

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Efeito da suplementação com *Nannochloropsis oceanica* e óleo de soja na
função ruminal e na composição do leite de vacas leiteiras**

Marta Isabel Santos Azevedo

Orientadora:

Professora Doutora Ana Rita Jordão Bentes Cabrita

Coorientador:

Professor Doutor António José Mira da Fonseca

Porto, 2022



Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Efeito da suplementação com *Nannochloropsis oceanica* e óleo de soja na
função ruminal e na composição do leite de vacas leiteiras**

Marta Isabel Santos Azevedo

Orientadora:

Professora Doutora Ana Rita Jordão Bentes Cabrita

Coorientador:

Professor Doutor António José Mira da Fonseca

Porto, 2022

ALGAVALOR - MicroALGAs: produção integrada e VALORização da biomassa e das suas diversas aplicações
POCI-01-0247-FEDER-035234, LISBOA-01-0247-FEDER-035234, ALG-01-0247-FEDER-035234

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

RESUMO

O crescimento da população humana aliado a uma maior preocupação com a segurança e qualidade alimentar constitui um desafio para a produção animal. No sentido de uma maior sustentabilidade e melhoria da qualidade dos produtos animais enquanto alimentos para o Homem, têm sido estudadas fontes alimentares alternativas. As microalgas apresentam uma eficiência de produção mais elevada do que fontes terrestres e um elevado valor nutricional e funcional. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação de dieta à base de silagem de milho com a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*, rica em ácido gordo eicosapentaenoico, e com óleo de soja, com perfil em ácidos gordos complementar ao da *N. oceanica*, na ingestão, produção e composição do leite e parâmetros de fermentação ruminal de vacas em lactação. O ensaio foi delineado de acordo com um quadrado latino 4x4, com quatro vacas Holstein fistuladas no rúmen em lactação, com períodos experimentais e quatro dietas: sem inclusão de *N. oceanica* e óleo de soja, com inclusão de 1% de *N. oceanica*, com inclusão de 2% de óleo de soja e com a inclusão de 1% de *N. oceanica* e 2% de óleo de soja. A ingestão voluntária não foi afetada pela dieta, com a exceção da ingestão de gordura que foi significativamente superior na dieta suplementada com *N. oceanica* e óleo de soja. A suplementação com alga não afetou a produção e composição proximal do leite, mas a suplementação com óleo de soja diminuiu o teor em gordura do leite e a produção de leite corrigida para 4% de gordura, para a energia e para a proteína e energia. A dieta não afetou significativamente o pH, a concentração de N amoniacal e o total de ácidos gordos voláteis produzidos no rúmen. As dietas suplementadas com 2% de óleo de soja tenderam a diminuir a proporção de acetato e aumentaram a percentagem de propionato no rúmen. Os resultados obtidos mostram que a inclusão de 1% de *N. oceanica* na dieta não afetou o desempenho produtivo de vacas no final da lactação, não tendo sido verificados efeitos sinérgicos da suplementação com *N. oceanica* e óleo de soja. Contudo, estes resultados são, ainda, preliminares, estando em curso a análise do perfil em ácidos gordos do leite e do microbioma e metaboloma para aferir o potencial desta estratégia de suplementação na promoção da qualidade dos produtos animais e no metabolismo animal.

PALAVRAS-CHAVE: Desempenho produtivo; Fermentação ruminal; *Nannochloropsis oceanica*; Óleo de soja.

Agradecimentos

Quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Ana Rita Cabrita, por todo o apoio prestado durante este trabalho, pela paciência, pela dedicação, pelos conhecimentos passados, pela partilha de experiências.

Ao meu Coorientador, Professor Doutor António Mira, pelos conhecimentos passados, pela simpatia e disponibilidade.

À Eng. Sílvia Azevedo, por toda a paciência e conhecimentos passados, pelos bons momentos passados no laboratório, pela simpatia e disponibilidade.

À Doutora Margarida, pela simpatia e disponibilidade.

Aos tratadores dos animais da vacaria de Vairão, o Pedro, a Rosa, o Leal e a Stephanie, por todas as conversas e momentos bem passados ao longo destes meses, por tudo o que cada um me ensinou, pelo espírito de entreajuda que existe entre nós. Obrigada.

À minha família, aos meus pais por terem proporcionado que este sonho de criança se pudesse concretizar, por todo o apoio e confiança que me deram, por todo amor que fizeram com que nunca desistisse mesmo quando o caminho se tornava mais difícil. Obrigada por tudo!

Às minhas amigas Francisca, Gabriela e Carolina por todo o apoio e ajuda neste percurso. Por todos os bons momentos partilhados juntas.

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Microalgas	2
3. Objetivos.....	3
4. Materiais.....	3
4.1. Animais, delineamento experimental e dietas.....	3
4.2. Medições e amostragem.....	4
4.3. Análises químicas.....	5
4.4. Cálculos e análise estatística.....	6
5. Resultados.....	6
5.1. Composição química.....	6
5.2. Ingestão, produção e composição do leite.....	9
5.3. Parâmetros de fermentação ruminal.....	10
6. Discussão.....	15
6.1. Composição química.....	15
6.2. Ingestão voluntária.....	15
6.3. Parâmetros de fermentação ruminal.....	16
6.4. Produção e composição do leite.....	17
7. Conclusão.....	17
8. Referências.....	18

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Composição ponderal das dietas experimentais.....	4
Quadro 2. Composição proximal (g kg^{-1} matéria seca, MS) dos ingredientes das dietas experimentais.....	7
Quadro 3. . Composição proximal (g kg^{-1} matéria seca, MS) e principais ácidos gordos (g kg^{-1} total de ácidos gordos) da microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i>	7
Quadro 4. Composição proximal (g kg^{-1} matéria seca, MS) das dietas experimentais.....	9
Quadro 5. Efeito da dieta na ingestão de matéria seca (MS) e nutrientes.....	11
Quadro 6. Efeito da dieta na produção e composição de leite.....	12
Quadro 7. Efeito da dieta nos parâmetros de fermentação ruminais.....	13

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o aumento da população humana aliado a uma maior preocupação dos consumidores com a qualidade dos produtos animais e a sustentabilidade ambiental do setor produtivo, tem promovido a utilização de recursos alimentares que simultaneamente apresentem menor pegada hídrica e de carbono e que sejam capazes de modelar as características dos produtos no sentido de um maior valor nutritivo e funcional. Neste contexto, as microalgas constituem um recurso alimentar mais sustentável do que os recursos terrestres, dado serem altamente eficientes na conversão de fontes inorgânicas ou orgânicas de carbono em biomassa de elevado valor nutritivo e funcional, não necessitarem de terra arável para a sua produção, com pegada carbônica nula e baixa pegada hídrica (Chang et al., 2020). As espécies de microalgas marinhas, como a *Nannochloropsis oceanica*, devido ao seu teor em ácidos gordos polinsaturados ômega-3, são de particular interesse devido aos seus efeitos funcionais, como melhoria da resistência a doenças (e consequente diminuição do uso de antibióticos) e capacidade de modelação dos produtos de origem animal (Sundaram, Giromini, Rebutti, & Baldi, 2020).

No sentido de manipulação da composição do leite com vista ao seu enriquecimento em ácidos gordos benéficos à saúde humana, a suplementação lipídica surge como a estratégia alimentar mais estudada. Apesar de serem expectáveis efeitos sinérgicos entre a suplementação com microalga e com óleo, por uma complementaridade de perfil lipídico, esta interação está, ainda, pouco estudada. Assim, com a realização deste projeto, espera-se esclarecer os efeitos destas estratégias nas funções ruminal e lactogénica de vacas leiteiras. Sumariamente, os principais benefícios esperados deste projeto incluem: 1) a diminuição da pressão de utilização dos recursos alimentares atualmente mais utilizados na alimentação humana e de animais monogástricos, 2) o conhecimento dos efeitos nos parâmetros fermentativos, metabolomas e microbiomas ruminal e fecal e no metaboloma da urina, 3) a melhoria do valor nutricional do leite enquanto alimento para o Homem, 4) a diminuição do impacto ambiental da produção animal, e 5) a promoção da sustentabilidade da produção animal.

No presente relatório, após uma revisão da literatura relativa aos efeitos da suplementação com microalgas nos parâmetros de fermentação ruminal e desempenho produtivo de animais ruminantes, e considerando o tempo disponível para a realização do estágio, apenas se apresentam e discutem os resultados da suplementação da dieta com a microalga *N. oceanica* e óleo de soja nos parâmetros de fermentação ruminal, ingestão, produção e composição de leite de vacas leiteiras.

2. MICROALGAS

As microalgas são microrganismos fotossintéticos unicelulares ricos em macro e micronutrientes e em compostos bioativos como proteínas e péptidos, lípidos e ácidos gordos polinsaturados, pigmentos, minerais e polissacáridos, de elevado valor nutricional e funcional (Valente et al., 2021) com efeitos imunomoduladores, antioxidantes, antimicrobianos e anti-inflamatórios (Conde et al., 2021; Pina-Pérez, Rivas, Martínez, & Rodrigo, 2017; Riccio & Lauritano, 2020; Zisis et al., 2022). Para serem utilizadas em alimentação animal é essencial assegurar a sua disponibilidade no mercado a custos razoáveis. Nos últimos anos, a produção em larga escala de microalgas tem-se desenvolvido, sendo que, atualmente, 19% da produção europeia é utilizada na alimentação animal (Araújo et al., 2021).

Dada a relação simbiótica estabelecida com a população microbiana do retículo-rúmen, os animais ruminantes apresentam a vantagem, relativamente aos animais monogástricos, de serem capazes de utilizar a fração de azoto não proteico e de digerirem de modo mais eficiente a parede celular das microalgas (Lum, Kim, & Lei, 2013). Nestes animais, a maioria dos estudos realizados utilizaram produtos comerciais ricos em ácido docosa-hexaenóico (DHA) derivado da alga marinha *Aurantiochytrium sp.*, e microalgas dos géneros *Arthrospira*, *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Isochrysis*, *Dunaliella* e *Nannochloropsis* como substitutas de fontes proteicas tradicionais como o bagaço de soja, como fontes de energia para substituir o alimento concentrado ou para suplementar a dieta com lípidos.

As microalgas do género *Nannochloropsis*, maioritariamente marinhas, pertencem ao filo Heterokontophyta e à classe *Eustigmatophyceae*, sendo uma das espécies mais produzidas na Europa, em termos de número de empresas (Araújo et al., 2021). Estas microalgas caracterizam-se pela presença de carotenoides, como zeaxantina e betacarotenos (Macías-Sánchez et al., 2005) e pela ausência de clorofila b (Reboloso-Fuentes, Navarro-Pérez, García-Camacho, Ramos-Miras, & Guil-Guerrero, 2001). O elevado teor em lípidos tem suscitado interesse nestas microalgas para a produção de biodiesel (Rajabi Islami & Assareh, 2019) e como fontes de ácido eicosapentaenóico (EPA), essencial para humanos e animais.

Com efeito, as recomendações de saúde pública promovem a diminuição da ingestão de ácidos gordos saturados e *trans* e o aumento do consumo de ácidos gordos polinsaturados para redução da incidência de doenças cardiovasculares (Piepoli et al., 2016). Neste sentido, tem sido recomendado o consumo de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa n-3, como o EPA e DHA, dados os seus efeitos benéficos para a saúde humana (Robinson & Stone, 2006). Contudo, a carne e leite de animais ruminantes apresentam um baixo teor em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa n-3, sendo necessário desenvolver estratégias para aumentar este teor (Scollan, Price, Morgan, Huws, & Shingfield, 2017). O fornecimento,

na dieta, de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa n-3, como óleo de peixe ou microalgas, apresenta-se como a estratégia mais eficaz, em particular em animais monogástricos. Contudo, em animais ruminantes, a maioria dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa n-3 sofre biohidrogenação no rúmen, produzindo ácidos gordos saturados e outros intermediários (Bessa, Alves, & Santos-Silva, 2015). A proteção destes ácidos gordos polinsaturados da biohidrogenação ruminal é, assim, importante para garantir o aumento do seu teor nos produtos animais. Neste contexto, um estudo *in vitro* sugeriu a microalga *Nannochloropsis oceanica* como sendo uma fonte natural de EPA protegida da biohidrogenação do rúmen (Bessa et al., 2015).

3. OBJETIVOS

O presente relatório teve por objetivo geral avaliar os efeitos da suplementação com *N. oceanica* e óleo de soja, na ingestão voluntária, produção e composição do leite e parâmetros de fermentação ruminal de vacas leiteiras. Este trabalho insere-se num projeto mais alargado que visa, também, avaliar os efeitos destas estratégias de suplementação nos metabolomas e microbiomas ruminal e fecal, metaboloma da urina, e perfil em ácidos gordos do leite.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais, delineamento experimental e dietas

Foram utilizadas quatro vacas Holstein Frísia, múltiparas, em final da lactação (com $373 \pm 4,3$ dias em lactação) fistuladas no rúmen com uma cânula (10 cm diâmetro; Bar Diamond Inc., Parma, Idaho, EUA; licença DGAV 0421/000/000/2021), alojadas individualmente no Centro Clínico e de Investigação Veterinária de Vairão, do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, da Universidade do Porto. Os animais foram tratados de acordo com as boas práticas de bem-estar animal definidas pelas autoridades nacionais e pela diretiva 2010/63/EU da União Europeia, sob orientação de elementos creditados com curso de categoria C da FELASA.

O ensaio foi realizado de acordo com um delineamento em quadrado latino 4 x 4, com quatro períodos experimentais de 28 dias cada, compreendendo os primeiros 21 dias o período de adaptação dos animais à dieta e os últimos sete dias o período de recolha. Os animais foram distribuídos aleatoriamente por quatro dietas experimentais formuladas de modo a satisfazer as suas necessidades nutricionais (National Academies of Sciences & Medicine, 2021): 1) alimento completo (Dieta controlo); 2) dieta controlo com inclusão de 1% de microalga *Nannochloropsis oceanica* (seca por spray e armazenada à temperatura ambiente e protegida da luz; Allmicroalgae, Pataias, Portugal) (Dieta Alga); 3) dieta controlo

com inclusão de 2% de óleo de soja (Dieta Óleo); e 4) dieta controlo com inclusão de 1% de *N. oceanica* e 2% de óleo de soja (Dieta Alga+Óleo). No Quadro 1 apresenta-se a composição ponderal das dietas experimentais. As dietas foram oferecidas em duas refeições equitativas às 8:30 e 17:00 h (com exceção do feno-silagem que foi oferecido às 12 h), tendo os animais sempre acesso a água durante todo o ensaio. As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia, às 8:00 h e às 17:00 h. No final do primeiro período, as vacas trocaram de dieta de modo que no final do ensaio, todos os animais ingeriram todas as dietas.

Quadro 1. Composição ponderal das dietas experimentais.

	Dieta			
	Controlo	Alga	Óleo	Alga+Óleo
Ingrediente, kg/vaca/dia				
Silagem milho	30	30	30	30
Palha de trigo	2	2	2	2
Feno-silagem	2	2	2	2
Concentrado	5	5	5	5
Bagaço de soja	1	1	1	1
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	-	0,191	-	0,191
Óleo de soja	-	-	0,372	0,372

4.2. Medições e amostragem

Na última semana de cada período experimental foram recolhidas, diariamente, amostras de alimentos para determinação do teor em matéria seca (MS) em estufa com ventilação forçada de ar, a 65°C, durante 48 h. As amostras foram compósitas por período experimental para posterior análise da composição química. Igualmente, na última semana de cada período experimental, antes da refeição da manhã, procedeu-se à recolha e pesagem dos refugos, quando existentes, para posterior cálculo da ingestão. A produção de leite foi registada diariamente em ambas as ordenhas.

No último dia da última semana de cada período experimental foi colhida uma amostra de leite de cada ordenha e de cada vaca. As amostras foram compósitas por vaca (de acordo com a produção em cada ordenha) e por período para posterior análise.

No mesmo dia, antes da refeição da manhã, procedeu-se à recolha de conteúdo ruminal, dos quatro quadrantes do rúmen de cada vaca para posterior determinação dos parâmetros de fermentação. O conteúdo ruminal foi colocado num termos pré-aquecido a 39

°C e transportado para o laboratório no intervalo máximo de 60 min, de modo a garantir a viabilidade da micropopulação ruminal.

4.3. Análises químicas

As amostras de microalga e dos restantes ingredientes (moídos a 1-mm) das dietas fornecidas aos animais durante todo o ensaio foram analisadas em duplicado de acordo com métodos oficiais (AOAC, 2000). Foram determinados os teores em cinza (ID 942.05), em gordura bruta (GB; ID 920.39) e N kjeldahl (ID 954.01). O teor em proteína bruta (PB) foi calculado como N Kjeldahl x 6,25. O teor em fibra de detergente neutro (NDF; com α -amilase e expressa isenta de cinza) foi determinado de acordo com Van Soest, Robertson, and Lewis (1991). No caso da microalga, dado o seu reduzido tamanho de partícula (<25 μ m), procedeu-se à alteração do método de filtração na determinação do teor em NDF, utilizando um filtro de membrana de vidro (Whatman GF/A, 1,6 μ m porosidade, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) em substituição de um cadinho P2 com placa filtrante (40–100 μ m porosidade). O teor em amido foi determinado nas amostras moídas a 0,5-mm de acordo com Salomonsson, Theander, and Westerlund (1984).

Os ácidos gordos da microalga *N. oceanica* foram transesterificados com HCl metanólico (Sukhija & Palmquist, 1988) e os ésteres de metilo de ácidos gordos foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando um Shimadzu GC-2010 Plus (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com uma coluna capilar (Omegawax 250, 30m×0,25mm×0,25 μ m; Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e um detetor de ionização de chama, como descrito pela M. R. G. Maia, Fonseca, Cortez, and Cabrita (2019). Os ácidos gordos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de padrões (Supelco 37 Component FAME Mix, PUFA No.1, PUFA No.3, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA) e quantificados com o padrão interno (ácido nonadecanoico, Matreya LLC, Pleasant Gap, PA, EUA).

Imediatamente após chegada ao laboratório, o conteúdo ruminal de cada vaca e em cada período, foi filtrado por quatro camadas de gaze e o pH medido por potenciometria (GPL22+ Crison). Os ácidos gordos voláteis foram analisados em cromatógrafo gasoso com detetor de ionização de chama (Shimadzu GC-2010 Plus, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com uma coluna capilar (HP-FFAP, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) como descrito por M. R. G. Maia et al. (2019). Os AGV foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de um padrão (Volatile Free Acid Mix, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA), e quantificados com padrão interno (ácido 3-metil valérico, Sigma-Aldrich Inc.). O teor em N-amoniaco do inóculo de rúmen foi determinado de acordo com Smith and Murphy (1993).

As amostras de leite compósitas por vaca e por período foram analisadas para os teores em gordura, proteína, lactose, ureia e extrato seco desengordurado (AOAC, 2000) no Laboratório da Alip - Associação Interprofissional do Leite e Laticínios.

4.4. Cálculos e Análise estatística

A eficiência bruta da produção de leite foi calculada como:

$$Eficiência = \frac{kg \text{ de leite}}{kg \text{ de ingestão de matéria seca}}$$

A produção de leite corrigida para 4% de gordura (4% FCM) foi calculada de acordo com Gaines (1927):

$$4\% \text{ FCM (kg)} = [(0,4 * kg \text{ de leite}) + (0,15 * kg \text{ leite} * \% \text{ de gordura})]$$

A produção de leite corrigida para a gordura e a proteína (FPCM) foi calculada de acordo com CVB (2012):

$$FPCM (kg) = kg \text{ de leite} * (0,337 + 0,116 * \% \text{ gordura} + 0,06 * \% \text{ proteína})$$

A produção de leite corrigida para o teor em energia (ECM) foi calculada de acordo com Kirchgeßner (1997):

$$ECM (kg) = kg \text{ de leite} * \frac{(0,39 * \% \text{ gordura} + 0,24 * \% \text{ proteína} + 0,17 * \% \text{ lactose})}{3,17}$$

Os dados da última semana de cada período experimental foram sujeitos a análise estatística utilizando um modelo linear incluindo os efeitos fixos período, vaca e dieta e o erro residual, recorrendo ao programa SAS (2002; version 9.1, SAS Institute Inc., Carry, NC, EUA). Quando o efeito da dieta foi significativo ($P < 0,05$), o teste de Tukey foi utilizado para a comparação múltipla de médias. Para avaliar o efeito da inclusão de óleo e de alga relativamente ao controlo, foram utilizados contrastes ortogonais.

5. RESULTADOS

5.1. Composição química

No Quadro 2 apresenta-se a composição proximal dos ingredientes das dietas experimentais. A silagem de milho utilizada como forragem de base das dietas experimentais apresentou 322 g kg⁻¹ de MS e um teor em amido de 390 g kg⁻¹ MS. A palha de trigo e o feno-silagem apresentaram os teores superiores em NDF, respetivamente de 789 e 595 g kg⁻¹ MS. O alimento concentrado apresentou teores em PB e amido de respetivamente 261 e 188 g kg⁻¹ MS. O bagaço de soja apresentou um teor em PB de 479 g kg⁻¹ MS.

Quadro 2. Composição proximal (g kg⁻¹ matéria seca, MS) dos ingredientes das dietas experimentais.

	Silagem de milho	Palha de trigo	Feno-silagem	Concentrado	Bagaço de soja
Matéria seca (g kg ⁻¹)	322	927	602	904	886
Cinza	31,5	58,8	94,1	91,1	71,2
Gordura bruta	30,9	9,1	22,2	32,1	17,6
Proteína bruta	66,8	24,6	104	261	479
Fibra de detergente neutro	410	789	595	290	158
Amido	390	ND ¹	ND	188	ND

¹ND, não determinado.

No Quadro 3 apresenta-se a composição proximal e os principais ácidos gordos da microalga *N. oceanica* que apresentou elevado teor em cinza (282 g kg⁻¹ MS) e teores em GB, PB e NDF de, respetivamente, 146, 297 e 293 g kg⁻¹ MS. Relativamente ao perfil em ácidos gordos, destacam-se os elevados teores em ácido palmitoleico (C16:1 n-9; 102 g kg⁻¹ MS) e em EPA (C20:5 n-3; 17,8 g kg⁻¹ MS).

Quadro 3. Composição proximal (g kg⁻¹ matéria seca, MS) e principais ácidos gordos (g kg⁻¹ total de ácidos gordos) da microalga *Nannochloropsis oceanica*.

<i>Nannochloropsis oceanica</i>	
Matéria seca (g kg ⁻¹)	979
Cinza	282
Gordura bruta	146
Proteína bruta	297
Fibra de detergente neutro	293
Amido	10,0
Ácidos gordos	
Saturados	26,4
C8:0	0,074
C10:0	0,123
C12:0	0,340
C14:0	4,79
C16:0	18,8
C18:0	0,343

C20:0	0,031
C22:0	0,078
C24:0	0,050
Cadeia ramificada	1,25
iso-C14:0	0,030
iso-C15:0	0,388
anteiso-C15:0	0,059
iso-C16:0	0,045
iso-C17:0	0,716
anteiso-C17:0	0,016
Cadeia ímpar	0,490
C11:0	0,012
C13:0	0,016
C15:0	0,281
C17:0	0,181
Monoinsaturados	27,2
C14:1 n-5	0,057
C16:1 n-7	21,5
C16:1 n-9	102
C17:1 n-8	0,115
C18:1 n-7	0,518
C18:1 n-9	3,82
C20:1 n-7	0,005
C20:1 n-9	0,043
C20:1 n-11	0,018
C22:1 n-9	0,024
C22:1 n-11	0,026
Polinsaturados	26,9
C16:2 n-4	0,149
C16:3 n-4	0,174
C16:4 n-1	0,060
C18:2 n-6	2,77
C18:3 n-6t,t	0,038
C18:3 n-3	0,227
C18:3 n-4	0,055
C18:3 n-6	0,263

C18:4 n-3	0,077
C20:2 n-6	0,058
C20:3 n-3	0,091
C20:3 n-6	0,256
C20:4 n-3	0,045
C20:4 n-6	4,60
C20:5 n-3	17,8
C21:5 n-3	0,193
C22:2 n-6	0,017
Total de ácidos gordos	80,4
Rácio n-6/n-3	0,434

A composição química das dietas (Quadro 4) reflete a composição química dos ingredientes individuais, sendo de destacar o maior teor em gordura das dietas com inclusão de óleo de soja.

Quadro 4. Composição proximal (g kg⁻¹ matéria seca, MS) das dietas experimentais.

	Dieta			
	Controlo	Alga	Óleo	Alga+Óleo
Matéria seca (g kg ⁻¹)	453	455	457	460
Cinza	55,3	58,1	54,3	57,0
Gordura bruta	27,7	28,6	46,0	46,6
Proteína bruta	134	135	131	133
Fibra de detergente neutro	419	416	411	409
Amido	255	252	250	248

5.2. Ingestão, produção e composição do leite

A suplementação da dieta com 1% de *N. oceanica* e 2% de óleo de soja não afetou significativamente a ingestão de MS e de nutrientes, com exceção da ingestão de GB que foi significativamente ($P < 0,001$) superior na dieta suplementada com *N. oceanica* e óleo de soja, seguida da dieta suplementada com óleo de soja (Quadro 5).

No Quadro 6 apresenta-se o efeito da dieta na produção e composição do leite. A suplementação com óleo diminuiu significativamente a produção de leite corrigida para 4% de gordura ($P = 0,017$), para a energia ($P = 0,025$) e para a proteína e energia ($P = 0,026$), tendo apresentado uma tendência ($P = 0,063$) para diminuição da eficiência de produção de leite corrigida para 4% de gordura. De igual forma, estas dietas diminuiram significativamente

o teor ($P = 0,001$) e produção ($P = 0,007$) de gordura e o teor em ureia do leite ($P = 0,005$). Os restantes parâmetros avaliados não foram significativamente afetados pela dieta.

5.3. Parâmetros de fermentação ruminal

No Quadro 7 apresenta-se o efeito da dieta nos parâmetros de fermentação ruminal. A dieta não afetou significativamente ($P > 0,05$) o pH, a concentração de N amoniacal e o total de ácidos gordos voláteis. As percentagens de acetato ($P = 0,097$) e de iso-valérico ($P = 0,075$) tenderam a ser respetivamente inferiores e superiores nas dietas suplementadas com 2% de óleo de soja. Com estas dietas verificou-se, ainda, uma percentagem significativamente superior de propionato ($P = 0,001$) e uma menor relação acetato:propionato ($P = 0,007$).

Quadro 5. Efeito da dieta na ingestão de matéria seca (MS) e nutrientes¹.

	Dieta				EPM ²	P	Contrastes ³		
	Controlo	Alga	Óleo	Alga+Óleo			C vs Outras	C vs Alga	C vs Óleo
Ingestão, (kg vaca ⁻¹ dia ⁻¹)									
MS	18,1	18,3	17,0	18,5	0,488	0,248	0,785	0,641	0,601
MO	17,08	17,20	15,72	17,07	0,458	0,174	0,460	0,928	0,268
PB	2,41	2,47	2,26	2,45	0,059	0,144	0,805	0,517	0,482
GB	0,496 ^a	0,515 ^a	0,815 ^b	0,879 ^c	0,0142	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
NDF	7,56	7,59	6,93	7,52	0,206	0,174	0,398	0,974	0,230
Amido	4,64	4,65	4,22	4,61	0,146	0,220	0,421	0,955	0,260

¹MO, matéria orgânica; PB, proteína bruta; GB, gordura bruta; NDF, fibra de detergente neutro. ²EPM, erro padrão da média. ³C vs Outras, dieta controlo vs todas as outras dietas; C vs Alga, dieta controlo vs dietas com suplementação com 1% de *Nannochloropsis oceanica*; C vs Óleo, dieta controlo vs dietas com suplementação com 2% de óleo de soja. ^{a,b,c}Na mesma linha, valores com notações diferentes, são significativamente diferentes (P < 0,05).

Quadro 6. Efeito da dieta na produção e composição de leite¹.

	Dieta				EPM ²	P	Contrastes ³		
	Controlo	Alga	Óleo	Alga+Óleo			C vs Outras	C vs Alga	C vs Óleo
kg vaca ⁻¹ dia ⁻¹									
Leite	22,59	23,45	21,82	21,08	0,868	0,338	0,653	0,768	0,325
4%FCM	24,42 ^a	26,05 ^a	20,05 ^b	19,87 ^b	1,113	0,017	0,108	0,325	0,017
ECM	24,60 ^a	26,15 ^a	20,84 ^b	20,59 ^b	1,077	0,025	0,147	0,388	0,026
FPCM	24,37 ^a	25,89 ^a	20,75 ^b	20,45 ^b	1,054	0,026	0,150	0,388	0,027
Leite/IMS	1,248	1,284	1,072	1,141	0,085	0,355	0,433	0,744	0,223
4%FCM/IMS	1,35	1,43	1,18	1,07	0,078	0,063	0,228	0,343	0,060
FPCM/IMS	1,35	1,42	1,23	1,11	0,078	0,111	0,330	0,412	0,110
ECM/IMS	1,36	1,43	1,23	1,11	0,079	0,108	0,322	0,411	0,105
Gordura, %	4,573 ^a	4,758 ^a	3,508 ^b	3,693 ^b	0,125	0,001	0,001	0,064	0,001
Gordura, kg d ⁻¹	1,026 ^a	1,112 ^a	0,755 ^b	0,763 ^b	0,054	0,007	0,055	0,231	0,007
Proteína, %	3,615	3,660	3,560	3,570	0,064	0,687	0,812	1,000	0,547
Proteína, kg d ⁻¹	0,810	0,850	0,773	0,749	0,032	0,236	0,619	0,800	0,260
Lactose, %	4,815	4,790	4,865	4,890	0,033	0,235	0,420	0,563	0,177
Lactose, kg d ⁻¹	1,089	1,125	1,064	1,032	0,045	0,553	0,770	0,849	0,478
ESD, %	9,24	9,27	9,26	9,28	0,071	0,977	0,711	0,720	0,690
Ureia, ml/kg	209,00 ^a	202,00 ^a	145,00 ^b	138,50 ^b	10,444	0,005	0,008	0,023	0,002

¹FCM, produção de leite corrigida para 4% de gordura; ECM, produção de leite corrigida para o teor em energia; FPCM, produção de leite corrigida para a gordura e a proteína; IMS, ingestão de matéria seca. ²EPM, erro padrão da média. ³C vs Outras, dieta controlo vs todas as outras dietas; C vs Alga, dieta controlo vs dietas com suplementação com 1% de *Nannochloropsis oceanica*; C vs Óleo, dieta controlo vs dietas com suplementação com 2% de óleo de soja. ^{a,b,c}Na mesma linha, valores com notações diferentes, são significativamente diferentes (P < 0,05).

Quadro 7. Efeito da dieta nos parâmetros de fermentação ruminais.

	Dieta				EPM ¹	P	Contrastes ²		
	Controlo	Alga	Óleo	Alga+Óleo			C vs Outras	C vs Alga	C vs Óleo
pH	6,49	6,49	6,45	6,48	0,0755	0,974	0,819	0,928	0,776
N-NH ₃ , mg dL ⁻¹	8,95	8,73	8,48	10,2	0,792	0,477	0,840	0,610	0,696
Ácidos gordos voláteis, mmol L ⁻¹									
Total	97,3	94,9	94,5	95,2	3,92	0,956	0,609	0,652	0,629
C2:0	64,6	63,1	61,3	61,9	2,51	0,795	0,416	0,519	0,416
C3:0	16,4	15,9	16,8	16,9	0,562	0,639	0,840	0,997	0,547
iso-C4:0	1,07	1,01	1,07	1,09	0,0491	0,731	0,763	0,706	0,954
C4:0	11,99	11,76	12,11	11,92	0,849	0,992	0,953	0,890	0,982
iso-C5:0	1,69	1,61	1,80	1,80	0,05975	0,166	0,500	0,807	0,175
C5:0	1,06	1,02	1,09	1,11	0,05098	0,645	0,870	0,962	0,580
iso-C6:0	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0002	0,811	0,835	0,864	0,640
C6:0	0,442	0,441	0,403	0,395	0,021	0,336	0,284	0,399	0,149
Ácidos gordos voláteis, g 100 g ⁻¹ total									
C2:0	66,4	66,5	64,9	65,2	0,438	0,097	0,136	0,332	0,047
C3:0	16,9 ^a	16,9 ^a	17,9 ^b	17,9 ^b	0,111	0,001	0,003	0,020	<0.001
iso-C4:0	1,12	1,09	1,14	1,15	0,026	0,390	0,915	0,945	0,501
C4:0	12,20	12,2	12,5	12,3	0,420	0,946	0,769	0,907	0,709

iso-C5:0	1,74	1,72	1,90	1,90	0,050	0,075	0,028	0,011	0,066
C5:0	1,09	1,07	1,14	1,16	0,036	0,337	0,435	0,559	0,215
iso-C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,839	0,737	0,794	0,906
C6:0	0,45	0,46	0,42	0,41	0,016	0,152	0,245	0,417	0,889
C2:0/C3:0	3,96 ^a	3,96 ^a	3,65 ^b	3,66 ^b	0,0528	0,007	0,0148	0,0573	0,0031

¹EPM, erro padrão da média. ²C vs Outras, dieta controlo vs todas as outras dietas; C vs Alga, dieta controlo vs dietas com suplementação com 1% de *Nannochloropsis oceanica*; C vs Óleo, dieta controlo vs dietas com suplementação com 2% de óleo de soja. ^{a,b}Na mesma linha, valores com notações diferentes, são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente relatório enquadra-se num projeto em curso com o objetivo de avaliação do efeito da suplementação da dieta de vacas leiteiras com óleo de soja e *Nannochloropsis oceanica* no perfil nutricional do leite enquanto alimento para o Homem. Dado o tempo disponível para a realização deste trabalho, apresentam-se, aqui, os resultados referentes aos efeitos na função ruminal e ingestão, produção e composição proximal do leite. A realização deste projeto contribuirá para a avaliação do potencial desta estratégia de suplementação para a promoção da qualidade dos produtos animais e para a sustentabilidade da produção animal. Note-se a este respeito que a microalga utilizada é produzida em larga escala por uma empresa nacional, logo apresenta um menor impacto ambiental.

6.1. Composição química

A composição química das dietas experimentais reflete a composição química dos seus ingredientes. A composição química das microalgas varia com a espécie, sistemas de produção, condições de cultivo e processamento (Tibbetts et al., 2015). A *N. oceanica* estudada neste trabalho apresentou um elevado teor em cinza (28%, na MS), moderado teor em PB (29,7%, na MS) e elevado teor em GB (14.6%, na MS). O teor em cinza das microalgas depende da concentração de minerais no meio, apresentando as espécies marinhas um maior teor do que as espécies de água doce (Fox & Zimba, 2018). A composição proximal da microalga estudada, bem como o seu elevado teor em EPA, encontra-se dentro dos valores reportados na literatura para esta espécie (Cabrita et al., 2022; Meehan, Cabrita, Silva, Fonseca, & Maia, 2021). Embora o perfil em ácidos gordos do óleo de soja utilizado neste estudo não tenha sido determinado, é bem conhecido que representa uma fonte rica em ácido linoleico (ca. 51-56% do total de ácidos gordos) (Harris, 2012). A *N. oceanica* e o óleo de soja representam, assim, fontes complementares de ácidos gordos, não tendo sido ainda estudada, que tenhamos conhecimento, a eventual sinergia entre as duas fontes enquanto modeladoras do perfil nutricional do leite.

6.2. Ingestão voluntária

As vacas utilizadas no presente trabalho encontravam-se no final da lactação, tendo a quantidade de alimento oferecido sido definida de modo a não permitir um excessivo aumento da condição corporal dos animais. Dado todos os animais terem aceitado bem as dietas experimentais, não existindo episódios de recusa alimentar, a ingestão de MS e de nutrientes não foi afetada pela dieta, com a única exceção da ingestão de GB que foi

significativamente superior na dieta suplementada com óleo de soja e *N. oceanica*, seguida da dieta suplementada com óleo de soja, traduzindo o seu maior teor em GB.

Na literatura, os efeitos da suplementação com microalgas na ingestão voluntária são contraditórios, com relatos de aumento (Costa, Quigley, Isherwood, McLennan, & Poppi, 2016; Kholif et al., 2017) e de diminuição (Lamminen, Halmemies-Beauchet-Filleau, Kokkonen, Jaakkola, & Vanhatalo, 2019; Vanbergue et al., 2018), independentemente do nível de suplementação de alga. Os efeitos negativos da suplementação com microalgas têm sido atribuídos à sua baixa palatabilidade, possivelmente devido ao cheiro e sabor a peixe, à sua moenda fina e possível rancificação no caso de microalgas ricas em gordura (Lamminen et al., 2019). Embora o fornecimento de microalgas incluídas no alimento completo nem sempre contrarie a menor ingestão (Lamminen et al., 2019), no presente trabalho a microalga, fornecida na forma de alimento completo, foi bem aceita pelos animais.

A adição de lípidos à dieta de animais ruminantes tem sido utilizada para aumentar a densidade energética da dieta e melhorar a qualidade dos produtos animais com efeitos benéficos à saúde humana. Contudo, elevados níveis de suplementação lipídica podem provocar efeitos negativos na fermentação ruminal, afetando a digestão da fibra e a ingestão de MS (Manso, Castro, Mantecón, & Jimeno, 2006). Neste trabalho, o nível de óleo de soja utilizado na dieta foi apenas de 2%, não tendo afetado a ingestão voluntária, indo ao encontro do observado por Dhiman et al. (2000) também com um nível de suplementação de óleo de soja de 2%.

6.3. Parâmetros de fermentação ruminal

Os efeitos da suplementação com microalgas nos parâmetros de fermentação ruminal são inconsistentes, com aumento, diminuição ou ausência de efeitos (Valente et al., 2021). No presente trabalho, a suplementação com *N. oceanica* não teve efeito em nenhum dos parâmetros analisados, o que pode ser explicado pelo reduzido nível utilizado (1%). As dietas suplementadas com óleo de soja não afetaram a produção total de AGV, mas tenderam a diminuir a proporção de acetato e aumentaram significativamente a proporção de propionato e reduziram a relação acetato:propionato.

Em animais ruminantes, tem sido mostrado que níveis elevados de suplementação com óleos vegetais diminuem a população ruminal de bactérias e protozoários (Dohme, Machmüller, Wasserfallen, & Kreuzer, 2001), sendo os efeitos negativos na ingestão voluntária e na fermentação ruminal geralmente reportados quando óleos ricos em ácidos gordos insaturados são fornecidos. M. R. Maia, Chaudhary, Figueres, and Wallace (2007) avaliaram o efeito de diferentes ácidos gordos no crescimento de culturas puras de bactérias ruminais e verificaram que o ácido linolénico apresenta maior toxicidade do que o ácido linoleico, enquanto os ácidos EPA e DHA são mais tóxicos do que o ácido linolénico. Contudo,

tem sido sugerido que estes efeitos negativos podem ser minimizados quando a dieta apresenta uma elevada proporção de forragens dado estas promoverem uma normal função ruminal para a máxima biohidrogenação e, assim, diminuem a toxicidade dos ácidos gordos polinsaturados (Ueda et al., 2003). No presente trabalho, apesar das dietas utilizadas apresentarem uma relação forragem:concentrado de cerca de 70:30, as dietas com óleo diminuíram a relação acetato:propionato no rúmen.

6.4. Produção e composição do leite

A suplementação com *N. oceanica* não afetou a produção e composição do leite. Na literatura, os efeitos da suplementação com microalgas na função lactogénica são inconsistentes (Valente et al., 2021). Contudo, vários estudos reportam uma diminuição do teor em gordura do leite com a suplementação com microalgas ricas em ácidos gordos polinsaturados através da inibição da síntese *de novo* de ácidos gordos de cadeia curta e a captura de ácidos gordos pela glândula mamária (Hussein, Harvatine, Weerasinghe, Sinclair, & Bauman, 2013). Adicionalmente, os ácidos gordos EPA e DHA são tóxicos para os microrganismos celulolíticos do rúmen, reduzindo a produção de acetato no rúmen e, consequentemente, a síntese *de novo* de ácidos gordos na glândula mamária (Urrutia, Bomberger, Matamoros, & Harvatine, 2019). A ausência de efeito da suplementação com *N. oceanica* no teor em gordura do leite observada neste estudo pode dever-se ao nível de suplementação utilizado e à relação forragem:concentrado.

A suplementação com óleo de soja diminuiu significativamente o teor em gordura do leite, refletindo-se na diminuição da produção de leite corrigida para o teor em gordura e em energia. Estudos anteriores observaram, também, uma redução do teor em gordura do leite pela suplementação com óleo de soja (Dhiman et al., 2000; Zheng et al., 2005). Esta diminuição pode ser explicada pela redução da produção de acetato no rúmen, tendência observada neste trabalho.

7. CONCLUSÃO

A suplementação com 1% de *N. oceanica* não afetou a ingestão voluntária e a produção e composição proximal do leite. A suplementação com óleo de soja aumentou a ingestão de gordura, diminuiu o teor em gordura do leite e a produção de leite corrigida para 4% de gordura, para a energia e para a proteína e energia. O pH, a concentração de N amoniacal e o total de ácidos gordos voláteis produzidos no rúmen não foram afetados pelas dietas. As dietas suplementadas com 2% de óleo de soja tenderam a diminuir a proporção de acetato e aumentaram a percentagem de propionato no rúmen. Os resultados obtidos mostram que a inclusão de 1% de *N. oceanica* na dieta não afetou o desempenho produtivo, não tendo sido verificados efeitos sinérgicos da suplementação com *N. oceanica* e óleo de

soja. Para aferir o potencial desta microalga produzida localmente na promoção da qualidade dos produtos animais e na sustentabilidade da produção é necessária a análise do perfil em ácidos gordos do leite. Adicionalmente, a análise do microbioma e do metaboloma será útil para elucidar os efeitos observados.

REFERÊNCIAS

- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International*. Gaithersburg, Md.: AOAC International.
- Araújo, R., Calderón, F., López, J., Azevedo, I., Bruhn, A., Fluch, S., . . . Ullmann, J. (2021). Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7, 626389.
- Bessa, R. J. B., Alves, S. P., & Santos-Silva, J. (2015). Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(9), 1325-1344. doi:<https://doi.org/10.1002/ejlt.201400468>
- Cabrita, A. R. J., Guilherme-Fernandes, J., Valente, I. M., Almeida, A., Lima, S. A. C., Fonseca, A. J. M., & Maia, M. R. G. (2022). Nutritional Composition and Untargeted Metabolomics Reveal the Potential of *Tetrademus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oceanica* as Valuable Nutrient Sources for Dogs. *Animals*, 12(19), 2643.
- Chang, H., Zou, Y., Hu, R., Feng, H., Wu, H., Zhong, N., & Hu, J. (2020). Membrane applications for microbial energy conversion: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 1581 - 1592.
- Conde, T. A., Zabetakis, I., Tsoupras, A., Medina, I., Costa, M., Silva, J., . . . Domingues, M. R. (2021). Microalgal Lipid Extracts Have Potential to Modulate the Inflammatory Response: A Critical Review. *Int J Mol Sci*, 22(18). doi:10.3390/ijms22189825
- Costa, D. F., Quigley, S. P., Isherwood, P., McLennan, S. R., & Poppi, D. P. (2016). Supplementation of cattle fed tropical grasses with microalgae increases microbial protein production and average daily gain. *J Anim Sci*, 94(5), 2047-2058. doi:10.2527/jas.2016-0292
- CVB. (2012). *Tabellenboek Veevoeding 2012, Voedernormen landbouwhuisdieren en voederwaarde veevoeders.* (CVB Productschap Diervoeder: The Hague, The Netherlands).
- Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., & Tolosa, M. X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic

- and linolenic acid. *J Dairy Sci*, 83(5), 1016-1027. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74966-6
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., & Kreuzer, M. (2001). Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Lett Appl Microbiol*, 32(1), 47-51. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00863.x
- Fox, J. M., & Zimba, P. V. (2018). Chapter 8 - Minerals and Trace Elements in Microalgae. In I. A. Levine & J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 177-193): Academic Press.
- Gaines, W. L. (1927). The Energy Basis of Measuring Milk Yields. *Journal of Animal Science*, 1927(1), 33-36. doi:10.2527/jas1927.1927133x
- Harris, W. S. (2012). Stearidonic Acid–Enhanced Soybean Oil: A Plant-Based Source of (n-3) Fatty Acids for Foods. *The Journal of Nutrition*, 142(3), 600S-604S. doi:10.3945/jn.111.146613
- Hussein, M., Harvatin, K. H., Weerasinghe, W. M. P. B., Sinclair, L. A., & Bauman, D. E. (2013). Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis¹. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3825-3834. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2013-6576>
- Kholif, A. E., Morsy, T. A., Matloup, O. H., Anele, U. Y., Mohamed, A. G., & El-Sayed, A. B. (2017). Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. *The Journal of Agricultural Science*, 155(3), 508-518. doi:10.1017/S0021859616000824
- Kirchgeßner, M. (1997). Tierernährung, Vol. 10, DLG-Verlag, Frankfurt a. Main, Germany.
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Jaakkola, S., & Vanhatalo, A. (2019). Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets. *Animal Feed Science and Technology*, 247, 112-126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.005>
- Lum, K. K., Kim, J., & Lei, X. G. (2013). Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 53. doi:10.1186/2049-1891-4-53
- Macías-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L. M., & Montero, O. (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering*, 66(2), 245-251. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.021>
- Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Figueres, L., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4), 303-314. doi:10.1007/s10482-006-9118-2

- Maia, M. R. G., Fonseca, A. J. M., Cortez, P. P., & Cabrita, A. R. J. (2019). *In vitro* evaluation of macroalgae as unconventional ingredients in ruminant animal feeds. *Algal Research*, 40, 101481. doi:10.1016/j.algal.2019.101481
- Manso, T., Castro, T., Mantecón, A. R., & Jimeno, V. (2006). Effects of palm oil and calcium soaps of palm oil fatty acids in fattening diets on digestibility, performance and chemical body composition of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3), 175-186. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.013>
- Meehan, D. J., Cabrita, A. R. J., Silva, J. L., Fonseca, A. J. M., & Maia, M. R. G. (2021). Effects of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Tetraselmis* sp. supplementation levels on *in vitro* rumen fermentation. *Algal Research*, 56, 102284. doi:10.1016/j.algal.2021.102284
- National Academies of Sciences, E., & Medicine. (2021). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Piepoli, M. F., Hoes, A. W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A. L., . . . Binno, S. (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*, 37(29), 2315-2381. doi:10.1093/eurheartj/ehw106
- Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2017). Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chemistry*, 235, 34-44. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.033
- Rajabi Islami, H., & Assareh, R. (2019). Effect of different iron concentrations on growth, lipid accumulation, and fatty acid profile for biodiesel production from *Tetrademus obliquus*. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3421-3432. doi:10.1007/s10811-019-01843-4
- Rebollosa-Fuentes, M. M., Navarro-Pérez, A., García-Camacho, F., Ramos-Miras, J. J., & Guil-Guerrero, J. L. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2966-2972. doi:10.1021/jf0010376
- Riccio, G., & Lauritano, C. (2020). Microalgae with Immunomodulatory Activities. *Marine Drugs*, 18(1), 2.
- Robinson, J. G., & Stone, N. J. (2006). Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*, 98(4a), 39i-49i. doi:10.1016/j.amjcard.2005.12.026

- Salomonsson, A. C., Theander, O., & Westerlund, E. (1984). Chemical characterization of some swedish cereal whole meal and bran fractions. *14*(3), 111-117.
- Scollan, N. D., Price, E. M., Morgan, S. A., Huws, S. A., & Shingfield, K. J. (2017). Can we improve the nutritional quality of meat? *Proc Nutr Soc*, *76*(4), 603-618. doi:10.1017/s0029665117001112
- Smith, F. E., & Murphy, T. A. (1993). Analysis of rumen ammonia & blood urea nitrogen. 4.
- Sukhija, P. S., & Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *36*, 1202-1206.
- Sundaram, T. S., Giromini, C., Rebucci, R., & Baldi, A. (2020). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Counteract Inflammatory and Oxidative Damage of Non-Transformed Porcine Enterocytes. *Animals*, *10*(6), 956.
- Tibbetts, S. M., Whitney, C. G., MacPherson, M. J., Bhatti, S., Banskota, A. H., Stefanova, R., & McGinn, P. J. (2015). Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. *Algal Research*, *11*, 435-447. doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.011>
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Loo, J. J., Chilliard, Y., & Doreau, M. (2003). Effect of Linseed Oil Supplementation on Ruminant Digestion in Dairy Cows Fed Diets with Different Forage:Concentrate Ratios. *Journal of Dairy Science*, *86*(12), 3999-4007. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74011-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74011-9)
- Urrutia, N., Bomberger, R., Matamoros, C., & Harvatine, K. J. (2019). Effect of dietary supplementation of sodium acetate and calcium butyrate on milk fat synthesis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *102*(6), 5172-5181. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2018-16024>
- Valente, L. M. P., Cabrita, A. R. J., Maia, M. R. G., Valente, I. M., Engrola, S., Fonseca, A. J. M., . . . Freire, J. P. B. (2021). *Microalgae as feed ingredients for livestock production and aquaculture*.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*(10), 3583-3597. doi:[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vanbergue, E., Hurtaud, C., Peyraud, J.-L., Beuvier, E., Duboz, G., & Buchin, S. (2018). Effects of n-3 fatty acid sources on butter and hard cooked cheese; technological properties and sensory quality. *International Dairy Journal*, *82*, 35-44. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.002>
- Zheng, H. C., Liu, J. X., Yao, J. H., Yuan, Q., Ye, H. W., Ye, J. A., & Wu, Y. M. (2005). Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high-yielding lactating cows and

conjugated linoleic acids in milk. *J Dairy Sci*, 88(6), 2037-2042. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72880-0

Zisis, F., Kyriakaki, P., Satolias, F. F., Mavrommatis, A., Simitzis, P. E., Pappas, A. C., . . . Tsiplakou, E. (2022). The effect of dietary inclusion of microalgae *Schizochytrium* spp. on ewes' milk quality and oxidative status. *Foods*, 11, 2950.