa	[26]
<i>E. acervulina</i>	Duodeno, íleo	Patogenicidade moderada	Enterite, causando perda de líquidos; Má absorção de nutrientes	[26]
<i>E. brunetti</i>	Ceco e reto	Patogenicidade elevada	Inflamação da parede intestinal com hemorragias pontuais; Descamação dos epitélios	[26]
<i>E. mitis</i>	Íleo	Patogenicidade moderada	Enterite, causando perda de líquidos; Má absorção de nutrientes	[26]
<i>E. necatrix</i>	Jejuno, íleo e ceco	Patogenicidade elevada	Parede cecal espessada e conteúdo sanguíneo na extremidade proximal; Distensão do ceco; Destruição das vilosidades causando hemorragia extensa e morte	[26]
<i>E. maxima</i>	Jejuno, íleo	Patogenicidade moderada-elevada	Inflamação da parede intestinal, com hemorragias pontuais; Descamação dos epitélios	[26]
<i>E. tenella</i>	Ceco	Patogenicidade elevada	O intestino pode estar inchado; Mucosa inchada e lúmen preenchido com restos de fluídos, sangue e tecidos	[26],[27]

1.3.2. Ciclo de vida dos coccídeos

Os ciclos de vida de *Eimeria* spp. são complexos, distinguindo-se dois estágios de desenvolvimento: um estágio exógeno (esporogonia) e um estágio endógeno (esquizogonia e gametogonia). O ciclo de vida de *Eimeria* encontra-se representado na **Figura 4**. Algumas espécies variam no número de gerações assexuadas e no tempo necessário para cada estágio de desenvolvimento [28].

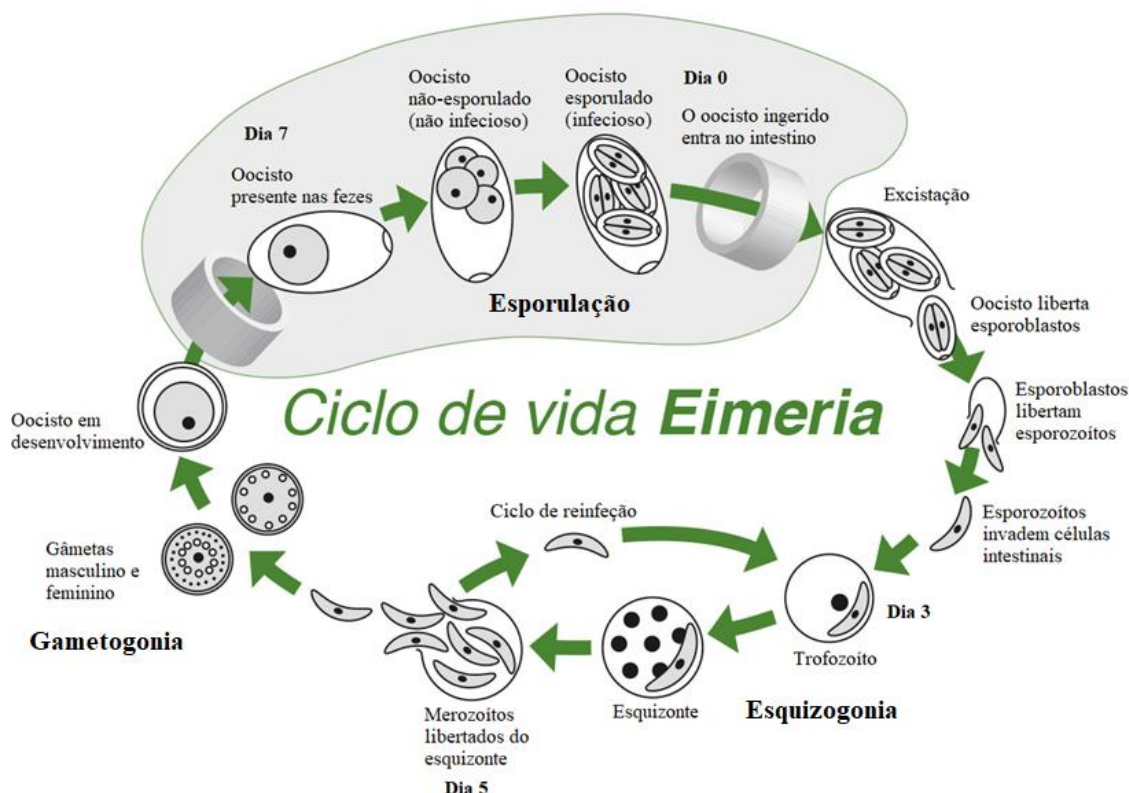


Figura 4 – Ciclo de vida de *Eimeria* spp. (Adaptada de [29]).

O oocisto (cápsula com uma parede espessa que protege o parasita) é considerado uma estrutura notavelmente dura e persistente, resistente a danos mecânicos, químicos e à degradação proteolítica [30]. Esta resistência está associada às suas duas paredes, interna e externa, compostas principalmente por proteínas, lípidos e hidratos de carbono covalentemente ligados a proteínas, em percentagens variáveis (1,5–19 %) [30].

Durante a fase exógena, os oocistos não esporulados e não infecciosos, são excretados nas fezes do frango e sofrem esporulação na presença de humidade, oxigénio e temperaturas adequadas (25-30 °C), tornando-se oocistos esporulados e infecciosos. A infeção ocorre

quando o hospedeiro ingere oocistos esporulados de *Eimeria* contendo quatro esporocistos, cada um contendo dois esporozoítos infecciosos. A fase endógena ocorre no trato gastrointestinal do animal [31], [32].

Após a ingestão, os esporocistos e os esporozoítos são libertados no intestino a partir do oocisto esporulado por excitação, um processo promovido pela presença de enzimas digestivas e sais biliares. Os esporozoítos penetram nas células intestinais para iniciar o desenvolvimento de esquizontes intracelulares assexuais. Os esquizontes desencadeiam um segundo estágio invasivo, através da produção de merozoítos [33]. Os merozoítos, podem penetrar no epitélio e propagar o estágio de esquizogonia, aumentando exponencialmente o número de células de merozoítos no estágio assexuado. Alternativamente, os merozoítos podem entrar no estágio sexual (gametogonia) de reprodução, sofrem diferenciação e ocorre a formação de microgâmetas [33].

Dependendo das espécies de coccídeos, entre duas e quatro gerações de desenvolvimento assexuado dão origem a uma fase sexual, em que pequenos microgâmetas masculinos e femininos se fundem para formar um zigoto. Após fertilização, os zigotos desenvolvem-se em oocistos não esporulados e são excretados nas fezes. A cada ciclo sucessivo, o número de oocistos no meio aumenta [32].

O curto ciclo de vida (4-7 dias, dependendo da espécie) e a produção abundante de oocistos esporulados, são características que promovem a rápida propagação da coccidiose. Como consequência, as aves infetadas desenvolvem lesões intestinais (inflamação, hemorragias, diarreia, etc.) que provocam, menor ingestão de alimento, ganho de peso prejudicado, morbidade e mortalidade [34],[35].

1.3.3. Estratégias para controlo da coccidiose

As aves produzidas em explorações, devido às condições de higiene e à elevada densidade populacional, estão particularmente suscetíveis à coccidiose. Embora uma boa higienização e a redução do número de aves possa reduzir o risco de transmissão de parasitas, são necessárias medidas adicionais para se obter um controlo completo da doença, nomeadamente: vacinação ou tratamento medicamentoso. A vacinação é relativamente cara e tende a ser usada apenas em animais reprodutores, galinhas poedeiras e aves de produção biológica. Esta abordagem, embora eficiente na prevenção da coccidiose, não apresenta efeitos promotores de crescimento nem outras melhorias de desempenho, que se verificam

nos tratamentos medicamentosos. Os principais motivos apontados pelas empresas para descartar a vacinação nos frangos são, em ordem decrescente de importância:

- Elevado custo;
- Influência negativa no desempenho do animal;
- A ausência de tratamento medicamentoso, aumenta a suscetibilidade e a incidência de infecções por clostrídios, resultando em enterite necrótica [36].

Os agentes utilizados para a prevenção e controlo de infeções por coccídeos são denominados medicamentos anticoccidianos, os quais se dividem em agentes coccidiostáticos ou coccidicidas. Os coccidiostáticos compreendem medicamentos que impedem a replicação e crescimento de populações coccidianas, enquanto que os coccidicidas incluem medicamentos que destroem as populações coccidianas. Os agentes coccidiostáticos são os mais utilizados na indústria avícola [21].

1.3.4. Tipos de coccidiostáticos e mecanismo de ação

A utilização de coccidiostáticos na alimentação animal é a principal estratégia de controlo da coccidiose na produção de aves na UE [37]. Dos 40,7 milhões de toneladas de alimento composto produzido anualmente na UE para frangos de carne, perus e coelhos, 18,3 milhões de toneladas são produzidas com a incorporação de coccidiostáticos [38].

Atualmente, na UE, existem onze coccidiostáticos autorizados, os quais se dividem em dois grandes grupos. No primeiro encontram-se os ionóforos de ocorrência natural (substâncias que contêm um grupo poliéter e são obtidas por fermentação de diversas estirpes de *Streptomyces spp.* e *Actinomadura spp.*) que incluem as seguintes substâncias: monensina de sódio, lasalocida sódica, maduramicina de amónio, narasina, salinomicina de sódio e semduramicina de sódio. O segundo grupo inclui produtos sintéticos de natureza não ionófora, designadamente: decoquinato, robenidina hidrocloreto, halofuginona hidrobromada, diclazuril e nicarbazina [5],[37].

Os coccidiostáticos ionóforos são caracterizados por múltiplos anéis espirocetais de tetrahydrofurano [39]. O mecanismo de ação dos ionóforos contra os coccídeos difere do mecanismo de ação dos coccidiostáticos sintéticos. Os ionóforos são capazes de destruir o parasita antes que este possa infetar as células hospedeiras, enquanto que os coccidiostáticos sintéticos, matam o parasita durante os estágios posteriores do ciclo de vida deste, quando já iniciaram o crescimento nas células intestinais. Como já referido anteriormente, após a

ingestão, os oocistos esporulados libertam esporocistos, cada um contendo 4 esporozoítos, para o lúmen intestinal. O lúmen é um ambiente hostil e, para sobreviver, os esporozoítos devem penetrar rapidamente nas células epiteliais. É durante esse período que os ionóforos exercem o seu efeito. Estes são moléculas muito pequenas e, em virtude da sua estrutura, podem ser seletivamente absorvidos na membrana externa do esporozoíto. A parte interna da molécula é capaz de se ligar a iões importantes, como sódio (Na^+) e potássio (K^+), formando um portal pelo qual estes se podem difundir através da membrana do parasita e diminuir o seu gradiente de concentração [40].

O esporozoíto (ser vivo unicelular) contém elevadas concentrações intracelulares de K^+ e baixas de Na^+ , o que é essencial para a função normal da célula. Para manter os baixos níveis de Na^+ no interior da célula, a membrana bombeia constantemente esses iões para fora, através de uma bomba de sódio. Quando um ionóforo portador de iões é absorvido na membrana do esporozoíto, este provoca um curto-circuito na bomba de sódio, permitindo que o Na^+ volte a entrar. A célula do parasita responde continuando a bombear Na^+ , mas acaba por ficar sem energia, o que resulta numa captação incontável de água no esporozoíto, que incha e sofre lise (desintegração da célula por ruptura), não sendo capaz de penetrar nas células intestinais [40].

Uma consequência importante do mecanismo de ação dos ionóforos é que estes devem estar presentes no intestino para poder matar os esporozoítos. Assim, deve-se evitar a restrição alimentar do animal, pois isso pode levar a uma diminuição da concentração do medicamento no intestino [40].

Monensina: é um produto da fermentação de *Streptomyces cinnamonensis*. Foi o primeiro antibiótico a ser utilizado como coccidiostático e foi descrito como tendo um efeito de amplo espectro contra *Eimeria* [24], [41]. Forma complexos lipossolúveis com catiões de sódio e potássio, levando ao aumento da permeabilidade da membrana para esses iões [41]. Também aumenta o ganho de peso e a conversão alimentar e, em alguns casos, causa supressão da enterite necrótica [24].

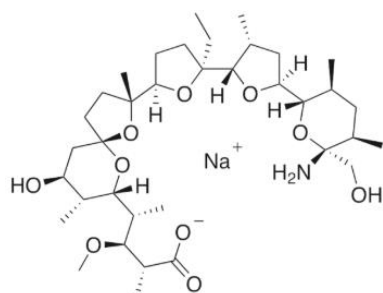
Lasalocida: foi isolada de *Streptomyces lasaliensis*. Demonstrou ter atividade anticoccidiana em frangos e aumentar o seu ganho de peso e conversão alimentar. Com exceção da salinomina, a lasalocida é a que apresenta menor toxicidade [41]. Possui diferentes afinidades iónicas e aceita catiões divalentes [24].

Salinomicina de Sódio: foi isolada a partir de *Streptomyces albus*. Esta exibe atividade não apenas contra *Eimeria* de aves, mas também contra bactérias Gram-positivas, incluindo micobactérias e alguns fungos filamentosos. A salinomicina é um ionóforo com seletividade para iões alcalinos e tem forte preferência pelo potássio, interferindo no seu potencial transmembranar. A salinomicina é a menos tóxica de todos os ionóforos [41].

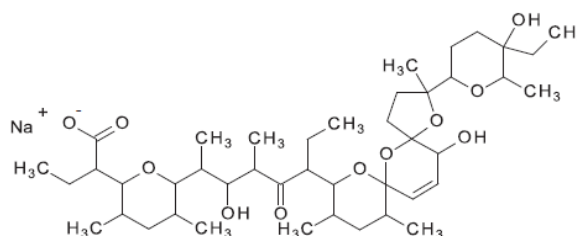
Narasina: foi obtida a partir de *Streptomyces aureofaciens*. É um derivado da salinomicina com um grupo metil adicional, portanto é também chamada de (4S)-4-metil salinomicina. Ao combinarem diferentes ionóforos com nicarbazina, foi descoberto que combinações de nicarbazina e narasina tinham atividade sinérgica. Foi desenvolvido um produto combinado contendo ambos os ingredientes ativos na proporção de 1:1, designado de Maxiban® [41].

Maduramicina de Amônio: foi isolada pela primeira vez a partir da bactéria *Actinomadura yumaensis*. É um grande composto heterocíclico com uma série de éteres de coroa eletronegativos capazes de ligar iões metálicos monovalentes ou divalentes e é amplamente utilizada para a produção comercial de frangos de carne. A maduramicina é a mais tóxica de todos os ionóforos, podendo causar defeitos cardiovasculares graves nas células animais, pois inibe a proliferação e induz a apoptose dos mioblastos [41].

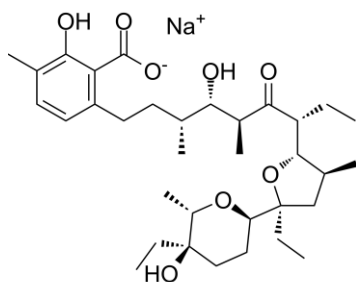
Semduramicina de Sódio: pode ser isolada de *Actinomadura roserufa*. É um medicamento altamente eficaz contra *Eimeria* e é bem tolerado por frangos.



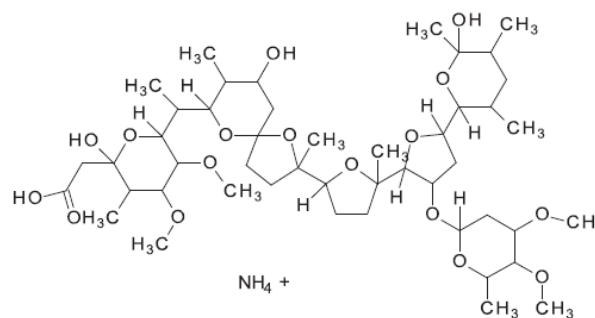
Monensina de Sódio



Narasina



Salinomicina de Sódio



Maduramicina de Amônio

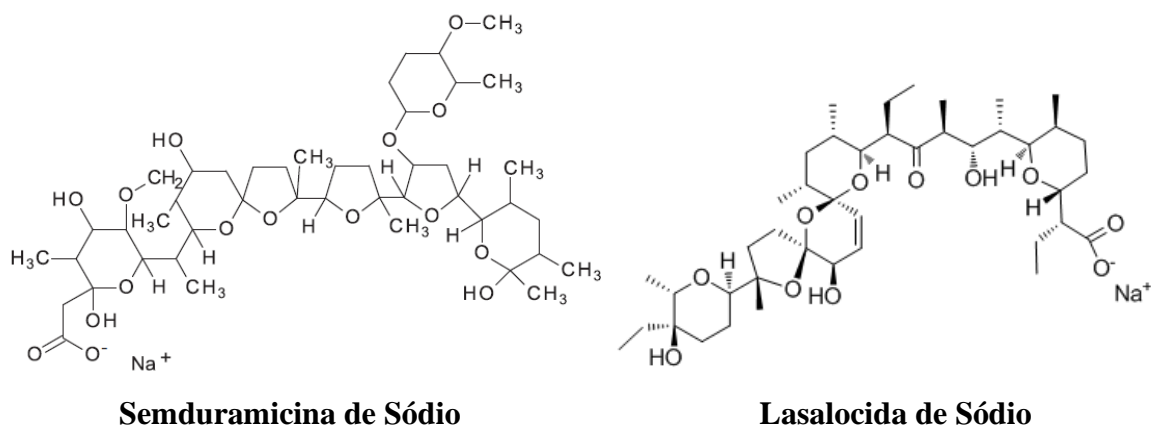


Figura 5 – Estruturas moleculares dos coccidiostáticos ionóforos autorizados.

Os coccidiostáticos sintéticos podem ser subdivididos em quinolonas, piridonas, alcaloides, guanidinas e derivados de triazina [42]. As quinolonas foram descobertas em 1962 e, desde então, sofreram inúmeras modificações no seu núcleo de quinolina de modo a melhorar o desempenho farmacocinético e o espectro antimicrobiano [43]. Derivados de guanidina, como a Robenidina, possuem uma ligação imina central contendo uma ligação dupla carbono-nitrogênio, com o átomo de nitrogênio ligado a um átomo de hidrogênio ou a um grupo orgânico. Os derivados de triazina podem ser divididos em dois subgrupos: triazinas assimétricas e triazinas simétricas. Ambos os subgrupos contêm um anel heterocíclico que é análogo ao anel de benzeno, mas com três átomos de carbono substituídos por átomos de nitrogênio [42].

Decoquinato: possui atividade coccidiostática de amplo espectro pois inibe o desenvolvimento de esporozoítos [24]. Este medicamento é utilizado para prevenção da coccidiose em ruminantes jovens, por incorporação na ração. A sua eficácia foi demonstrada em ovinos, caprinos e bovinos [41].

Robenidina Hidroclorada: é um derivado sintético da guanidina, introduzido em 1972, que não afeta o desenvolvimento intracelular inicial do coccídeo, mas impede a formação de esquizontes maduros. Interfere no metabolismo energético, inibindo a fosforilação da cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa [41].

Halofuginona Hidrobromada: é um derivado da quinazolinona que está relacionado com o fármaco antimalárico febrifuginona. Foi originalmente extraída de folhas e raízes da planta chinesa de uso tradicional *Cichroa febrifuga*, usada na medicina chinesa para tratar a

malária. É eficaz contra os estágios assexuais da maioria das espécies de *Eimeria*, atrasando o seu desenvolvimento [41].

Nicarbazina: é um complexo equimolar de 4,4'-dinitrocarbanilida e 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina. Este medicamento aumenta a atividade da lipoproteína lipase e atua como um ionóforo de cálcio. Para além disso, altera o equilíbrio de iões e água, logo as aves medicadas com este coccidiostático correm maior risco de stress térmico sob condições de clima quente e húmido [41].

Diclazuril: pertence à classe das triazinas e é um análogo de nucleosídeo que se acredita estar envolvido na síntese de ácidos nucleicos, possivelmente afetando fases posteriores da diferenciação dos coccídeos. Foi demonstrado que este afeta a síntese da parede do oocisto, resultando na formação de uma parede incompleta e anormalmente espessa. É também capaz de provocar necrose do zigoto em *E. brunetti* e *E. maxima*. Além disso, foi demonstrado que o diclazuril causa perturbações no potencial transmembranar das mitocôndrias e induz alterações estruturais nos merozoítos. No entanto, ainda não é claro se esse é o seu verdadeiro mecanismo de ação ou se é apenas uma consequência da morte celular. Foi também demonstrado que o diclazuril regula negativamente a expressão da enzima serina/treonina fosfatase tipo 5 do mRNA em cerca de 50 % em *E. tenella*. Essa enzima tem importantes funções reguladoras no ciclo celular e está associada à quinase regulada por sinal de apoptose 1 em muitos organismos eucarióticos [41].

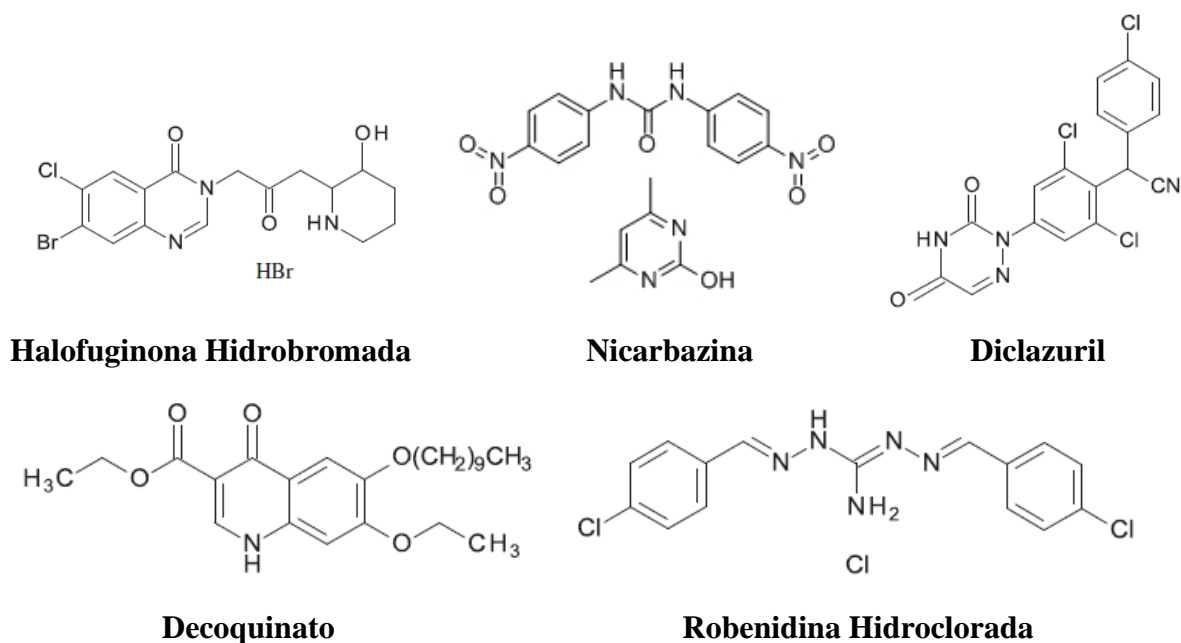


Figura 6 – Estruturas moleculares dos coccidiostáticos sintéticos autorizados.

1.4. Alternativas naturais aos coccidiostáticos na produção de aves

Os coccidiostáticos são utilizados há muito tempo como estratégia principal para controlar a coccidiose aviária na produção avícola moderna. Embora essa estratégia seja economicamente viável e bem-sucedida, o seu uso na alimentação animal resultou em problemas como desenvolvimento de espécies de *Eimeria* resistentes e contaminação dos produtos aviários com resíduos destes, o que pode desencadear reações adversas em consumidores com hipersensibilidade. Várias classes de alternativas naturais tem sido propostas e investigadas quanto ao seu potencial para substituir os antibióticos na produção de aves, incluindo probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, enzimas, fitobióticos, metais, anticorpos hiperimunes da gema de ovo, péptidos antimicrobianos e bacteriófagos [44]. Algumas destas alternativas também poderão vir a ser utilizadas como substituto dos coccidiostáticos.

Algumas dessas classes podem ser encontradas em subprodutos agroalimentares e um único subproduto pode conter mais de uma classe dessas alternativas. A incorporação de um subproduto nas dietas animais pode ter efeitos secundários com repercussões na saúde e no desempenho dos animais. A incorporação de subprodutos com potencial fitobióticos traz desafios, não sendo fácil estabelecer uma linha causal entre a presença de um composto em particular e os efeitos benéficos gerados, já que esses efeitos resultam de uma combinação de interações entre os vários componentes da matriz alimentar e o animal. A secção seguinte, procura descrever e resumir o efeito de fitobióticos já testados na dieta de aves, como aqueles que serão explorados no âmbito deste trabalho. Esta área tem sido bastante investigada nos últimos anos, essencialmente, devido aos efeitos antimicrobianos [4].

1.5. Utilização dos fitobióticos na nutrição de frangos de carne

Os fitobióticos, também chamados de fitoquímicos ou fitogénicos, são compostos bioativos naturais derivados de plantas que tem efeitos benéficos na saúde e desempenho dos animais quando incorporados na ração. Ao contrário dos metabolitos primários, como os açúcares e as gorduras, encontrados em todas as plantas, os fitobióticos são metabolitos secundários, os quais não participam diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas são necessários para que a planta sobreviva e prospere no seu meio ambiente [45].

Comparativamente aos antibióticos sintéticos, os fitobióticos são compostos naturais, menos tóxicos e, normalmente, livres de resíduos associados aos processos de síntese química. Muitos são certificados como produtos “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS) pela FDA e, portanto, tornam-se candidatos ideais para uso como aditivos alimentares na produção intensiva de frangos de carne [46].

Embora o termo "fitobiótico" compreenda uma ampla gama de substâncias quanto à origem biológica, formulação, descrição química e pureza, estes podem ser classificados em quatro grupos distintos: 1) **ervas** (plantas com flor, não lenhosas e não persistentes, das quais são utilizadas folhas e flores); 2) **plantas** (partes inteiras ou processadas de uma planta, por exemplo, raízes, folhas, casca); 3) **óleos essenciais** (OEs; substâncias lipofílicas voláteis obtidas por extração a frio ou por hidrodestilação); e 4) **oleorresinas** (extratos obtidos por solventes não aquosos) [47].

Os mecanismos precisos pelos quais estes compostos exercem os seus benefícios na saúde dos animais ainda não estão elucidados, no entanto, alguns mecanismos sugeridos englobam: (i) melhoria na digestibilidade de alguns nutrientes; (ii) manutenção/melhoria da histologia intestinal; (iii) ruptura da membrana celular de MOs patogénicos; (iv) modificação da superfície das células afetando a sua hidrofobicidade e, portanto, a sua capacidade de virulência; (v) estimulação do sistema imunológico, especificamente, ativação de linfócitos e macrófagos; (vi) proteção da mucosa intestinal contra a colonização por MOs patogénicos; e (vii) promoção do crescimento de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* [48], [47]. Estes mecanismos estão maioritariamente associados a uma melhoria da saúde intestinal.

O efeito positivo dos fitobióticos, está associado aos metabolitos secundários da planta, nomeadamente: terpenos (mono- e sesquiterpenos, esteroides), compostos fenólicos (taninos), alcaloides (presentes como álcoois, cetonas, ésteres, éteres e lactonas), flavonoides, glucosinolatos, ácidos orgânicos e saponinas [49]. Quando os fitobióticos são aplicados na alimentação animal a nível industrial, é necessário ter em conta que a sua composição pode sofrer oscilações devido a fatores biológicos (espécies vegetais, origem geográfica e época de colheita), forma de apresentação (pó, extrato ou óleo essencial), processos de fabrico (extração/destilação) e condições de armazenamento (temperatura, luz, nível de oxigénio) [8].

1.5.1. Propriedades antimicrobianas

Sabe-se que os fitobióticos exercem ações antimicrobianas *in vitro* contra MOs patogénicos importantes, incluindo fungos [50]. Os fitoquímicos exercem atividade antimicrobiana através de diferentes mecanismos: os **taninos**, por exemplo, agem por privação de ferro, ligação por pontes de hidrogénio ou interações não específicas com proteínas (como as enzimas) [51]. O ácido tânico inibe o crescimento de bactérias intestinais, como *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* e *Enterobacter cloacae* [52]. Os **alcaloides** são conhecidos por serem intercaladores do DNA e inibidores da sua síntese, através da inibição da atividade da topoisomerase [53]. As **saponinas** exibem atividade antimicrobiana através da sua capacidade em formar complexos com esteróis presentes na membrana dos microrganismos. Isso causa danos na membrana e, consequentemente, o colapso das células [54].

Os **óleos essenciais** são amplamente reconhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas e, ultimamente, têm ganho muita atenção devido ao seu potencial como alternativa aos coccidiostáticos. Estas propriedades estão associadas à presença de compostos como o timol, o carvacrol, o linalol e o geraniol, que se caracterizam pela localização do grupo hidroxilo e pela presença de eletrões desemparelhados [55].

O mecanismo antimicrobiano exato dos óleos essenciais é desconhecido, no entanto, foi sugerido que se deve principalmente às propriedades lipofílicas e à estrutura química dos seus constituintes. A hidrofobicidade dos OEs, associada à presença de compostos como o timol e o carvacrol, permite-lhes penetrar e desintegrar a membrana celular de bactérias patogénicas, resultando no vazamento de iões e moléculas, levando à morte celular [56]. Por outro lado, substâncias como o carvacrol também impedem a síntese de flagelina, fazendo com que as células bacterianas sejam aflageladas/não-móveis e, portanto, incapazes de aderir às células epiteliais, tornando-se menos patogénicas [8].

Alguns estudos em frangos de carne demonstraram eficácia antimicrobiana *in vivo* de OEs contra bactérias patogénicas, como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* [57]. Cross *et al.* (2007) observaram uma diminuição na população de coliformes cecais em aves tratadas com óleo essencial de tomilho após uma infeção por colisepticemia, sugerindo um efeito protetor após a administração do óleo. No entanto, a suscetibilidade de cada espécie de bactérias difere consoante a estirpe. De Martino *et al.* (2009) relataram diferentes suscetibilidades de duas estirpes de *Bacillus cereus* contra o mesmo OE. De modo geral, os

diferentes estudos suportam que a atividade antimicrobiana dos OEs previne o aparecimento de doenças e promove a saúde dos animais. No entanto, a eficácia dos OEs na dieta pode ser afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos, como: estado nutricional dos animais, infecção, composição da dieta e meio ambiente [58].

1.5.2. Propriedades anticoccidianas

Diversos estudos [4], [59], [60], [61], [62], [63] já demonstraram a atividade de plantas e/ou dos seus óleos essenciais contra o parasita protozoário do género *Eimeria* (parasita causador da coccidiose). Foi testado o efeito da curcumina e de um suplemento fitogénico comercial microencapsulado contendo cinamaldeído, timol e carvacrol (dois dos principais componentes do OE de segurelha) na alimentação de frangos de carne, em comparação com um coccidiostático. No 21º dia do estudo, verificou-se uma contagem significativamente menor de oocistos no grupo contendo o suplemento fitogénico relativamente aos grupos controlo, enquanto no 35º dia, os grupos “suplemento fitogénico + curcumina”, “suplemento fitogénico” e “controlo positivo” (com adição de coccidiostático) tiveram contagens significativamente mais baixas do que os grupos controlo negativo. O efeito coccidiostático dos extratos vegetais, está relacionado com a estabilização da fluidez da membrana do oocisto [59].

Um extrato contendo uma mistura de três óleos essenciais, derivados de orégão, folha de louro e lavanda, foi investigado como alternativa ao coccidiostático convencional monensina de sódio. Alguns frangos foram infetados com uma mistura de espécies de *Eimeria*, tendo sido demonstrado que o extrato contendo os óleos essenciais reduziu a contagem de oocistos em frangos infetados com *Eimeria spp.* num grau comparável ao da monensina [60].

A planta picão preto (*Bidens pilosa*) apresenta na sua composição mais de 200 compostos bioativos, incluindo: alifáticos, flavonoides, terpenos, fenilpropanoides, aromáticos, porfirinas, entre outros [61]. A planta inteira exibiu atividade anticoccidiana em frangos infetados com *E. tenella*, como evidenciado por: (i) taxa de sobrevivência (100 %); (ii) contagem significativamente reduzida no número de oocistos fecais; (iii) diminuição nos scores de lesões intestinais; (iv) aumento do peso corporal em frangos infetados. O mecanismo de ação proposto supõe que a planta intervenha nas fases iniciais do ciclo de vida de *Eimeria*, através da destruição química direta ou atenuação de esporozoítos invasivos,

pois estas fases são mais suscetíveis a ataque químico quando comparadas ao oocisto, cuja parede é muito resistente a danos físicos e químicos [4].

Num estudo foi descrito que a curcumina, um composto bioativo presente em *Curcuma longa*, destruiu consistentemente os esporozoítos de *E. tenella*. Da mesma forma, uma combinação de *Artemisia annua* e *Curcuma longa* mostrou eficácia anticoccidial em frangos de carne inoculados com uma mistura de *E. acervulina* e *E. maxima*. Além da resistência à coccidiose, a curcumina demonstrou ter efeitos promotores de crescimento, como evidenciado pelo aumento do ganho de peso corporal e a redução no número oocistos [4].

O efeito de três óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Artemisia sieberi* e *Mentha pulegium* na inativação de oocistos mistos de várias espécies de *Eimeria* foi avaliado em perus inoculados com oocistos esporulados tendo-se, de seguida, colhido oocistos frescos não esporulados das suas fezes. Foi determinado o valor correspondente a 50 % da concentração máxima inibitória (IC50) para cada OE. Os resultados mostraram que os valores de IC50 para a menta, a artemísia e o tomilho foram 22,9, 40,5 e 53,4 mg/mL, respetivamente. As elevadas concentrações de pulegona no OE de menta podem ser a razão da sua atividade anticoccidiana. Além disso, o timol e o carvacrol podem penetrar na parede do oocisto e danificar o seu citoplasma. Supõem-se que as partes não metabolizadas destes óleos interferem no processo de esporulação, através da inibição da atividade de enzimas ou impedindo a acessibilidade a oxigénio [62]. Como se pode verificar, alguns estudos têm demonstrado efeitos positivos dos fitobióticos na produção de aves, nomeadamente na redução do número de oocistos produzidos pelos coccídeos.

Para além de aves, também já foram conduzidos estudos em coelhos usando extratos hidroalcoólicos de *Salix babylonica* (SBHE) na eliminação de *Eimeria spp*, como alternativa ao coccidiostático Baycox®. Este estudo demonstrou que a administração oral de 25 e 50 mg de SBHE / kg de peso corporal reduziu a libertação de oocistos por grama de fezes. Este efeito foi observado no dia 14 e verificou-se um efeito ainda mais significativo no dia 28, para ambas as concentrações [63].

Já foi demonstrada resistência dos coccídeos contra quase todos os medicamentos anticoccidianos, o que é uma questão importante para o controlo da coccidiose. Além da ação anticoccidiana, algumas plantas e/ou os seus OEs possuem várias outras vantagens sobre os coccidiostáticos. Como são produtos naturais, há pouca preocupação com a

biossegurança e a acumulação de resíduos na carne de frango. Para além disso, o seu uso prolongado parece mostrar muito menor resistência dos parasitas comparativamente aos coccidiostáticos. A aplicação de plantas e/ou dos seus OEs na dieta de aves pode reduzir o uso de coccidiostáticos e, conseqüentemente, reduzir também a acumulação de resíduos destes medicamentos em produtos avícolas, além de que a sua utilização, diminui as preocupações com a saúde pública [61].

1.5.3. Propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias

A atividade antioxidante dos fitobióticos, principalmente dos óleos essenciais, é outra propriedade biológica de grande interesse. Os mecanismos antioxidantes dos OEs baseiam-se na sua capacidade de doar um hidrogénio ou um eletrão aos radicais livres, eliminando-os. O carvacrol e o timol (presentes em muitos OEs, como já tinha sido referido em cima) são os principais responsáveis por essa atividade, pois têm a capacidade de deslocalizar o eletrão não emparelhado dentro da estrutura aromática ou hidrogénios dos seus grupos OH, protegendo outras moléculas biológicas contra a oxidação [64], [65]. Esta atividade tem sido muito investigada, devido ao seu potencial para evitar a oxidação lipídica da carne, através da supressão da formação de peróxido de hidrogénio. A oxidação lipídica é um dos principais problemas encontrados durante o processamento e armazenamento da carne, afetando a qualidade do produto final devido a: (i) perda de cor; (ii) formação de odores e sabores indesejáveis; (iii) diminuição do prazo de validade. A carne de frango é particularmente suscetível à deterioração oxidativa pois apresenta um conteúdo relativamente elevado em ácidos gordos polinsaturados [8].

As plantas aromáticas que apresentam maior atividade antioxidante pertencem à família *Lamiaceae*, como a segurelha, a planta aromática de principal interesse neste trabalho. Cuppett e Hall (1998) sugeriram que a atividade antioxidante desta família de plantas é não só devida ao seu elevado conteúdo em terpenos fenólicos, mas também aos seus compostos não fenólicos. A suplementação da dieta de frangos de carne com timol reduziu a oxidação dos ácidos gordos, como evidenciado pelo menor nível de malonaldeído na mucosa duodenal. Franz *et al.* (2010) sugeriram que os fitobióticos podem também afetar benéficamente algumas enzimas antioxidantes, como a glutationala peroxidase e a superóxido dismutase.

Alguns óleos essenciais influenciam positivamente o sistema imunológico de aves [8]. A inflamação é uma resposta protetora normal induzida por lesão tecidual ou infecção para combater MOs invasores no organismo e remover células hospedeiras mortas ou danificadas [66]. A capacidade dos óleos essenciais para eliminar radicais livres, possibilita-os de atuarem também como agentes anti-inflamatórios, pois uma das respostas inflamatórias é a explosão oxidativa em diversas células. Foi descrito que o ácido rosmarínico, o ácido oleanólico e o ácido ursólico são os principais metabolitos secundários não voláteis encontrados no óleo essencial de *Origanum spp.* com fortes propriedades anti-inflamatórias [67].

1.5.4. Efeito dos fitobióticos como promotores do crescimento e da saúde

Até ao momento, os estudos que avaliaram os efeitos promotores de crescimento dos aditivos alimentares fitogênicos não são conclusivos quanto aos seus efeitos benéficos na produção intensiva de aves.

O mecanismo de ação exato dos fitobióticos como promotores de crescimento é ainda desconhecido. No entanto, são sugeridos os seguintes efeitos: (i) diminuição da taxa de mortalidade dos animais; (ii) alteração favorável da população microbiana e redução dos níveis de MOs patogênicos e metabolitos tóxicos produzidos por estes; (iii) melhoria no ganho de peso corporal, na ingestão de alimento e na taxa de conversão alimentar; (iv) redução do stress oxidativo e aumento da atividade antioxidante em vários tecidos e no soro; (v) atenuação dos efeitos negativos provocados pelo stress térmico; (vi) melhoria da histologia intestinal, nomeadamente, aumento da altura das vilosidades e, consequente, expansão da superfície de absorção do intestino; (vii) aumento na proliferação de células imunológicas, elevada expressão de citocinas e aumento do número de anticorpos. Para além disso, é também conhecido que os OEs diminuem o pH do TGI, através do aumento no crescimento de bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*). A atividade ótima das enzimas depende do pH e, como os OEs reduzem o pH, a digestão dos alimentos é melhorada. Existem também evidências da atividade benéfica dos OEs noutros fatores do processo digestivo. Jang *et al.* (2007) observaram que os OEs aumentam a atividade de enzimas digestivas, como a tripsina e a α -amilase. Além disso, foi também demonstrado que os OEs melhoram a função hepática e aumentam a concentração de enzimas digestivas pancreáticas [68].

1.6. Efeito fitobiótico de subprodutos agroalimentares na nutrição de aves

Os efeitos benéficos obtidos com a incorporação de plantas também podem ser alcançados com a incorporação dos seus subprodutos, uma vez que certos fitoquímicos também podem estar presentes neles. Embora as plantas sejam descritas como fontes de OEs com efeitos fitobióticos, e as suas partes comerciais tenham sido muito investigadas quanto aos seus efeitos como promotores de crescimento, existem poucos estudos sobre a incorporação dos seus subprodutos na dieta de aves. A **Tabela 6** resume alguns desses estudos.

Para além do uso de subprodutos agroalimentares promover a economia circular, dando uma nova “vida” a resíduos que normalmente seriam descartados, as regras ambientais para o descarte de resíduos industriais tem-se tornado cada vez mais rígidas, emergindo assim o conceito de ecologia industrial, que visa o uso de resíduos e subprodutos como matéria-prima para novos produtos e aplicações dentro de uma simbiose industrial [69].

Tabela 6 - Resumo de estudos que avaliaram os efeitos fitobióticos resultantes da incorporação de subprodutos na dieta de frangos.

Produto / Animal / Período Experimental	Potenciais fitobióticos	Tratamento dietético	Principais descobertas	Referência
“Ginger (<i>Zingiber officinale</i>) Waste Meal” / 240 pintos sinteticamente coloridos / 42 dias	Zingibereno, gingerol e diarilheptanóides	4 tratamentos: dieta basal com 0 (controle), 5, 10 e 15 % de “Ginger Waste Meal”	- O ganho de peso corporal e a ingestão de alimento aumentaram com a inclusão de “Ginger Waste Meal” ($p < 0,05$), no entanto, as características da carcaça e a taxa de conversão alimentar foram semelhantes em todos os grupos	[70]
Casca de laranja e banana / 250 pintos / 42 dias	Casca de laranja: Flavonoides, vitamina C e vitamina E Casca de banana: compostos fenólicos e carotenoides	3 tratamentos: dieta basal com 0, 1,5 % e 3 % de casca de laranja e 1,5 % e 3 % de casca de banana	- Melhoria no ganho de peso corporal e na taxa de conversão alimentar e também menor mortalidade (6 %) foram registrados em frangos suplementados com 3 % de casca de banana ($p < 0,05$)	[71]
“Lemongrass Leaf Meal” (subproduto da erva-príncipe) / 270 frangos com 1 dia de idade / 6 semanas	Flavonóides e óleos essenciais (terpenos, <i>E</i> -citral, <i>Z</i> -citral, nerol geraniol, citronelal, terpinoleno, acetato de geraniol, mireceno) [72]	3 tratamentos: dieta basal com 0 e 1 % de terramicina (antibiótico) e com 1 % de “Lemongrass Leaf Meal”	- O peso corporal final das aves foi maior no grupo suplementado com “Lemongrass Leaf Meal” do que no grupo suplementado com terramicina, no entanto a diferença não foi significativa - Em relação ao consumo de ração e à taxa de conversão alimentar, observou-se que não houve diferenças significativas entre as aves suplementadas com “Lemongrass Leaf Meal” e com terramicina - A taxa de mortalidade acumulada do grupo suplementado com “Lemongrass Leaf Meal” foi significativamente inferior à taxa de mortalidade do grupo suplementado com terramicina	[73]
Subprodutos de uva / 100 pintos com 1 dia de idade / 21 dias	Compostos fenólicos: catequinas,	4 tratamentos: dieta livre de antibióticos (controle negativo), controle positivo	- Comparada com a dieta livre de antibióticos, a suplementação com antibiótico, concentrado de bagaço de uva e extrato de	[74]

	epicatequina e epicatequina-3-O-galato, e proantocianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas	(50 mg / kg de avoparcina) e dieta sem antibióticos contendo um concentrado de bagaço de uva (60 g / kg) ou um extrato de semente de uva (7,2 g / kg)	<p>semente de uva aumentou as populações de <i>Enterococcus</i> e diminuiu a contagem de <i>Clostridium</i> no conteúdo ileal</p> <p>- Os animais alimentados com subprodutos da uva apresentaram maior grau de biodiversidade do que aqueles alimentados com as dietas controle</p> <p>- O maior rácio altura das vilosidades : profundidade da cripta correspondeu a aves alimentadas com concentrado de bagaço de uva e dieta com antibiótico</p>	
Bagaço de tomate seco / 352 pintos com 1 dia de idade / 42 dias	Folato, vitamina C, α -tocoferol, compostos fenólicos e carotenóides (como o licopeno)	3 tratamentos: dieta basal contendo 0, 3 % e 5 % de bagaço de tomate seco	- A suplementação dietética com 5 % de bagaço de tomate seco atenuou os efeitos prejudiciais do stresse térmico na atividade das enzimas séricas, estado oxidativo, resposta imune e composição óssea, mas não influenciou o desempenho de crescimento sob stress térmico	[75]
Subprodutos do chá verde / 140 pintos com 1 dia de idade / 42 dias	Polifenólicos, especialmente a epigallocatequina galato	5 tratamentos: controlo positivo (dieta basal sem antibióticos), controlo negativo (dieta basal + 0,05 % de clorotetraciclina) e 3 grupos com subprodutos do chá verde (dieta basal + 0,5 % ou 1 % ou 2 %)	<p>- Não foram observadas diferenças significativas no consumo de ração, na eficiência alimentar, no conteúdo de colesterol LDL e de ácido docosahexaenóico no sangue e no colesterol na carne de frango entre os tratamentos ($p > 0,05$)</p> <p>- o ácido 2-tiobarbitúrico (forma-se quando ocorre oxidação lipídica) na carne de frango diminuiu nos grupos alimentados com dietas contendo subprodutos do chá verde e antibióticos comparado ao grupo controlo negativo ($p < 0,05$)</p>	[76]
“Guava (<i>Psidium guajava</i>) leaf meal” / 180 pintos com 1 dia de idade / 42 dias	Flavonóides, como a guajaverina e o ácido psidiólico	4 tratamentos: dieta basal contendo 0 %, 2,5 %, 3,5 % e 4,5 % de “Guava leaf meal” após tratamento por meio de alguns processos físicos e químicos	<p>- A ingestão de alimento, o ganho de peso corporal e a taxa de conversão alimentar não foram estatisticamente significativos nos diferentes tratamentos dietéticos</p> <p>- O teor de gordura e a taxa de mortalidade reduziram com o aumento do nível de “Guava leaf meal”</p>	[77]

1.7. Segurelha (*Satureja montana*) e os seus subprodutos

A segurelha-das-montanhas ou segurelha-de-inverno, botanicamente incluída na família *Lamiaceae*, é uma planta aromática semi-espessa, anual ou perene, cujo centro de distribuição está localizado na parte oriental da região do Mediterrâneo [78]. Pode ser encontrada em toda a Europa, Rússia e Turquia, crescendo em regiões áridas, ensolaradas, pedregosas e rochosas [79]. Em Portugal, a *S. montana* nasce espontaneamente na região nordeste e nas ilhas da Madeira. Esta planta é utilizada na culinária desde os tempos romanos, sendo agora amplamente utilizada no Oeste Asiático, Europa, Médio Oriente, EUA e Canadá. No entanto, também é usada como planta medicinal pois apresenta diversos benefícios para a saúde. De acordo com diversos estudos, a segurelha apresenta uma série de propriedades, nomeadamente: propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, fungicidas e anti-HIV-1 [78].

A bioatividade e o perfil aromático de *S. montana* são significativamente influenciados pela composição química do seu óleo essencial. Dependendo, principalmente, da área geográfica e dos seus estágios de desenvolvimento, foi registada a ocorrência de vários quimiotipos do OE de *S. montana*. Os quimiotipos predominantes carvacrol / timol determinam um forte sabor picante das plantas. Eles exibem um potencial antioxidante significativo, enquanto os quimiotipos linalol ou geraniol têm uma atividade mais baixa [79]. Sabe-se que o género *Satureja* possui alta variabilidade, dentro do mesmo quimiotipo, e especialmente em populações provenientes de habitats distantes [80].

As plantas aromáticas podem ser utilizadas de forma direta, no estado fresco ou secas; ou de forma indireta, como matéria-prima para a extração dos seus princípios ativos, através da produção de óleos essenciais e outros derivados [81]. Um terço dos produtores portugueses vende a sua produção em verde e os restantes vendem a planta seca. Cerca de 10 % dedicam-se à extração de óleos essenciais e um quarto é viveirista. Aproximadamente dois terços das explorações são em modo de produção biológico, o que corresponde à quase a totalidade dos produtores que comercializam a planta seca. De uma forma geral, os produtores de plantas aromáticas encontram-se disseminados por todo o país, apesar de existir uma maior concentração na zona costeira. O seu mercado alvo é geralmente o interno para os produtores convencionais e o externo para os produtores em modo biológico [82].

A produção e o processamento de ervas aromáticas geram vários subprodutos, dos quais se destacam os caules separados da parte aérea, uma vez que esta é a parte comercializável. No caso específico da segurelha-das-montanhas os caules representam cerca de 50 a 60 % do peso seco da planta, sendo, em geral, totalmente descartados como resíduos. A valorização desses subprodutos, além de benefícios económicos, apoia a sustentabilidade e a gestão de recursos [69].

Em todo o mundo, o mercado global de produtos à base de plantas envolveu 118 mil milhões de euros em 2012, sendo que em 2002 o valor económico envolvido era de apenas 60 mil milhões [8]. Em Portugal só recentemente se assistiu a um crescimento da produção organizada e conduzida deste tipo de explorações agrícolas. De acordo com o Ministério da Agricultura e do Mar (2013) este tipo de explorações duplicou no período de 2009 a 2012, havendo um aumento de 80 hectares para 180 hectares na área das explorações. Também o número de produtores aumentou de 93 para 147 [82].

1.7.1. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de segurelha

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são líquidos com aroma obtidos de materiais vegetais (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). Estes são misturas complexas de metabolitos secundários de plantas que estão particularmente associadas a essências e fragrâncias características [83]. Na natureza, os OEs desempenham um papel importante na proteção das plantas, sendo antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também protegem as plantas contra herbívoros. A destilação a vapor ou destilação por arraste de vapor é o método de extração mais comum utilizado para a produção comercial dos óleos essenciais. No entanto, novas técnicas de extração foram desenvolvidas para reduzir o tempo de extração, reduzir o consumo de solventes orgânicos, melhorar o rendimento da extração, melhorar a qualidade do extrato, impedir a poluição e reduzir os custos de preparação de amostras. Essas técnicas incluem a extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico e extração assistida por ultrassons [8].

Os óleos essenciais obtidos das partes aéreas de *S. montana* por hidrodestilação são misturas bastante complexas constituídas por várias dezenas de compostos, e essa complexidade dificulta muitas vezes a explicação da sua atividade. Os principais componentes do óleo essencial obtido das partes aéreas de *Satureja montana* e dos seus

subprodutos (**Figura 7**) estão representados na **Tabela 7**, incluindo as respectivas faixas percentuais em que ocorrem. A variabilidade quantitativa dos OEs é refletida mesmo nos componentes de maior concentração, como pode ser observado pelas respectivas faixas percentuais. Existe, portanto, uma grande variabilidade na composição química dos OEs obtidos de espécies de *Satureja montana* devido à sua origem geográfica, fatores ambientais, sazonais e genéticos [8]. Os OEs obtidos das plantas de *Satureja montana* apresentam variações quantitativas de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta [84]. Além disso, a mesma subespécie mostra grandes variações quantitativas quando cultivada em locais ecologicamente diferentes [85]. Fatores genéticos também têm impacto na composição química do OE de *S. montana* verificando-se que diferentes subespécies (*Satureja montana* ssp. *Montana* e *Satureja montana* ssp. *Pisidica*) apresentam variações quantitativas na composição química dos seus OEs [86].

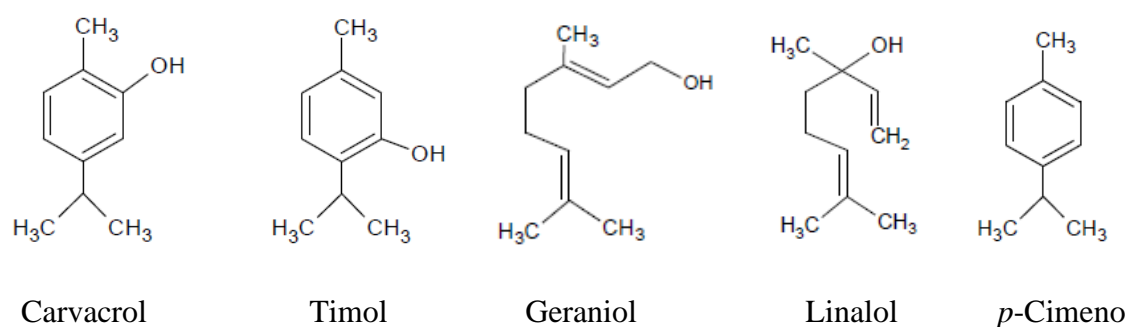


Figura 7 - Estrutura química de alguns dos principais componentes do óleo essencial de *Satureja montana*.

Tabela 7 – Gama de concentração (%) em que ocorrem os principais constituintes químicos presentes nos óleos essenciais obtidos das partes aéreas [8] e dos subprodutos de *S. montana* [69].

Composto	Gama de concentração (%) Partes aéreas	Gama de concentração (%) Subprodutos
Carvacrol	0,4 – 84,2	86,6 – 94,6
Timol	Vestígios – 46,0	0,3 – 0,4
<i>p</i> -Cimeno	Vestígios – 41,4	--
Geraniol	0,1 – 22,3	--
Linalol	Vestígios – 24,0	0,3 – 0,5
α -Pino	0,2 – 20,7	--

γ -Terpineno	0,2 – 15,9	--
Borneol	1,75 – 12,2	0,5 – 0,8
β -Cubebeno	Vestígios – 11,1	--
Éter metílico de carvacrol	1,1 – 11	--
4-Terpineol	--	0,4 – 0,7
α -Terpineol	Vestígios – 4,1	0,2 – 0,6

1.7.2. Utilização da segurelha na alimentação de frangos

Até ao momento, não existem ainda estudos que tenham avaliado o efeito fitobiótico da *Satureja montana* e/ou dos seus subprodutos em frangos de carne. No entanto, existem alguns estudos que avaliaram o efeito fitobiótico de algumas espécies de *Satureja* quando incorporadas na alimentação de frangos de carne. As principais propriedades desta espécie de plantas são: sensoriais, metabólicas, imunológicas, antioxidantes e antimicrobianas [8].

Os OEs e os seus compostos bioativos atuam como condimentos alimentares e podem ser detetados nas cavidades orais e nasais através do cheiro e sabor. Essa percepção sensorial estimula as secreções digestivas e a motilidade intestinal, preparando o trato gastrointestinal para a receção dos alimentos. Em frangos de carne, poucos estudos revelaram que os OEs melhoraram as atividades da tripsina e da amilase nos homogenatos teciduais do pâncreas, potencializando uma melhoria na digestibilidade dos nutrientes. No entanto, não há estudos que tenham avaliado o efeito de óleo essencial de segurelha a esse nível [8].

Metabolicamente, os OEs apresentam atividade hipolipidémica [8]. Poucos estudos avaliaram os potenciais efeitos dos OEs no metabolismo lipídico em frangos. Utilizando os óleos de segurelha, é descrito que a suplementação dietética de 500 mg/kg de óleo essencial de *Satureja khuzistanica* causou uma diminuição significativa na LDL plasmática, no colesterol total e nos triglicerídeos [87].

Alguns óleos essenciais influenciam positivamente o sistema imunológico das aves. A adição de timol + carvacrol (principais componentes dos óleos essenciais de *Satureja montana*, conforme discutido acima) modificou linearmente ($p < 0,05$) a resposta imunológica em frangos de carne, diminuindo razão heterófilos/linfócitos [83]. Os heterófilos são, predominantemente, leucócitos granulados na resposta inflamatória aguda em frangos, sendo a razão heterófilo/linfócito usada como medida de stress [8]. Para além disso, a adição de *Satureja khuzistanica* à dieta de frangos de carne reduziu os efeitos

adversos da aflatoxina B1 no crescimento e proporcionou um efeito positivo na bioquímica sérica e nas respostas imunológicas humorais [88].

A atividade antioxidante do OE de *Satureja montana* já foi avaliada em diversos estudos. Como já tinha sido referido anteriormente, a carne de frango é muito suscetível à oxidação, e os óleos essenciais podem ser utilizados para evitar esse processo. O efeito da suplementação de OE de *Satureja montana* sob a estabilidade oxidativa da carne de frango ainda não foi avaliado, no entanto, a suplementação com OE de *Satureja khuzestanica*, diminuiu a oxidação de lipídios presentes na gema de ovo enriquecida com ômega-3 durante a preservação à temperatura ambiente e a refrigeração [89].

Outra propriedade que tem sido muito estudada dos óleos essenciais de segurelha é a sua atividade antimicrobiana. Existem estudos *in vitro* que avaliaram o efeito antimicrobiano do OE de segurelha em várias estirpes patogênicas microbianas. Entre os patógenos que foram inibidos pelo OE de segurelha estão as bactérias Gram-positivas, como *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-negativas, como *E. coli* O157:H, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*. As propriedades antimicrobianas destes óleos essenciais torna-os capazes de modelar a microbiota intestinal [8]. Para além disso, os subprodutos de *S. montana* já foram usados para extrair OEs e determinar a sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra espécies de bactérias patogênicas com impacto económico na indústria avícola, nomeadamente: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sv *Anatum* SF2 e *Staphylococcus aureus*. As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) obtidas foram de 150 µg/mL para *S. aureus*, 225 µg/mL para *E. coli* e 250 µg/mL a *S. enterica*. Como essas CMIs são semelhantes às relatadas para o carvacrol contra as mesmas estirpes bacterianas, pode-se concluir que o carvacrol é o composto mais ativo presente nos subprodutos de *S. montana* [69]. De facto, o carvacrol é o componente maioritário dos OEs obtidos destes subprodutos, como pode ser observado pela **Tabela 7**, representando 86,6 - 94,6 % da sua composição, mostrando a relevância do aproveitamento deste subproduto. Efeitos *in vivo* do OE de segurelha demonstraram que a suplementação dietética de 500 mg/kg de OE de *Satureja khuzistanica*, aumentou a população cecal de *Lactobacillus* e reduziu a contagem total de bactérias e *Escherichia coli* [87].

Essas atividades dos OEs evitam o aparecimento de doenças e promovem a saúde dos frangos, o que tem impacto na qualidade ou produtividade final [8]. Existem entre 10 a

15 estudos sobre os efeitos da suplementação com segurelha na nutrição de frangos de carne, e os resultados geralmente são variáveis. Alguns desses estudos encontram-se resumidos na **Tabela 8**. A variação da composição química dos OEs (devido a fatores geográficos, por exemplo) é suficiente para causar variabilidade no grau de suscetibilidade dos MOs, sendo um dos pontos explicativos para esses diferentes resultados.

Tabela 8 – Resumo de alguns estudos em que avaliaram os efeitos da suplementação dietética com segurelha na alimentação de frangos de carne.

Produto/Animal/Período Experimental	Composição do produto	Tratamento dietético	Principais resultados	Referência
Pó obtido das partes aéreas de <i>Satureja hortensis</i> e extrato aquoso / 380 frangos com 225 dias de idade / 42 dias	Não foi avaliada	5 tratamentos: 1 - grupo controlo, 2 e 3 - dieta basal com 1 % e 2 % de pó de segurelha, 4 e 5 – água suplementada com 50 e 100 ppm de extrato de segurelha	- No dia 42, o índice de conversão alimentar foi melhor nos grupos sujeitos a tratamento do que no grupo controlo, sem efeitos adversos na ingestão de ração e no ganho de peso diário - Entre os grupos suplementados com pó de segurelha e com o extrato, o índice de conversão alimentar foi semelhante	[90]
Pó obtido de folhas de <i>Satureja hortensis</i> / 240 pintos com 1 dia de idade / 42 dias	Não foi avaliada	4 tratamentos: grupo controlo, dieta basal com a adição de 4,5 mg/kg de flavofosfolipol ¹ e dieta basal com a adição de 5 e 10 g/kg de pó de segurelha	- A suplementação da dieta com 5 g/kg de segurelha melhorou o peso corporal dos frangos de carne nos dias 14, 28 e 42, mas as diferenças não mostraram significância estatística - O consumo de ração e o índice de conversão alimentar não foram marcadamente afetados pelos tratamentos	[91]
Pó obtido de folhas secas de <i>Satureja hortensis</i> / 140 pintos com 1 dia de idade / 50 dias	Não foi avaliada	2 tratamentos: dieta basal sem adição de segurelha e dieta basal com adição de 1 % de pó de segurelha	- A comparação estatística do peso corporal médio em vários intervalos de tempo mostrou que os frangos suplementados com segurelha (1930 ± 29 g) eram significativamente mais pesados do que os frangos do grupo controlo (1837 ± 25 g)	[92]

Extrato aquoso obtido das partes aéreas de <i>Satureja hortensis</i> / 300 pintos com 1 dia de idade / 42 dias	33 g de carvacrol / kg de extrato 38 g de timol / kg de extrato	5 tratamentos: grupo controlo e dieta basal contendo 100, 200, 300 e 400 mg/kg do extrato de segurelha	- Os resultados não mostraram efeito significativo da suplementação com extrato de segurelha no ganho de peso corporal dos frangos, no entanto a taxa de conversão alimentar foi significativamente melhor quando os animais foram alimentados com 400 mg/kg de extrato de segurelha em comparação ao grupo controlo	[93]
Óleo essencial de <i>Satureja Khuzistanica</i> / 288 pintos com 1 dia de idade / 42 dias	92,2 % de carvacrol (ou 922 g de carvacrol / kg de óleo essencial)	6 tratamentos: 2 cereais (2 dietas, uma à base de milho e outra à base de trigo) e 3 níveis de óleo (0, 250 e 500 mg/kg)	- A suplementação da dieta com 500 mg/kg de óleo essencial de segurelha aumentou a ingestão de alimento e o ganho de peso corporal, a altura das vilosidades, a relação altura-profundidade da cripta das vilosidades e diminuição da profundidade da cripta no duodeno	[87]
Óleo essencial de <i>Satureja Khuzistanica</i> / 244 pintos com 1 dia de idade / 42 dias	Não foi avaliada	2 tratamentos: dieta basal sem adição de segurelha e dieta basal com 500 mg/kg de óleo essencial de segurelha	- A dieta suplementada com OE de segurelha não teve efeito significativo no consumo de ração, mas o ganho de peso corporal semanal e o índice de conversão alimentar melhoraram significativamente - Os frangos de carne que receberam a dieta suplementada com o OE apresentaram concentrações sanguíneas significativamente menores de colesterol, HDL e glucose em comparação aos grupos controlo	[94]

1.8. Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo produzir formulações para frangos de corte com a incorporação de 1 %, 2 % e 4 % de subprodutos agroindustriais de segurelha-de-inverno, de forma a avaliar os seus efeitos como promotores de crescimento e/ou possíveis substitutos dos coccidiostáticos.

Outro objetivo deste trabalho passa também por analisar nutricionalmente e microbiologicamente as formulações produzidas e testá-las, no Instituto Politécnico de Viseu (IPV), em frangos acondicionados numa sala de produção com controlo ambiental, avaliando o peso vivo corporal, a ingestão média diária de ração e o ganho médio diário de peso.

2. Materiais e Métodos

2.1. Origem dos materiais

Os subprodutos de *Satureja montana* foram fornecidos pela empresa Ervital – Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda. Esta é uma pequena empresa, do tipo familiar, com sede e atividade na região da Serra do Montemuro, e cuja atividade principal é a produção, transformação e comercialização de plantas aromáticas e medicinais e seus derivados. Todos os produtos são obtidos, preparados e comercializados de acordo com o regulamentado para o modo de produção biológico, sendo a certificação efetuada pela ECOCERT- PORTUGAL [81].

2.2. Tratamento dos subprodutos de ervas aromáticas para aplicação nas rações

Os subprodutos de segurelha-das-montanhas, que consistem nos caules separados da parte aérea da planta, foram moídos até se obter um pó. Essa moagem foi realizada no Instituto Politécnico de Viseu, onde decorreu o ensaio em frangos, no contexto do projeto Waste2Value. O pó foi, posteriormente, envolvido de forma homogénea nas rações, para que as dietas contivessem 1 %, 2 % ou 4 % do subproduto. Ambas as formulações foram administradas na forma de farinha.

2.3. Caracterização química das rações (de crescimento e de acabamento) por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)

As rações para o ensaio foram produzidas na Ovargado S.A. Após serem produzidas, todas as rações foram analisadas, de modo a determinar-se a sua composição nutricional, utilizando um aparelho NIRSystems 5000, com a característica de operar em toda a gama de comprimentos de onda do infravermelho próximo e uma célula de análise retangular. Foram realizadas análises quadruplicadas (N=4) a cada tipo de ração.



Figura 8 - NIRSystems 5000 (lado esquerdo) e célula de análise retangular (lado direito) utilizados para análise de alimentos para frangos de carne.

2.4. Análise microbiológica das rações controlo e das rações com adição de 4 % de subproduto de segurelha

De forma a realizar-se análise microbiológica foram preparadas 2 amostras controlo, uma de cada formulação: crescimento (A-105 Migalha) e acabamento (A-115 Especial Farinha), com cerca de 250 g, para se averiguar se o nível de microrganismos presente nas rações está de acordo com os limites definidos pela empresa Ovargado S.A. e pela legislação nacional. Para além disso, foi também preparada uma amostra de A-105 Migalha com a adição de 4 % de subproduto moído de segurelha e uma de A-115 Especial Farinha, com incorporação da mesma percentagem de subproduto, para se avaliar se este poderá contribuir para melhorar a segurança microbiológica das rações. Estas amostras foram enviadas para a empresa Siliker Portugal, S.A. para análise microbiológica, uma vez que na Ovargado não é possível realizar este tipo de análise. Foram requisitadas análises a coliformes a 30 °C, bolores, leveduras e *Salmonella spp.*

2.5. Animais e alojamento

O ensaio experimental em frangos foi realizado no Instituto Superior Politécnico de Viseu e teve a duração de 35 dias. Um total de 192 frangos de carne foram aleatoriamente divididos por 4 tratamentos, cada um com 4 réplicas. Cada grupo foi alojado em diferentes boxes, equipadas com um bebedouro e um comedouro, como pode ser visto pela **Figura 9**. A temperatura ambiente e a humidade relativa foram controladas.

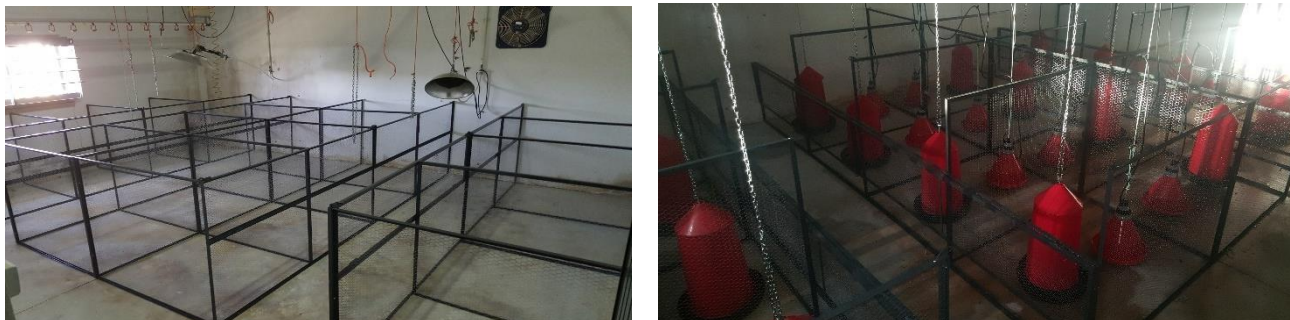


Figura 9 – Boxes onde os frangos foram alojados, cada uma contendo um bebedouro e um comedouro.

2.6. Tratamentos dietéticos

Para atender às necessidades nutricionais dos frangos durante o período experimental, foram formulados dois tipos de ração: o A-105 Migalha que consiste numa ração destinada a pintos em crescimento e o A-115 Especial Farinha que consiste numa ração para frangos de acabamento, podendo ser administrada a partir das 4 semanas. O aspeto visual de ambas as rações está apresentado na **Figura 10**.

Na **Tabela 9** encontram-se representados todos os ingredientes que compõem a formulação de ambas as dietas. Já na **Tabela 10** estão apresentados os constituintes analíticos (%) declarados no rótulo de ambas as rações. Por fim, a **Tabela 11** mostra os aditivos alimentares que foram adicionados a cada formulação.

Os quatro tratamentos dietéticos fornecidos aos animais foram: um grupo controlo, que consistiu na ração normalmente produzida pela Ovargado, e os restantes grupos consistiram na dieta basal com a adição de 1 %, 2 % e 4 % de subproduto moído de segurelha. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a ração e água, durante todo o período experimental.



Figura 10 – Aspetto visual das formulações para a fase de crescimento (lado esquerdo) e para a fase de acabamento (lado direito).

Tabela 9 – Composição da dieta de crescimento, A-105 Migalha, e da dieta de acabamento, A-115 Especial Farinha.

Ingredientes (A-105 Migalha)	Ingredientes (A-115 Especial Farinha)
Milho	Milho
Bagaço de soja extratado	Bagaço de soja extratado
Sêmea de arroz	Sêmea de arroz
Farinha de bolacha	Farinha de bolacha
Farinha forrageira de milho	Fosfato bi-cálcico
Sêmea de trigo	Sêmea de trigo
Fosfato bi-cálcico	Melaço de cana de açúcar
Óleo de soja	Carbonato de cálcio
Trigo	Óleo de soja
Soja tostada	Cloreto de sódio
Melaço de cana de açúcar	Algas marinhas calcárias
Carbonato de cálcio	FOS: Fruto-oligossacarídeos
Algas marinhas calcárias	
Cloreto de sódio	
FOS: Fruto-oligossacarídeos	

Tabela 10 – Constituintes analíticos (%) declarados no rótulo do A-105 Migalha e do A-115 Especial Farinha.

Constituintes analíticos (A-105 Migalha)	%	Constituintes analíticos (A-115 Especial Farinha)	%
Proteína Bruta	21	Proteína Bruta	18
Fibra Bruta	3,9	Fibra Bruta	3,5
Matéria Gorda Bruta	4,5	Matéria Gorda Bruta	3,9
Cinza Bruta	6,1	Cinza Bruta	5,7
Cálcio	0,9	Cálcio	0,9
Fósforo	0,9	Fósforo	0,8
Sódio	0,2	Sódio	0,2
Metionina	0,6	Metionina	0,3
Lisina	1,3	Lisina	0,9

2.7. Parâmetros usados para avaliar o desempenho produtivo dos animais

Foi registado o peso vivo de cada frango no 1º dia e no 35º dia. Para além disso, foi também registada a quantidade de ração ingerida diariamente e o ganho médio diário de peso, para se poder calcular o índice de conversão alimentar:

Índice de conversão alimentar (ICA)

$$ICA = \frac{\text{Ingestão média diária de ração}}{\text{Ganho médio diário de peso}}$$

2.8. Análise estatística

Os resultados obtidos por análise NIR para a humidade, amido, proteína, fibra, gordura, cinzas, cálcio e fósforo para cada tipo de ração foram avaliados estatisticamente por recurso a um teste one-way ANOVA, com um intervalo de confiança de 95 % (recorrendo-se ao programa GraphPad Prism 8.0.1). As diferenças consideraram-se significativas quando $p \leq 0,05$. Os resultados do desempenho produtivo (peso vivo, ingestão média diária de ração, ganho médio diário de peso e ICA) foram também avaliados recorrendo-se ao mesmo teste acima referido.

Tabela 11 – Aditivos por quilograma de alimento para cada formulação.

Aditivos por kg		
Vitaminas, pró-vitaminas e substâncias quimicamente semelhantes	A-105 Migalha (crescimento)	A-115 Especial Farinha (acabamento)
Vitamina A	15000 UI ¹	7500 UI ¹
Vitamina D3	3000 UI ¹	2000 UI ¹
Vitamina E	40 mg	7,5 mg
Vitamina K3	2 mg	2 mg
Vitamina B1	2 mg	1 mg
Vitamina B2	4 mg	5,5 mg
Pantotenato de cálcio	10 mg	8,4 mg
Niacina	30 mg	25 mg
Vitamina B6	3 mg	1,9 mg
Ácido fólico	1 mg	0,5 mg
Vitamina B12	25 µg	12,5 µg
Biotina	0,1 mg	---
Cloreto de colina	240 mg	238 mg
Betaína	75 mg	4,2 mg
Compostos de Oligoelementos		
Selênio	0,1 mg	0,2 mg
Ferro	50 mg	20 mg
Iodo	0,800 mg	1,9 mg
Manganês	60 mg	80 mg
Cobre	10 mg	6,25 mg
Zinco	40 mg	52 mg
Aminoácidos e seus sais análogos		
L-Lisina	2150 mg	750 mg
DL-Metionina	3050 mg	600 mg
L-Treonina	800 mg	100 mg
L-Triptofano	---	50 mg
Melhoradores de digestibilidade		
Fitase	750 FTU ²	500 FTU ²
Conservantes		
Ácido fórmico + Formiato de Amônio	205 mg	205 mg
Ácido propiônico + Propionato amônico	91 mg	91 mg
Antioxidantes		
Hidroxitolueno Butilado	---	0,125 mg
Substâncias para a redução de contaminação da ração por micotoxinas		
Bentonite	1500 mg	1500 mg
Coccidiostáticos e Histomonostáticos		
Monensina de Sódio	100 mg	100 mg
Corantes		
Cantaxantina	25 mg	6 mg

¹Unidades internacionais; ²Unidade de atividade de fitase.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização química das rações (de crescimento e de acabamento) por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)

A espectroscopia de infravermelho próximo é uma técnica de análise rápida, que, quando devidamente calibrada, é capaz de determinar inúmeros parâmetros químicos simultaneamente. Esta vantagem levou a que seja utilizada como técnica de controlo rápido nas indústrias de alimentação para animais. A base desta tecnologia reside na absorção de energia por grupos funcionais que contêm hidrogénio em compostos orgânicos presentes nos alimentos. Sendo que os espectros de absorção correspondem principalmente a ligações de C-H, O-H, N-H e S-H, que são as moléculas mais comuns encontradas nos compostos orgânicos [95].

A técnica NIR, apresenta como princípio fundamental a energia absorvida por uma amostra quando esta é irradiada. No entanto, a luz absorvida vai depender da frequência de vibração única característica de cada grupo funcional [95].

Na Ovargado, esta técnica é utilizada para acompanhamento no controlo da composição química, desde a receção da matéria-prima até à produção final do alimento. Uma vez que a composição química das matérias-primas é determinada logo após a receção, é possível, através da análise rápida do NIR, obter de forma quase instantânea os resultados dos parâmetros pretendidos, permitindo o ajuste de formulações de acordo com o perfil nutricional de cada lote de matéria-prima. A produção dos alimentos compostos tem como base um processo produtivo otimizado e automático que, no entanto, está sujeito a desvios humanos e/ou operativos, que obrigam a um conjunto de controlos que confirmem as especificações de todos os lotes de alimento produzido quer para controlo interno, quer para o cumprimento legislativo [95].

Ambas as rações controlo foram formuladas pela Ovargado, recorrendo a matérias-primas e subprodutos comuns na indústria da alimentação animal. Os resultados obtidos por análise NIR para as formulações controlo e para as formulações com adição de segurelha encontram-se apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Análise química das rações obtida por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR). Valores expressos em %, da média de 4 amostras.

	Humidade	Amido	Proteína	Fibra	Gordura	Cinzas	Cálcio	Fósforo
A-105 Migalha (ração de crescimento)								
Controlo	12,1	41,0	18,5	3,5	3,7	5,7	1,02	0,60
1 % segurelha	11,3	41,9	18,7	3,8	3,6	5,9	1,07	0,59
2 % segurelha	11,5	41,2	19,0	4,0	3,5	6,1	1,03	0,60
4 % segurelha	11,7	41,3	18,7	4,2	3,5	6,2	1,03	0,60
p-value	< 0,0001	0,1833	0,4606	< 0,0001	0,2437	< 0,0001	0,6982	0,9095
A-115 Especial Farinha (ração de acabamento)								
Controlo	12,6	45,4	16,4	3,4	3,3	5,2	0,85	0,56
1 % segurelha	12,5	45,3	16,4	3,6	3,0	5,4	0,89	0,57
2 % segurelha	13,2	45,3	16,1	3,8	2,3	5,6	0,94	0,57
4 % segurelha	12,7	45,8	16,0	3,9	2,8	5,6	0,89	0,58
p-value	0,0033	0,8304	0,0803	0,0016	0,0556	0,0005	0,3559	0,0951

Através da análise da **Tabela 12**, verifica-se que, tanto para a formulação de crescimento como para a de acabamento, os valores de proteína, gordura, amido, cálcio e fósforo não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Já os teores de fibra, cinzas e humidade foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). A diferença que se observa para os teores de humidade é inconclusiva, pois estes valores aumentam e diminuem com a adição de percentagens gradualmente superiores do subproduto. Já os valores de fibra aumentaram ligeiramente com a incorporação de % superiores do subproduto de segurelha, o que já seria expectável pois os subprodutos são constituídos maioritariamente por caules, que são materiais lenhocelulósicos, sendo estes contabilizados como fibra insolúvel. Comparativamente, no caso da segurelha-de-verão, as folhas, que não são constituídas por tecidos lenhificados, já são compostas por 50 % de fibra (**Tabela 13**), no caso dos caules será um valor superior. Por fim, as cinzas também aumentaram

gradualmente com a adição de % superiores do subproduto. A fração das cinzas representa as substâncias inorgânicas presentes na ração, isto é, os minerais. As plantas do género *Satureja* são consideradas boas fontes de minerais [96]. Na literatura, não é possível encontrar a análise nutricional da segurelha-de-inverno (*Satureja montana*), no entanto, através da análise da **Tabela 13**, pode-se verificar que, aproximadamente, 10 % da composição das folhas da planta segurelha-de-verão (pertence ao mesmo género de plantas que a segurelha-de-inverno) é composta por cinzas. Usualmente, as cinzas estão presentes nos caules em quantidades semelhantes, o que poderá justificar o seu aumento aquando da adição do subproduto [97], [98].

Tabela 13 – Constituintes nutricionais de folhas provenientes da planta segurelha-de-verão, secas e moídas, por 100 g (Adaptada da base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA).

Constituinte	Valor	Unidade
Água	9	g
Energia	272	kcal
Proteína	6,7	g
Gordura	5,9	g
Cinzas	9,6	g
Hidratos de carbono	68,7	g
Fibra dietética	45,7	g
Cálcio	2132	mg
Fósforo	140	mg

Pela análise da **Tabela 14** pode-se verificar que alguns dos constituintes analíticos obtidos na análise NIR para a formulação controlo diferem daqueles declarados no rótulo. Os valores declarados no rótulo são calculados de acordo com as características nutricionais das matérias-primas utilizadas para produzir um determinado alimento composto para animais. No entanto, existem limites legais a ter em conta quanto à rotulagem de alimentos compostos para animais, que foram criados devido à existência de possíveis variações dos parâmetros químicos durante a produção [95].

O Regulamento (CE) nº 767/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 13 de julho de 2009 indica quais as tolerâncias a ter em conta quanto à rotulagem. Sempre que se verifique que a composição de uma matéria-prima para alimentação animal ou de um

alimento composto para animais se desvia do valor constante do rótulo relativamente aos constituintes analíticos, aplicam-se as tolerâncias descritas na **Tabela 15**. Estas tolerâncias incluem desvios técnicos e analíticos e são indicadas como um valor percentual absoluto ou como um valor relativo seguido de «%».

Tabela 14 – Comparação entre os constituintes analíticos obtidos por análise de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) (%) e os declarados no rótulo (%) para ambas as formulações.

Constituintes químicos	A-105 Migalha (controlo)		A-115 Especial Farinha (controlo)	
	NIR (%)	Rótulo (%)	NIR (%)	Rótulo (%)
Proteína Bruta	18,5	21	16,4	18
Fibra Bruta	3,5	3,9	3,4	3,5
Matéria Gorda Bruta	3,7	4,5	3,3	3,9
Cinza Bruta	5,7	6,1	5,2	5,7
Cálcio	1,02	0,90	0,85	0,90
Fósforo	0,60	0,90	0,56	0,80

Tabela 15 - Limites legais quanto ao valor declarado no rótulo (Adaptado do Regulamento (CE) nº 767/2009 de 13 de julho de 2009).

Constituinte	Teor declarado do constituinte	Tolerância ⁽¹⁾	
		Abaixo do valor constante do rótulo	Acima do valor constante do rótulo
	[%]		
Matéria gorda bruta	< 8	1	2
	8 - 24	12,5 %	25 %
	> 24	3	6
Proteína bruta	< 8	1	1
	8 – 24	12,5 %	12,5 %
	> 24	3	3
Cinza bruta	< 8	2	1
	8 – 32	25 %	12,5 %
	> 32	8	4
Fibra bruta	< 10	1,75	1,75
	10 – 20	17,5 %	17,5 %
	> 20	3,5	3,5
Cálcio	< 1	0,3	0,6

	1 – 5	30 %	60 %
	> 5	1,5	3
Fósforo total	< 1	0,3	0,3
	1 – 5	30 %	30 %
	> 5	1,5	1,5

(¹) As tolerâncias são indicadas como um valor percentual absoluto (este valor deve ser subtraído/acrescentado ao teor declarado) ou como um valor relativo seguido de «%» (esta percentagem deve ser aplicada ao teor declarado para calcular o desvio aceitável).

Como se pode verificar pela **Tabela 14**, o valor obtido para a proteína bruta é aquele que se encontra mais discrepante em ambas as formulações. Ao aplicarmos as tolerâncias referidas na **Tabela 15**, como os valores de proteína bruta obtidos pela análise NIR se encontram abaixo do valor constante do rótulo e estão entre 8 e 24 %, é necessário aplicar-se uma tolerância com um valor relativo de 12,5 % e, portanto, pode-se concluir que ambos os valores se encontram dentro dos limites legais.

Relativamente à fibra bruta, matéria gordura bruta e cinza bruta os valores obtidos por análise NIR encontram-se ligeiramente abaixo dos valores declarados no rótulo para ambas as rações (**Tabela 14**). As tolerâncias (**Tabela 15**) para a fibra bruta, matéria gorda bruta e cinza bruta apresentam um valor percentual absoluto de 1,75, 1 e 2, respetivamente, o que permite concluir que estes constituintes estão dentro dos limites legais. No que diz respeito aos minerais, o valor de cálcio obtido por análise NIR foi ligeiramente superior ao valor declarado no rótulo para o A-105 (**Tabela 14**), tendo por isso de se aplicar uma tolerância no valor percentual absoluto de 0,6. Conclui-se que este constituinte está dentro dos limites legais. Já para o A-115, o cálcio foi ligeiramente inferior ao valor declarado no rótulo (**Tabela 14**). Aplicando-se a tolerância no valor percentual absoluto de 0,3, pode-se concluir que este constituinte também se encontra dentro dos limites legais para a ração de acabamento. Já os valores obtidos para o fósforo encontram-se ligeiramente abaixo em ambas as formulações (**Tabela 14**). Contudo, quando se aplica a tolerância (**Tabela 15**), que apresenta um valor percentual absoluto de 0,3, verifica-se que o fósforo também se encontram dentro dos limites legais.

3.1.1. Formulações para o período de crescimento (A-105 Migalha)

As necessidades em aminoácidos dos frangos de carne diminuem de forma constante à medida que as aves crescem, sendo por isso necessário fornecer dietas com diferentes teores destes constituintes [15]. A fase de crescimento dos frangos é, a seguir à fase de iniciação, o período com maiores necessidades em proteína, pois está a ser produzida uma grande quantidade de tecido muscular, para acompanhar o rápido crescimento dos animais. Os valores de proteína obtidos por análise NIR para cada tipo de ração diferem do valor recomendado pela FEDNA (21 %) (**Tabela 1**). Os maiores contribuintes de proteína para a formulação são o bagaço de soja (~ 44 % de proteína) e a soja integral tostada.

Relativamente à gordura, na literatura, não são apresentadas necessidades específicas dos frangos neste nutriente, mas sim em ácido linoleico, que consiste num ácido gordo essencial [14]. No entanto, a técnica de análise NIR não permite determinar o teor de ácido linoleico presente na formulação. Apesar de alguns ingredientes adicionados à formulação apresentarem gordura na sua composição, a maior fonte de gordura adicionada foi o óleo de soja, que é rico em ácido linoleico. Este ácido representa 54 % da composição do óleo de soja em ácidos gordos presentes nos triacilgliceróis [99]. Como as rações foram administradas na forma de farinha, e o processo de produção destas não envolve temperatura, em princípio, as propriedades do óleo serão mantidas e os níveis de ácido linoleico assegurados.

Também não há nenhuma recomendação na literatura correspondente às necessidades de amido para frangos de carne. No entanto, este, em conjunto com os lípidos e outros açúcares, são importantes para os animais manterem reservas energéticas adequadas. Os teores de amido devem-se, essencialmente, aos cereais (milho, trigo, etc.) utilizados na formulação.

A fibra é outro parâmetro importante na dieta e tem de ser controlado para evitar problemas na absorção de nutrientes, no equilíbrio da microflora e na consistência das fezes do animal [100]. Segundo as recomendações da FEDNA [15], a fibra deve estar presente nas rações de crescimento no intervalo de 3,0 a 4,1 %. O valor obtido pela análise NIR foi de 3,5 % para o controlo e de 3,8 %, 4,0 % e 4,1 %, quando se adicionou 1 %, 2 % e 4 % de pó obtido do subproduto de segurelha (PSS). Estes valores encontram-se dentro do intervalo anteriormente referido. É importante definir uma recomendação máxima e mínima de fibra bruta, uma vez que concentrações muito elevadas na ração podem afetar a biodisponibilidade

de minerais, prejudicando a sua absorção [101]. Para além disso, tem-se verificado que a alta capacidade de absorção de água da fração solúvel contribui para a redução na ingestão de alimento devido ao volume ocupado no trato digestivo e à passagem mais lenta da digesta. Por outro lado, níveis muito baixos de fibra, retardam o desenvolvimento da moela e prejudicam a motilidade e saúde intestinal das aves [15].

A fração das cinzas representa as substâncias inorgânicas presentes na ração. Quando um alimento é queimado a 550-570 °C, a matéria orgânica transforma-se em CO₂, H₂O e NO₂, permanecendo os minerais presentes no alimento. É obrigatório de acordo com a regulação europeia [(CE) N° 767/2009] declarar a quantidade destes materiais. Nas tabelas da FEDNA, não é apresentada nenhuma recomendação para o teor de cinzas. No entanto, pode-se verificar pela **Tabela 12** que os valores obtidos de cinzas para as formulações de crescimento foram superiores aos valores obtidos para as formulações de acabamento, tal como era de prever, pois os animais apresentam maiores necessidades em minerais na fase de crescimento [15].

O cálcio e o fósforo são necessários para várias funções dentro do corpo do animal, sendo vitais na formação do esqueleto [15]. Os níveis de cálcio e fósforo recomendados pela FEDNA para esta fase são de 0,90 % a 0,95 % para o cálcio e de 0,58 % para o fósforo. Os valores obtidos das amostras controlo para o cálcio e para o fósforo foram de 1,02 % e 0,60 %, respetivamente, podendo-se verificar que ambos os minerais diferem, embora que ligeiramente, dos valores recomendados pela FEDNA. Quando se adicionou 1 %, 2 % e 4 % de PSS, os valores obtidos para o cálcio foram de 1,07 %, 1,03 % e 1,03 %, respetivamente. Estes valores encontram-se ligeiramente acima do intervalo recomendado. Quando se adicionou 1 %, 2 % e 4 % de PSS, os valores obtidos para o fósforo foram de 0,59 %, 0,60 % e 0,60 %. Estes valores encontram-se ligeiramente acima da quantidade recomendada.

3.1.2. Formulações para o período de acabamento (A-115 E Fr)

Os frangos de carne na fase de iniciação e crescimento têm elevadas necessidades em aminoácidos para que possam atender ao seu rápido crescimento. No entanto, no período de acabamento as necessidades diminuem, apesar do tamanho corporal dos animais ser maior [102]. Os valores de proteína obtidos por análise NIR para a ração de acabamento diferem do valor recomendado pela FEDNA (18,5 %) [15]. Nesta formulação, a principal fonte de proteína adicionada foi o bagaço de soja, não sendo necessário adicionar soja integral tostada

como na formulação de crescimento, uma vez que as necessidades proteicas dos frangos nesta fase são inferiores [103].

Tal como para a formulação de crescimento, na literatura, não são apresentadas necessidades específicas em gordura, mas sim em ácido linoleico. Na fase de crescimento, os frangos necessitam de uma maior quantidade de ácido linoleico, pois ocorre uma maior multiplicação celular e também requerem uma maior matriz de lipídios para formar as membranas celulares. A maior fonte de gordura adicionada foi, novamente, o óleo de soja. Como já tinha sido referido anteriormente, este óleo é rico em ácido linoleico, assegurando as quantidades necessárias sugeridas pela FEDNA.

Segundo as recomendações da FEDNA [15], os teores de fibra na formulação de acabamento devem situar-se no intervalo de 3,1 % a 4,3 %. O valor obtido pela análise NIR (**Tabela 12**) para esta formulação foi de 3,4 % para o controlo e de 3,6 %, 3,8 % e 3,9 % quando se adicionou 1 %, 2 % e 4 % de PSS, respetivamente, o que permite concluir que todos os valores se encontram dentro do intervalo recomendado.

Relativamente aos minerais, os níveis de cálcio e fósforo recomendados pela FEDNA para a fase de acabamento são de 0,75 % a 0,85 % para o cálcio e de 0,56 % para o fósforo. Os valores obtidos das amostras controlo para o cálcio e para o fósforo foram de 0,85 % e 0,56 %, podendo-se verificar que ambos os minerais estão de acordo com os valores recomendados pela FEDNA. Quando se adicionou 1 %, 2 % e 4 % de PSS, os valores obtidos para o cálcio foram de 0,89 %, 0,94 % e 0,89 %, respetivamente. Estes valores encontram-se ligeiramente acima do intervalo recomendado pela FEDNA. Quando se adicionou 1 %, 2 % e 4 % de PSS, os valores obtidos para o fósforo foram de 0,57 %, 0,57 % e 0,58 %, respetivamente. Estes resultados encontram-se ligeiramente acima do valor recomendado [15].

3.2. Análise microbiológica das rações

É importante referir que não existem limites máximos legais microbiológicos, harmonizados a nível comunitário em alimentos para animais. No entanto, alguns Estados-membro optaram por legislar, a nível nacional, para alguns microrganismos considerados de maior relevância nesta indústria. Em Portugal, existe legislação para a existência de *Salmonella* em alimentos para animais, a qual refere que “os alimentos para animais não podem conter agentes microbianos comprovadamente responsáveis por patogenicidade para

os animais ou para o Homem, designadamente do género *Salmonella*”, (Decreto-Lei nº 105/2003) [104]. No entanto, as empresas do setor, além da monitorização da *Salmonella*, também definem critérios para outros agentes microbianos, como enterobactérias e fungos. Os critérios são definidos internamente pela empresa de forma a garantir a performance produtiva, o bem-estar dos animais que os consomem, a conservação do alimento ou a saúde pública.

Tabela 16 – Critérios microbiológicos: Limites Máximos Admissíveis pela empresa Ovargado S.A.

	Fungos	Enterobactérias Totais	Coliformes	<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	Aflatoxinas
Unidade	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	Presença em 25 g	ppb
Matéria-prima	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	< 10	Negativo	10
Rações – Farinha	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	< 10	Negativo	10

Tabela 17 – Resultados da análise microbiológica realizada ao A-105 Migalha: controlo e com a adição de 4 % de subproduto moído de segurelha.

Determinação	Resultado (controlo)	Resultado (4 % de segurelha)	Unidade
Contagem de coliformes a 30 °C	4,5 × 10 ²	4,0 × 10 ²	UFC/g
Contagem de bolores	2,4 × 10 ³	2,3 × 10 ³	UFC/g
Contagem de leveduras	2,4 × 10 ³	2,2 × 10 ³	UFC/g
Pesquisa de <i>Salmonella spp</i>	Não detetado	Não detetado	/25g

Tabela 18 – Resultados da análise microbiológica realizada ao A-115 Especial Farinha: controlo e com a adição de 4 % de subproduto moído de segurelha.

Determinação	Resultado (controlo)	Resultado (4 % de segurelha)	Unidade
Contagem de coliformes a 30 °C	3,8 × 10 ⁴	3,1 × 10 ⁴	UFC/g
Contagem de bolores	4,1 × 10 ³	4,0 × 10 ³	UFC/g
Contagem de leveduras	1,7 × 10 ³	1,8 × 10 ³	UFC/g
Pesquisa de <i>Salmonella spp</i>	Não detetado	Não detetado	/25g

Através da observação da **Tabela 16**, pode-se verificar que os limites máximos admissíveis considerados pela empresa para as rações em farinha são: para Coliformes 10^4 UFC/g; para bolores e leveduras (Fungos) 10^5 UFC/g e para a *Salmonella* ausente em 25 g. A partir da análise das tabelas acima apresentadas (**Tabela 17** e **Tabela 18**) pode-se concluir que, para as ambas as formulações, os níveis de coliformes, bolores e leveduras estão de acordo com os limites máximos estabelecidos pela empresa Ovargado S.A.

Os alimentos para animais geralmente não são submetidos aos mesmos critérios e padrões microbiológicos rigorosos que os alimentos consumidos pelos seres humanos [105]. A contaminação microbiana das rações pode ocorrer durante o armazenamento, transporte, processamento e produção. A taxa de contaminação depende: (i) das condições de armazenamento; (ii) da qualidade bacteriológica das matérias-primas; (iii) da tecnologia de produção; (iv) da composição dos alimentos (nível de hidratos de carbono, gorduras e proteínas) [106]. Existem inúmeras formas pelas quais os MOs contaminantes podem afetar negativamente a qualidade dos alimentos, incluindo: (i) redução da matéria seca, o que provoca uma diminuição do valor nutricional e pode afetar a saúde animal; (ii) aparecimento de odores a mofo ou azedo; (iii) endurecimento da ração; (iv) produção de toxinas [105].

Os coliformes são um grupo de espécies constituído por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, habitantes no aparelho intestinal do homem e de outros animais homeotérmicos e, por este motivo, são considerados indicadores de contaminação fecal. Este parâmetro serve como indicador das condições sanitárias do local de processamento do alimento e, ainda, como indicador de qualidade [107]. No presente trabalho, os coliformes ocorreram na ordem dos $10^2 - 10^4$ UFC/g (**Tabela 17** e **Tabela 18**), sendo valores inferiores aos reportados na literatura para diversas marcas de rações, onde estes MOs ocorriam na ordem dos $10^4 - 10^6$ UFC/mL [108]. Sendo assim, o limite máximo admissível estabelecido pela empresa Ovargado S.A. (10^4 - **Tabela 16**) parece ser adequado para controlar a presença destes MOs nas rações.

Os bolores são fungos multicelulares, filamentosos, cujo crescimento nos alimentos é conhecido imediatamente pelo seu aspeto semelhante ao algodão. São constituídos por filamentos ramificados cujo conjunto origina o micélio, responsável pela fixação do bolor no substrato e pela reprodução por esporos [107]. Alguns dos bolores associados aos alimentos para animais incluem várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*

[109]. Por outro lado, as leveduras são fungos não filamentosos, unicelulares e de variadas formas que se reproduzem principalmente por brotamento [107]. As leveduras incluem espécies de *Candida*, *Saccharomyces* e *Torulopsis* [109]. Tanto os bolores como as leveduras causam vários níveis de deterioração e decomposição dos alimentos. Esta flora microbiana é considerada um indicador do índice de higiene [107]. Inúmeros parâmetros físicos, como oxigênio, pH, tempo de armazenamento, temperatura ambiente e humidade relativa, afetam a colonização fúngica [106]. No presente trabalho, foram obtidos valores na ordem dos 10^3 para ambos os fungos (**Tabela 17** e **Tabela 18**), estando de acordo com os valores encontrados na literatura em várias marcas de rações, que apresentaram uma contaminação por leveduras e bolores entre $10^2 - 10^4$ UFC/g e $10^3 - 10^7$ UFC/g, respetivamente [106]. Sendo assim, o limite máximo admissível estabelecido pela Ovargado (10^5 - **Tabela 16**) para os fungos parece ser adequado para controlar a presença deste MOs.

Vários bolores presentes na contaminação dos alimentos, e algumas leveduras, podem representar perigo para a saúde dos animais, devido à sua capacidade de produzirem micotoxinas. Essas substâncias surgem do metabolismo secundário dos fungos em resposta a uma ampla gama de fatores genéticos e ambientais. No entanto, a presença dessas substâncias nas matérias-primas e alimentos compostos segue diretrizes regulatórias [109].

Importa ainda referir que a presença de *Salmonella* não foi detetada em nenhuma das amostras, tal como estipulado por lei [110]. Esta bactéria é um microrganismo patogénico entérico, que exige particular atenção na produção de alimentos compostos para animais, uma vez que os animais usados para alimentação humana, e especialmente as aves e os produtos derivados destas, são considerados a principal fonte de salmonelose em humanos [111]. Existem apenas duas espécies deste género causadores de doença em humanos, *enterica* e *bongori*, mas quase 2.700 sorotipos [112]. Esta bactéria é transmitida pela ingestão de alimentos crus ou mal cozinhados que estejam contaminados, sendo por isso muito importante assegurar o cozimento total da carne de frango antes de a ingerir.

A *Salmonella* faz parte da microbiota normal presente no intestino das aves e, por essa razão, é natural que esteja presente nas suas fezes. Para além desta bactéria, uma grande variedade de outros MOs são encontrados normalmente no intestino das aves. Para que a ave se apresente saudável todos os microrganismos tem de estar em equilíbrio, portanto, esta só irá apresentar salmonelose quando a população de *Salmonella* aumentar além do máximo

suportável pelo organismo, provocando uma desregulação no equilíbrio da microbiota intestinal [111].

De acordo com a EFSA, os ingredientes com maior risco de contaminação por *Salmonella spp.* nas fábricas de ração e produtos finais são as farinhas de oleaginosas e as farinhas de origem animal, ambas fontes alimentares ricas em proteína [113]. As formulações utilizadas neste trabalho continham bagaço de soja, que é uma farinha de oleaginosa e que poderia ser uma possível fonte de contaminação. Para além disso, as rações em farinha poderão ser mais suscetíveis à contaminação com *Salmonella spp.* do que as rações granuladas, pois a sua produção não envolve temperatura, e o tratamento térmico é uma das principais medidas para eliminar as bactérias presentes nas rações [114]. Outras formas de controlar a presença de *Salmonella* é através de tratamento químico, que consiste na adição de ácidos orgânicos à ração [115]. O ácido fórmico e o ácido propiónico são os mais utilizados [115], tendo sido também adicionados às formulações deste trabalho como aditivos alimentares (**Tabela 11**).

As análises microbiológicas realizadas tanto à formulação de crescimento como à de acabamento com adição de 4 % do subproduto de segurelha, parecem mostrar uma ligeira redução nos níveis de coliformes, bolores e leveduras comparativamente ao controlo, exceto na formulação de acabamento, para a qual se parece verificar um ligeiro aumento no valor das leveduras. A presença de *Salmonella* não foi detetada em nenhuma das amostras. As diminuições que se observam sugerem que a presença de segurelha, poderá ter um efeito antimicrobiano nas rações, associado aos seus constituintes maioritários, o carvacrol e o timol [55]. Estes resultados servem apenas como base de suporte para a hipótese de que a segurelha poderá contribuir para melhorar a segurança microbiológica das rações, apresentando um efeito conservante, no entanto, teriam de ser efetuados mais ensaios para o confirmar. Apesar disso, foi também demonstrado que os óleos essenciais obtidos de subprodutos de *Satureja montana* provenientes da Ervital possuem atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Salmonella enterica* [69].

3.3. Parâmetros de desempenho dos frangos

Tabela 19 – Efeito dos diferentes tratamentos dietéticos no desempenho produtivo dos frangos de carne. Valores expressos pela média de 4 animais.

Tratamento	Ingestão média diária de ração (g)	Ganho médio diário de peso (g)	Índice de conversão alimentar	Peso vivo no 1º dia (g)	Peso vivo no 35º dia (g)
Controlo	108,615	50,686	2,143	40,150	1814,150
1 % segurelha	100,505	51,671	1,945	40,850	1849,325
2 % segurelha	103,830	49,156	2,112	39,950	1760,400
4 % segurelha	118,445	49,781	2,379	40,225	1782,550
<i>p</i> -value	0,560	0,339	0,501	0,130	0,330

Os dados que mostram o desempenho produtivo dos animais encontram-se sumarizados na **Tabela 19**. Os frangos que receberam uma dieta contendo 1 % do pó obtido do subproduto de segurelha (**PSS**) apresentaram uma maior média dos pesos corporais, um maior ganho médio diário de peso e um menor ICA, comparativamente aos restantes grupos, embora essa diferença não seja significativa ($p > 0,05$). Já a ingestão média diária de ração foi superior nos frangos que receberam uma dieta contendo 4 % PSS, comparativamente aos restantes grupos, apesar dessa diferença não ser significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, esse grupo foi o que apresentou um maior ICA (2,3793), o que significa que, neste caso, o desempenho dos animais foi menos eficaz, pois foi consumida mais ração para a produção de um quilo de frango [116]. Estes resultados corroboram com um outro estudo, em que a utilização de doses mais elevadas de uma determinada planta, provocou um aumento no ICA. Este aumento pode estar relacionado com o aumento na viscosidade do conteúdo intestinal quando se aumenta a concentração da planta que é adicionada à dieta [61]. O aumento da viscosidade intestinal é a causa frequente de efeitos negativos no desempenho produtivo das aves e do surgimento de problemas intestinais. O aumento na viscosidade dos conteúdos intestinais resulta num elevado período de retenção dos conteúdos digestivos, retardando o esvaziamento destes conteúdos. Para além disso, esse aumento na viscosidade também provoca uma fraca disponibilidade e absorção de nutrientes e diminuição da atividade enzimática devido à dificuldade das enzimas em acederem a todo o conteúdo digestivo (redução na digestibilidade proteica, amilácea e de lípidos) [117]. Apesar dos

animais estarem a ingerir uma maior quantidade de ração, o uso dos nutrientes não foi eficiente, o que resultou num baixo ganho de peso e num aumento no ICA.

Neste ensaio, a utilização de 1 % de PSS levou ao maior ganho de peso corporal, como já tinha sido referido, tendo este diminuído com a utilização de maiores quantidades de PSS (2 % e 4 %). Estes resultados são consistentes com um outro estudo, onde foram administradas 0,5 % e 1 % de uma outra espécie de segurelha (*Satureja hortensis*) em pó (as partes aéreas da planta foram secas ao sol e depois moídas), e também se verificou um maior ganho de peso no grupo administrado com a menor quantidade de segurelha [91]. Zamanimoghaddam *et al.* (2007) também verificaram que o uso de 0,3 % de segurelha teve um efeito benéfico no desempenho de crescimento em frangos de carne e doses mais elevadas tiveram um efeito adverso no desempenho [118].

O ICA do grupo 1 % PSS foi também o melhor comparativamente aos restantes grupos. Estes resultados corroboram com um outro estudo em que foi avaliado o efeito de 1 % e 2 % de pó obtido das partes aéreas de segurelha, onde se verificou que o ICA do grupo suplementado com 1 % de segurelha foi inferior ao do grupo suplementado com 2 % [90]. Também de forma semelhante, Rajaian *et al.* (2014) avaliou frangos de carne que receberam dietas de crescimento e acabamento sem a adição de segurelha (*S. hortensis*) e com a adição de 1 % de pó obtido das partes aéreas da planta. A comparação estatística dos pesos corporais médios em vários intervalos de tempo mostrou que os frangos do grupo com incorporação de 1 % de segurelha (1930 g) eram significativamente mais pesados do que os do grupo controlo (1837 g), uma diferença económica de cerca de 100 g entre os grupos controlo e experimental (aumento do lucro líquido em cerca de 5 %). Para além disso, o ICA do grupo suplementado com 1 % de segurelha (1,95) foi ligeiramente menor do que o grupo controlo (2,02) [92]. Como se pode verificar, os resultados deste estudo corroboram com outros estudos da literatura, onde também se observou uma melhoria no desempenho produtivo dos animais aquando da utilização de menores quantidades de segurelha em pó na alimentação de frangos de carne.

Apesar do ganho médio diário de peso ser superior no grupo suplementado com 1 % PSS, a ingestão média diária de ração foi superior no grupo suplementado com 4 % de PSS (4 % - 118,45 g; 1 % - 100,51 g). Esse efeito pode ser atribuído a uma mudança significativa na palatabilidade da ração, à medida que se vai aumentando a concentração de PSS. Num outro trabalho, Nobakht *et al.* (2012) observaram um aumento no consumo de ração apenas

no grupo suplementado com 2 % de pó de segurelha, enquanto esse aumento não foi observado nos frangos suplementados com 0,0 %, 0,5 %, 1,0 % ou 1,5 %, sugerindo que a palatabilidade da alimentação melhorou [119]. Embora as aves tenham um menor número de papilas gustativas comparativamente aos mamíferos, estas tem um paladar mais apurado, que sofre várias alterações ao longo do tempo [94].

Nos últimos anos, as plantas medicinais, como ervas ou extratos, têm sido muito utilizadas na tentativa de substituir/reduzir a utilização de coccidiostáticos (antiparasitários) e/ou melhorar o desempenho de aves. Os coccidiostáticos tem sofrido restrições ao seu uso, em especial, pela crescente preocupação dos consumidores em adquirir produtos livres de resíduos químicos na alimentação animal [120]. As plantas medicinais são fontes de fitobióticos, os quais são definidos como compostos químicos presentes em toda a planta ou em algumas partes específicas desta, que lhes conferem atividade terapêutica ou efeitos benéficos [92]. Assim como os coccidiostáticos, estes compostos parecem atuar no sentido de melhorar a saúde intestinal.

Algumas das propriedades medicinais das plantas do género *Satureja* já foram demonstradas, nomeadamente: propriedades antimicrobianas, antioxidantes, imunológicas, anti-inflamatórias, analgésicas, antidiabéticas, hipolipidémicas e anti-hipercolesterolémicas [69]. Muitas dessas propriedades são atribuídas ao seu elevado teor em timol e carvacrol [121].

O desempenho dos animais é influenciado principalmente pela sua saúde e estado imunológico. Um sistema imunológico stressado ou fraco, com uma elevada carga de doenças, dá origem a um baixo ganho de peso; por outro lado, um bom sistema imunológico permite o máximo desempenho dos animais. Portanto, a utilização de substâncias que estimulam o sistema imunológico, como a segurelha, pode resultar num melhor desempenho de crescimento [122].

Para além disso, o melhor desempenho dos animais pode estar relacionado com uma melhoria no equilíbrio da microflora gastrointestinal. Uma microflora inadequada no TGI levará a uma absorção desfavorável de nutrientes [123] e a crescentes necessidades de energia para manutenção dessa absorção [124]. O mecanismo de ação dos OEs de segurelha está provavelmente relacionado às propriedades de desintegração da membrana externa de MOs patogénicos pelo carvacrol e timol. Na literatura, alguns estudos sugerem que eles penetram nas células e interferem no seu metabolismo celular. Outros estudos indicam que

estes compostos alteram a permeabilidade das membranas celulares, o que leva a um vazamento de íons e moléculas, e provoca a morte celular [56]. Jamroz *et al.* [125] mostraram uma redução na população de *E. coli*, *Clostridium perfringens* e fungos e o aumento da população de *Lactobacillus spp.* no intestino, utilizando um extrato vegetal composto por capsaicina, cinamaldeído e carvacrol. Estes são alguns dos possíveis mecanismos que podem explicar o maior crescimento e melhor ICA em frangos que consomem segurelha.

A literatura publicada até ao momento sobre a segurelha como suplemento alimentar na dieta avícola é ainda ligeiramente escassa. No presente estudo, foram utilizados subprodutos de segurelha-de-inverno moídos (na forma de pó), no entanto, é necessário ter em conta que o tipo de produto (pó, extrato ou óleo essencial) e a espécie da planta podem causar possíveis diferenças na composição, o que pode afetar os resultados de desempenho de crescimento em frangos de carne.

Alguns estudos avaliaram o efeito de óleos essenciais de segurelha no desempenho de frangos. Num estudo realizado por Masouri *et al.* (2017), a suplementação da dieta com 500 mg/kg de óleo essencial de *Satureja Khuzistanica* aumentou o consumo de ração e o ganho de peso corporal. Para além disso, foi demonstrado o efeito antimicrobiano deste óleo essencial, uma vez que a suplementação com 500 mg/kg de OE de segurelha aumentou a população cecal de *Lactobacillus* e reduziu a contagem total de bactérias e *E. coli*. Por fim, o OE de segurelha foi também eficaz no aumento da altura das vilosidades, da relação altura-profundidade da cripta das vilosidades e diminuição da profundidade das criptas no duodeno. Essas mudanças resultaram numa melhoria da histologia intestinal, o que permitiu um aumento da área de absorção dos nutrientes [87].

Contrariamente ao estudo anterior, Goodarzi *et al.* (2014) mostraram que a suplementação da dieta com 500 mg/kg de OE de *Satureja khuzistanica* não teve efeito significativo no consumo de ração, mas o ganho médio diário de peso e o índice de conversão alimentar melhoraram significativamente. Os frangos que receberam a ração contendo OE apresentaram concentrações significativamente menores de colesterol (efeito anti-hipercolesterolémico da segurelha), HDL e glucose no sangue em comparação aos grupos controlo. É possível que o OE tenha estimulado o crescimento dos frangos de carne, através do aumento da entrada de glucose nos tecidos, atividade semelhante à hormona tireoidiana [94].

A adição de óleos essenciais de segurelha na água dos animais não parece mostrar resultados muito favoráveis, talvez pelo sabor amargo e picante do carvacrol. Num estudo foi verificado que a suplementação contínua com OE de *Satureja Khuzistanica* na água afetou adversamente o ganho médio diário de peso, o principal parâmetro económico na produção de frangos de carne. Este efeito é atribuído à redução no consumo de água pelas aves que recebem água “tratada”. O consumo adequado de água é fundamental para frangos de crescimento rápido, principalmente quando criados em temperaturas elevadas. As aves que consumiam água “tratada” apresentaram maior consumo de ração (cerca de 1 % a 2 %) em comparação com os grupos controlo, no entanto, a ração consumida não foi digerida e/ou utilizada com eficiência por essas aves, pois o ICA aumentou [126].

A segurelha pode prevenir a oxidação da dieta e atenuar os efeitos adversos causados pelas micotoxinas, através da atividade antioxidante dos seus constituintes [64]. Num estudo, foi avaliada a capacidade do óleo essencial de segurelha em neutralizar os efeitos adversos da aflatoxina B₁ no desempenho de crescimento e bioquímica sérica em frangos de carne. A adição de segurelha à dieta contaminada com aflatoxina B₁ diminuiu significativamente os efeitos inibitórios provocados por esta toxina no desempenho de crescimento (o ganho de peso e o consumo de ração tinham diminuído e o ICA tinha aumentado) e no nível de enzimas hepáticas no soro (que tinha aumentado). Estes resultados sugerem que a utilização de segurelha pode contribuir para melhorar a segurança e a qualidade dos produtos avícolas [88].

Poderá ser viável no futuro, avaliar o efeito da suplementação com OEs obtidos dos subprodutos de segurelha, uma vez que estes apresentam o princípio ativo (carvacrol) em maior concentração do que o pó utilizado no presente trabalho.

Para além disso, também já foi avaliada a utilização de extratos aquosos de segurelha na ração de frangos de carne. Normalmente esses extratos são preparados da seguinte forma: as partes aéreas da planta são colhidas e secas ao sol. De seguida, a planta seca é infundida em água a ferver a 100 °C (1 litro de água para 200 g de erva seca) por 10 minutos. Por fim, esse preparado é arrefecido à temperatura ambiente e coado para se obter o extrato aquoso. Num estudo utilizando esses extratos, os resultados não mostraram efeito significativo da suplementação no ganho de peso corporal, mas o ICA foi significativamente melhor nos frangos alimentados com 400 mg/kg de extrato aquoso de segurelha em comparação ao controlo. A maioria dos parâmetros sanguíneos e critérios de resposta imune avaliados nesse

estudo melhoraram significativamente com a suplementação. Não houve efeito significativo da dieta na contagem de *Lactobacillus*; no entanto, a contagem de *Escherichia coli* reduziu e a razão *Lactobacilli* / *E. coli* melhorou significativamente, o que sugere uma melhor saúde intestinal das aves tratadas com o extrato (efeito antimicrobiano da segurelha) [93].

Como se pode verificar pelos estudos acima apresentados, é necessária uma pesquisa mais aprofundada sobre a eficiência *in vivo* da utilização de segurelha, pois alguns resultados destes estudos são contraditórios. Além disso, é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos de ação que esta planta exerce no metabolismo dos animais.

4. Considerações finais

Este trabalho permitiu o desenvolvimento de novas formulações para a alimentação de frangos de carne com a incorporação de subprodutos de *Satureja montana*. Estas formulações permitiram valorizar um subproduto até à data nunca utilizado na alimentação destes animais, com vantagens a vários níveis, nomeadamente económicos, pois este poderá atuar como um promotor de crescimento e/ou um possível substituto dos coccidiostáticos.

O valor nutricional de todas as formulações foi avaliado utilizando a técnica NIR. Tanto para a formulação de crescimento como para a de acabamento, os valores de proteína, gordura, amido, cálcio e fósforo não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre as formulações, controlo e com incorporação de subproduto. Já os teores de fibra, cinzas e humidade foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Para além disso, foi também realizada análise microbiológica às formulações controlo e com adição de 4 % de subproduto moído de segurelha, de forma a averiguar se o nível de MOs presente nas rações está de acordo com os limites definidos pela empresa Ovargado, S.A. e pela legislação nacional. Os níveis obtidos de coliformes, bolores e leveduras encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela Ovargado. *Salmonella spp.* encontra-se ausente em ambas as amostras, conforme definido pela legislação nacional. A análise microbiológica realizada às formulações com adição de 4 % do subproduto de segurelha parece mostrar uma ligeira redução nos níveis de coliformes, bolores e leveduras comparativamente ao controlo. O teor de leveduras parece ter aumentado ligeiramente na formulação de acabamento. Os resultados sugerem que a segurelha poderá contribuir para melhorar a segurança microbiológica das rações.

Relativamente aos parâmetros produtivos dos animais, a ingestão média diária de ração durante o ensaio foi superior nos frangos que receberam uma dieta contendo 4 % do pó obtido do subproduto de segurelha (PSS), comparativamente aos restantes grupos, no entanto, essa diferença não é significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, esse grupo foi o que apresentou um maior ICA (2,3793), o que significa que, o desempenho dos animais foi menos eficaz, pois foi consumida mais ração para a produção de um quilo de frango. Os frangos que receberam uma dieta contendo 1 % PSS apresentaram uma maior média dos pesos corporais, um maior ganho médio diário de peso e um menor ICA, comparativamente aos restantes grupos, embora essa diferença não seja significativa ($p > 0,05$).

Os parâmetros produtivos avaliados durante o ensaio não foram significativamente afetados pelos tratamentos, no entanto, os resultados sugerem que a inclusão de 1 % de subproduto de segurelha na dieta de frangos poderá vir a ser usada como promotor de crescimento e/ou como uma possível alternativa aos coccidiostáticos na alimentação de frangos de carne.

5. Trabalho futuro

Perante o estudo realizado na presente dissertação, seria interessante em estudos futuros:

- Avaliar o número de coccídeos presentes no intestino dos animais, de forma a verificar se o subproduto de segurelha foi ou não eficaz na redução/eliminação destes parasitas;
- Avaliar também o número de oocistos presentes em amostras fecais recolhidas das camas nos animais;
- Realizar análise sensorial da carne, de forma a averiguar se o subproduto tem impacto nas características organoléticas do alimento, nomeadamente: sabor, cheiro, cor, textura, etc.;
- Realizar mais ensaios com diferentes percentagens de incorporação dos subprodutos de segurelha-de-inverno, de modo a avaliar qual permite o melhor desempenho produtivo dos animais;
- Avaliar a microbiologia intestinal dos animais, verificando-se assim se o subproduto apresenta atividade antimicrobiana;
- Investigar o efeito da segurelha nos parâmetros bioquímicos do soro, nomeadamente: proteína, albumina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos;
- Avaliar o efeito da utilização de óleo essencial obtido dos subprodutos de segurelha, pois o óleo essencial apresenta o princípio ativo da segurelha (carvacrol) em maior concentração (86,6 – 94,6 %).

6. Referências Bibliográficas

- [1] C. Torres-león, N. Ramírez-Guzman, L. Londoño-Hernandez, G. A. Martinez-Medina, R. Díaz-Herrera, V. Navarro-Macias, O. B. Alvarez-Pérez, B. Picazo, M. Villarreal-Vázquez, J. Ascacio-Valdes and C. N. Aguilar, “Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries”, *Frontiers in Sustainable Food System*, 2, 1–17, 2018.
- [2] M. Pintado and J. Teixeira, “Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado”, *Boletim de Biotecnologia*, 10–12, 2015.
- [3] R. Ravindran, S. S. Hassan, G. A. Williams, and A. K. Jaiswal, “A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes”, *Bioengineering*, 5, 1–20, 2018.
- [4] T. Muthamilselvan, T. F. Kuo, Y. C. Wu, and W. C. Yang, “Herbal remedies for coccidiosis control: A review of plants, compounds, and anticoccidial actions”, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 19, 2016.
- [5] “Utilização de coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados à alimentação animal”, *Relatório da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu*, 2008.
- [6] “Coccidiostats: Antibiotic or feed additive?” [Online]. Available: <https://www.poultryworld.net/Nutrition/Articles/2019/3/Coccidiostats-Antibiotic-or-feed-additive-401585E/>. [Accessed: 11-Dec-2019].
- [7] “Animal production | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations.” [Online]. Available: <http://www.fao.org/animal-production/en/>. [Accessed: 12-Dec-2019].
- [8] J. Santos, “Potencial antimicrobiano de subprodutos agroindustriais de Satureja montana como possíveis ingredientes em rações animais”, Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2018.
- [9] R. E. Quiroz-Castañeda and E. Dantán-González, “Control of avian coccidiosis: Future and present natural alternatives”, *BioMed Research International*, 2015, 1-11, 2015.
- [10] “Digestive system - Poultry Hub.” [Online]. Available:

- <http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/digestive-system/>. [Accessed: 11-Dec-2019].
- [11] “Monogastric Digestive System”, *Introduction to Animal Nutrition*, 2010, [Online]. Available: <https://pdfs.semanticscholar.org/243b/78c5edc3079d85e6dd28020aa255d837c508.pdf>. [Accessed: 12-Dec-2019].
- [12] C. P. Cabral, “Tecnologia mais limpa para produção de mel seco e sua inclusão em rações de frangos de corte”, Tese de doutoramento, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.
- [13] “Feed Ingredients - Poultry Hub.” [Online]. Available: <http://www.poultryhub.org/nutrition/feed-ingredients/>. [Accessed: 12-Dec-2019].
- [14] F. Kratzer, “Nutrient Requirements of Poultry”, *The National Academies Press*, 1994.
- [15] G. Santomá and G. G. Mateos, “Necesidades Nutricionales En Avicultura: Normas FEDNA”, 2018.
- [16] J. Ferreira, “Exploração de subprodutos de maçã como matérias-primas alternativas em formulações para *Columba livia*”, Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2015.
- [17] “PoultryWorld - Fibre plays a supporting role in poultry nutrition.” [Online]. Available: <https://www.poultryworld.net/Breeders/Nutrition/2012/2/Fibre-plays-a-supporting-role-in-poultry-nutrition-WP009965W/>. [Accessed: 13-Apr-2020].
- [18] B. Faria, L. Silva, V. Junior, A. Ferreira, H. Rostagno, L. Albino and M. Hannas, “Organic trace minerals and calcium levels in broilers’ diets to 21 days old”, *Scientia Agricola*, 77, 1–9, 2020.
- [19] M. Pal, “The Role of Minerals and Vitamins in Poultry Production”, 68-71, 2017.
- [20] “Vitamin Nutrition for Poultry - DSM.” [Online]. Available: https://www.dsm.com/markets/anh/en_US/Compendium/poultry.html. [Accessed: 06-Jul-2020].
- [21] D. E. Swayne, “Protozoal Infections”, *Diseases of Poultry*, 1147–1201, 2013.
- [22] K. Hu, J. Johnson, L. Florens, M. Fraunholz, S. Suravajjala, C. DiLullo, J. Yates, D. Roos and J. Murray, “Cytoskeletal Components of an Invasion Machine — The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*”, *PLoS Pathogens*, 2, 121-138, 2006.
- [23] M. Raman, S. S. Banu, S. Gomathinayagam and G. D. Raj, “Lesion scoring technique

- for assessing the virulence and pathogenicity of Indian field isolates of avian *Eimeria* species”, *Veterinarski Arhiv*, 81, 259–271, 2011.
- [24] G. V Kant V, Singh P, Verma P, Bais I, Parmar M and Gopal A, “Anticoccidial Drugs Used in the Poultry”, *Science International*, 1, 261-265, 2013.
- [25] A. Nematollahi, G. Moghaddam, and F. Pourabad, “Prevalence of *Eimeria* Species among Broiler Chicks in Tabriz”, *Munis Entomology & Zoology Journal*, 4, 53–58, 2009.
- [26] H. D. Chapman, “Milestones in avian coccidiosis research: A Review”, *Poultry Science*, 119, 501–511, 2014.
- [27] C. F. Duffy, G. F. Mathis, and R. F. Power, “Effects of Natustat™ supplementation on performance, feed efficiency and intestinal lesion scores in broiler chickens challenged with *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella*”, *Veterinary Parasitology*, 130, 185–190, 2005.
- [28] D. P. Blake and F. M. Tomley, “Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge”, *Trends Parasitology*, 30, 12–19, 2014.
- [29] “XTRA-PERFORMANCE® Anticoccidials | Impextraco.” [Online]. Available: <https://www.impextraco.com/node/784>. [Accessed: 30-Dec-2019].
- [30] K. Mai, P. Sharman, R. Walker, M. Katrib, D. Souza, M. McConville, M. Wallach, S. Belli, D. Ferguson and N. Smith, “Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 281–289, 2009.
- [31] K. Lal, E. Bromley, R. Oakes, J. Prieto, S. Sanderson, D. Kurian, L. Hunt, J. Yates, J. Wastling, R. Sinden and F. Tomley, “Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life-cycle stages: Unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite”, *Proteomics*, 9, 4566–4576, 2009.
- [32] C. C. Norton and M. J. Chard, “The Oocyst Sporulation Time of *Eimeria* Species from the Fowl”, *Parasitology*, 86, 193–198, 1983.
- [33] “Lifecycle - Coccidiosis.” [Online]. Available: <https://www.immucox.com/Coccidiosis/Lifecycle>. [Accessed: 30-Dec-2019].
- [34] E. Gilbert, C. Cox, P. Williams, A. McElroy, R. Dalloul, W. Ray, A. Barri, D. Emmerson, E. Wong and K. Webb, “*Eimeria* species and genetic background influence the serum protein profile of broilers with coccidiosis”, *PLoS One*, 6, 1-14, 2011.

- [35] R. A. Dalloul and H. S. Lillehoj, “Recent Advances in Immunomodulation and Vaccination Strategies Against Coccidiosis”, *Avian Diseases*, 49, 1–8, 2005.
- [36] C. Elliot and M. O’Keeffe, “A Review of Coccidiostat Residues in Poultry”, *Safefood*, 353, 1–50, 2015.
- [37] M. Spiegel, P. Sterrenburg, and H. J. Egmond, “Carry-over in Compound Feed Production: Interpretation of EU legislation concerning sampling and control strategies for carry-over of coccidiostats”, *RIKILT report* (Project number: 122.71.860.01), 1-40, 2014.
- [38] J. Dorne, M. Fernández-Cruz, U. Bertelsen, D. Renshaw, K. Peltonen, A. Anadon, A. Feil, P. Sanders, P. Wester and J. Fink-Gremmels, “Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270, 196–208, 2013.
- [39] F. G. Riddell, “Structure, conformation, and mechanism in the membrane transport of alkali metal ions by ionophoric antibiotics”, *Chirality*, 14, 121–125, 2002.
- [40] H. D. Chapman, T. K. Jeffers, and R. B. Williams, “Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry”, *Poultry Science*, 89, 1788–1801, 2010.
- [41] S. Noack, H. D. Chapman, and P. M. Selzer, “Anticoccidial drugs of the livestock industry”, *Parasitology Research*, 118, 2009–2026, 2019.
- [42] A. Kart and A. Bilgili, “Ionophore antibiotics: Toxicity, mode of action and neurotoxic aspect of carboxylic ionophores”, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7, 748–751, 2008.
- [43] R. Galarini, L. Fioroni, F. Angelucci, G. R. Tovo, and E. Cristofani, “Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection”, *Journal of Chromatography A*, 1216, 8158–8164, 2009.
- [44] U. Gadde, W. H. Kim, S. T. Oh, and H. S. Lillehoj, “Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review”, *Animal Health Research Reviews*, 18, 26–45, 2017.
- [45] S. R. Hashemi and H. Davoodi, “Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition”, *Veterinary Research Communications*, 35, 169–180, 2011.
- [46] R. Wang, D. Li, and S. Bourne, “Can 2000 years of herbal medicine history help us

- solve problems in the year 2000”, *Biotechnology in the Feed Industry*, 273-292, 1998.
- [47] W. Windisch and A. Kroismayr, “The Effect of Phytobiotics on Performance and Gut Function in Monogastrics”, *Biomin World nutrition forum: The future of animal nutrition*, 85-90, 2007.
- [48] J. K. Vidanarachchi, L. L. Mikkelsen, I. Sims, P. A. Iji, and M. Choct, “Phytobiotics : alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feeds”, *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 15, 131–144, 2005.
- [49] D. Barug, “Are herbs, botanicals and other related substances adequate replacements for antimicrobial growth promoters?” *Wageningen Academic Publishers*, 329-340, 2006.
- [50] S. Burt, “Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review”, *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253, 2004.
- [51] A. Scalbert, “Antimicrobial properties of tannins”, *Phytochemistry*, 30, 3875–3883, 1991.
- [52] K. -T Chung, S. E. S. Jr, W. -F Lin, and C. I. Wei, “Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds”, *Letters in Applied Microbiology*, 17, 29–32, 1993.
- [53] S. Karou, A. Canini, C. Montesano, V. Colizzi, A. Savadogo, S. Yameogo, J. Simpure and A. Traore, “Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*”, *African Journal of Biotechnology*, 5, 195–200, 2006.
- [54] J. P. Morrissey and A. E. Osbourn, “Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 708–24, 1999.
- [55] H. J. D. Dorman and S. G. Deans, “Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils”, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316, 2000.
- [56] Ilkka M. Helander, Hanna-Leena Alakomi, Kyösti Latva-Kala, Tiina Mattila-Sandholm, Irene Pol, Eddy J. Smid, Leon G. M. Gorris, and Atte von Wright, “Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590–3595, 1998.
- [57] D. Jamroz, J. Orda, C. Kamel, A. Wiliczekiewicz, T. Wiertelicki, and J. Skorupińska, “The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass

- characteristics, and gut microbial status in broiler chickens”, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 12, 583–596, 2003.
- [58] K.-W. Lee, “Growth Performance, Intestinal Viscosity, Fat Digestibility and Plasma Cholesterol in Broiler Chickens Fed a Rye-containing Diet Without or with Essential Oil Components”, *International Journal of Poultry Science*, 3, 613-618, 2004.
- [59] G. Galli, R. Gerbet, L. Griss, B. Fortuoso, T. Petrolli, M. Boiago, C. Souza, M. Baldissera, J. Mesadri, R. Wagner, G. da Rosa, R. Mendes, A. Gris and A. Da Silva, “Combination of herbal components (curcumin, carvacrol, thymol, cinnamaldehyde) in broiler chicken feed: Impacts on response parameters, performance, fatty acid profiles, meat quality and control of coccidia and bacteria”, *Microbial Pathogenesis*, 139, 1-32, 2020.
- [60] M. Bozkurt, N. Selek, K. Küçükyılmaz, H. Eren, E. Güven, A.U. Çatli and M. Çinar, “Effects of dietary supplementation with a herbal extract on the performance of broilers infected with a mixture of *Eimeria* species”, *British Poultry Science*, 53, 325–332, 2012.
- [61] W.C. Yang, Y.J. Tien, C.Y. Chung, Y.C. Chen, W.H. Chiou, S.Y. Hsu, H.Y. Liu, C.L. Liang and C.L.T. Chang, “Effect of *Bidens pilosa* on infection and drug resistance of *Eimeria* in chickens”, *Research in Veterinary Science*, 98, 74–81, 2015.
- [62] N. Isakakroudi, A. Talebi, M. Allymehr, and M. Tavassoli, “Effects of essential oils combination on sporulation of Turkey (*Meleagris gallopavo*) *Eimeria* oocysts”, *Archives of Razi Institute*, 73, 113–120, 2018.
- [63] N. Rivero-Perez, J. Hernández-Alvarado, B. Valladares-Carranza, L. Delgadillo-Ruiz, D. Ojeda-Ramírez, C. Sosa-Gutiérrez, A. Morales-Ubaldo, V. Vega-Sanchez and A. Zaragoza-Bastida, “*Salix babylonica* L. as a Natural Anticoccidial Alternative in Growing Rabbits”, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 169-180, 2019.
- [64] M. S. Fernandez-Panchon, D. Villano, A. M. Troncoso, and M. C. Garcia-Parrilla, “Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 649–671, 2008.
- [65] I. Giannenas, E. Bonos, E. Christaki, and P. Florou-paneri, “Essential Oils and their Application in Animal Nutrition”, *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2, 1–12, 2013.

- [66] D. E. Stevenson and R. D. Hurst, “Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more?”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2900–2916, 2007.
- [67] Diandian Shen, Min-Hsiung Pan, Qing-Li Wu, Chung-Heon Park, H. Rodolfo Juliani, Chi-Tang Ho, and James E. Simon, “LC-MS method for the simultaneous quantitation of the anti-inflammatory constituents in oregano (*Origanum Species*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7119–7125, 2010.
- [68] Al-Kassie, “Influence of Two Plant Extracts Derived From Thyme and Cinnamon on Broiler Performance”, *Pakistan Veterinary Journal*, 29, 169–173, 2009.
- [69] J. Santos, E. Coelho, R. Silva, C. Passos, P. Teixeira, I. Henriques and M. A. Coimbra, “Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* byproducts essential oils”, *Industrial Crops and Products*, 137, 541–548, 2019.
- [70] P. Pati, S. Das, P. Mishra, N. Behura, A. Mishra, and K. Mandal, “Effect of Inclusion of Ginger (*Zingiber officinale*) Waste Meal in the Diet on Broiler Performance”, *Indian Journal of Animal Nutrition*, 32, 305–309, 2015.
- [71] F. Siyal, Z. Bhutto, M. Arain, S. Brohi, R. Wagan, M. Tareen, M. Saeed and R. Soomro, “Effects of Orange and Banana Peels on the Growth Performance of Briolers”, *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4, 376–380, 2016.
- [72] A. K. Parade, B. M. Thombre, R. A. Patil, P. V. Padghan, B. S. Gaikwad, and P. B. Meshram, “Use of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Leaf Meal as a Natural Feed Additive on Growth Performance and Economics of Broilers”, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8, 1842–1849, 2019.
- [73] F. U. C. Mmereole, “Effects of lemmon grass (*Cymbopogon citratus*) leaf meal feed supplement on growth performance of broiler chicks”, *Internacional Journal of Poultry Science*, 9, 1107–1111, 2010.
- [74] A. Viveros, S. Chamorro, M. Pizarro, I. Arija, C. Centeno, and A. Brenes, “Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks”, *Poultry Science*, 90, 566–578, 2011.
- [75] S. J. Hosseini-Vashan, A. Golian, and A. Yaghobfar, “Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace”, *International Journal of Biometeorology*, 60, 1183–1192, 2016.
- [76] C. J. Yang, D.-H. Oh, S. G. Cho, D. Uuganbayar, K.S. Choi, IY Yang, In-Ha Bae, Il-Keun Kong and III-Sup Nou, “Effect of green tea by-product on performance and

- body composition in broiler chicks”, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 867–872, 2003.
- [77] S. E. E. Profile, “Effect of Guava (*Psidium guajava*) leaf meal on production performances and antimicrobial sensitivity in commercial broiler”, *Journal of Natural Products*, 6, 177–187, 2013.
- [78] C. Serrano, O. Matos, B. Teixeira, C. Ramos, N. Neng, J. Nogueira, M. L. Nunes and A. Marquesc “Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1554–1560, 2011.
- [79] A. Trifan, A. C. Aprotosoiaie, M. Brebu, O. Cioancă, E. Gille, M. Hăncianu and A. miron, “Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from Romanian *Satureja montana* L.”, *Farmacia*, 6, 413–416, 2015.
- [80] S. Ćavar, M. Maksimović, M. E. Šolić, A. Jerković-Mujkić, and R. Bešta, “Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils”, *Food Chemistry*, 111, 648–653, 2008.
- [81] A. M. Barata, A. Ferreira, C. Serrano, I. M. Calha, J. A. Passarinho, M. Sapata, M. E. Ferreira, M. Valente, V. Lopes, A. C. Figueiredo and J. M. Callapez Martins, *Plantas Aromáticas*. 2018.
- [82] J. F. D. Lopes, “Cultivo e processamento de plantas aromáticas”, Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, 2014.
- [83] A. Brenes and E. Roura, “Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action”, *Animal Feed Science and Technology*, 158, 1–14, 2010.
- [84] J. Masteli and I. Jerkovi, “Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L.”, *Food Chemistry*, 80, 135–140, 2003.
- [85] A. M. Amerah and A. C. Ouwehand, “Use of essential oils in poultry production”, 1st ed. Elsevier Inc., 2016.
- [86] V. Slavkovska, R. Jancic, S. Bojovic, S. Milosavljevic, and D. Djokovic, “Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula”, *Phytochemistry*, 57, 71–76, 2001.
- [87] L. Masouri, S. Salari, M. Sari, S. Tabatabaei, and B. Masouri, “Effect of feed supplementation with *Satureja khuzistanica* essential oil on performance and physiological parameters of broilers fed on wheat- or maize-based diets”, *British*

- Poultry Science*, 58, 425–434, 2017.
- [88] A. A. Sadeghi, M. Mohamadi-Saei, and H. Ahmadvand, “The Efficacy of Dietary Savory Essential Oil on Reducing the Toxicity of Aflatoxin B1 in Broiler Chicks Ali”, *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 20, 481–486, 2014.
 - [89] M. Kamely, M. A. Karimi Torshizi, and H. Khosravinia, “Omega-3 enrichment of quail eggs: Age, fish oil, and savory essential oil”, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18, 347–359, 2016.
 - [90] S. S. Mozafari, A. Seidavi, S. Gharahveysi, and J. Simões, “Effects of the Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Powder and Extract on the Performance of Male Broiler Chicken”, *Journal of Human Environment and Health Promotion*, 5, 132–136, 2019.
 - [91] G. Ghalamkari, M. Toghyani, E. Tavalaeian, N. Landy, Z. Ghalamkari, and H. Radnezhad, “Efficiency of different levels of *Satureja hortensis* L. (Savory) in comparison with an antibiotic growth promoter on performance, carcass traits, immune responses and serum biochemical parameters in broiler chickens”, *African Journal of Biotechnology*, 10, 13318–13323, 2011.
 - [92] H. Rajaian, M. Aberumandi, J. Jalaei, and M. Khosravi, “*Satureja hortensis* as a growth promoter in broiler chickens”, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15, 149–153, 2014.
 - [93] S. Movahhedkhah, B. Rasouli, A. Seidavi, D. Mazzei, V. Laudadio, and V. Tufarelli, “Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract as natural feed additive in broilers: Effects on growth, plasma constituents, immune response, and ileal microflora”, *Animals*, 9, 5–12, 2019.
 - [94] M. Goodarzi, N. Pour, and D. Modiri, “The Effect of Savory (*Satureja khuzistanica*) Essential Oils on Performance and Some Blood Biochemical Parameters of Ross and Cobb Broilers,” *Annual Research & Review in Biology*, 4, 4336–4343, 2014.
 - [95] A. P. da S. Marques, “Espectroscopia de Infravermelho Próximo em alimentos Pet Food - Validação”, Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2017.
 - [96] N. Skubij, K. Dzida, Z. Jarosz, K. Pitura, and M. Jaroszek-sierocińska, “Nutritional Value of Savory Herb (*Satureja hortensis* L.) and Plant Response to Variable Mineral Nutrition Conditions In Various Phases of Development”, *Plants*, 9, 1-16, 2020.
 - [97] S. Idris, Y.A. Iyaka, M. M. Ndamitso and Y.B. Paiko, “Nutritional Composition of

- the Leaves and Stems of *Ocimum Gratissimum*”, *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 2, 78–85, 2012.
- [98] G. Anyasor, F. Onajobi, O. Osilesi, and O. Adebawo, “Proximate composition, mineral content and *in vitro* antioxidant activity of leaf and stem of *Costus afer* (Ginger lily)”, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3, 128–134, 2014.
- [99] “Aceites y oleínas de origen vegetal | FEDNA.” [Online]. Available: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/aceites-y-oleinas-de-origen-vegetal. [Accessed: 16-Apr-2020].
- [100] H. Jorgensen, X.-Q. Zhao, K. E. B. Knudsen, and B. O. Eggum, “The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens”, *British Journal of Nutrition*, 75, 379–395, 1996.
- [101] S. M. Cozzolino, “Biodisponibilidade de minerais”, *Brazilian Journal of Nutrition*, 10, 667–671, 1997.
- [102] “A Simple Guide to the Nutritional Requirements of Poultry | The Poultry Site.” [Online]. Available: <https://thepoultrysite.com/articles/a-simple-guide-to-the-nutritional-requirements-of-poultry>. [Accessed: 16-Apr-2020].
- [103] F. Kratzer, “Nutrient Requirements of Poultry”, *National Academies Press*, 1994.
- [104] “Decreto Lei nº105/2003”, 3299–3307, 2003.
- [105] P. Folakemi and R. Monday, “Microbiological Quality Assessment and Physico-chemical Properties of Selected Poultry Feeds from Commercial Feed Millers in Ilorin, Nigeria”, *International Journal of Applied Agricultural Sciences*, 11, 60-66, 2015.
- [106] J. Ali, and A. Hussain, “Microbiological Quality Evaluation of Commercially Available Poultry Feeds Sold in Peshawar, Khyber”, 4, 28–32, 2018.
- [107] A. R. Botelho, “Execução de ensaios microbiológicos nas áreas alimentar, ambiental e técnica em contexto empresarial”, Tese de Mestrado, Universidade do Porto, 2017.
- [108] J. Uwaezuoke and J. Ogbulie, “Microbiological quality of commercially available poultry feeds sold in parts of Eastern Nigeria”, *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 12, 1–4, 2010.
- [109] J. P. F. D’Mello, “Microbiology of animal feeds”, *Assesing Quality and Safety of Animal Feeds*, 89–105, 2004.

- [110] J. F. A. Pereira, “Boas Práticas de Fabrico de Alimentos Compostos para Animais – Plano de Higienização como pré-requisito do Plano HACCP”, Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, 2015.
- [111] S. Boonmar, A. Bangtrakulnonth, S. Pornrunangwong, N. Marnrim, K. I. Kaneko, and M. Ogawa, “*Salmonella* in Broiler Chickens in Thailand with Special Reference to Contamination of Retail Meat with *Salmonella Enteritidis*”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60, 1233–1236, 1998.
- [112] “Salmonellosis in Poultry | biomin.net.” [Online]. Available: <https://www.biomin.net/species/poultry/salmonellosis/>. [Accessed: 14-Apr-2020].
- [113] D. Peres Netto, “Ocorrência de contaminação por *Salmonella spp.* numa fábrica de ração de aves”, Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- [114] “Controlo eficaz da *Salmonella* na rações”, *aviNews Brasil*, 99, 2018.
- [115] Z. Tomičić, I. Čabarkapa, R. Čolović, O. Đuragić, and R. Tomičić, “*Salmonella* in the feed industry: Problems and potential solutions”, *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*, 2, 130–137, 2019.
- [116] A. F. A. Coutinho, “Otimização da eficiência alimentar em broilers”, Tese de Mestrado, Escola Universitária Vasco da Gama, 2016.
- [117] C. F. M. Carreira, “Relação entre a viscosidade *in vivo* e *in vitro* de alimentos à base de cevada para frangos de carne”, Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, 2011.
- [118] A. K. Zamanimoghaddam; A. R. Ghannadi; A. Gafarian; B. Shojadoost, “The effect of *Satureja hortensis* on performance of broiler chickens and NDHI titers”, 3, 54–67, 2015.
- [119] Ali Nobakht, “The effect of different levels of savory medicinal plant (*Satureja hortensis L.*) on growth performance, carcass traits, immune cells and blood biochemical parameters of broilers”, *African Journal of Agricultural Research*, 7, no. 10, pp. 1456–1461, 2012.
- [120] A. Catalan, E. Gopinger, D. Lopes, F. Gonçalves, A. Roll, E. Xavier, V. Avila and V. Roll, “Aditivos fitogénicos na nutrição animal: *Panax ginseng*”, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 107, 15–21, 2012.
- [121] M. Oussalah, S. Caillet, L. Saucier, and M. Lacroix, “Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7,

- Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*", *Food Control*, 18, 414–420, 2007.
- [122] G. Ghalamkari, M. Toghyani, N. Landy, and E. Tavalaeian, "Efficiency of different levels of *Satureja hortensis* L. (Savory) in comparison with an antibiotic growth promoter on performance, carcass traits, immune responses and serum biochemical parameters in broiler chickens", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 13318-13323, 2012.
- [123] K. Partanen, T. Jalava, J. Valaja, S. Perttilä, H. Siljander-Rasi, and H. Lindeberg, "Effect of dietary carbadox or formic acid and fibre level on ileal and faecal nutrient digestibility and microbial metabolite concentrations in ileal digesta of the pig", *Animal Feed Science and Technology*, 93, 137–155, 2001.
- [124] M. Furuse, H. Yokota, and I. Tasaki, "Influence of Energy Intake on Growth and Utilisation of Dietary Protein and Energy in Germ-Free and Conventional Chicks", *British Poultry Science*, 26, 389–397, 1985.
- [125] D. Jamroz, A. Wiliczekiewicz, T. Wiertelicki, J. Orda, and J. Skorupińska, "Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals", *British Poultry Science*, 46, 485–493, 2005.
- [126] H. Khosravinia, S. Ghasemi, and E. R. Alavi, "The effect of savory (*Satureja khuzistanica*) essential oils on performance, liver and kidney functions in broiler chickens," *Journal of Animal and Feed Sciences*, 22, 50–55, 2013.