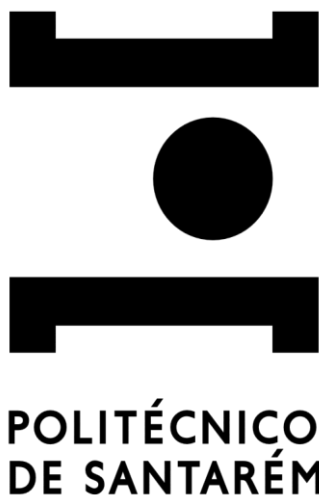


INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM

Escola Superior Agrária de Santarém



**Efeito do nível de inclusão de bromofórmio nos parâmetros de crescimento, na
qualidade das carcaças e nas emissões de metano *in vitro* de borregos em
crescimento**

Dissertação

Mestrado em Tecnologia Alimentar

João Miguel Silva Costa

Orientação:

Doutora Maria Margarida da Costa Ferreira Correia de Oliveira

Doutor José Manuel Bento Santos-Silva

Dezembro, 2024

Agradecimentos

Primeiramente agradecer ao meu orientador externo, Doutor José Santos-Silva que foi incansável na ajuda à elaboração desta dissertação. Em conjunto realizamos ensaios *in vivo*, trabalhamos no matadouro e nos laboratórios, discutimos sempre de forma saudável a elaboração do trabalho e na realidade saiu daqui uma amizade.

Ao meu orientador interno professora Margarida Oliveira, pelo apoio, pela tranquilidade e positivismo transmitido.

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Fonte-Boa um agradecimento pelo acolhimento e disponibilidade.

Aos meus colegas de trabalho, Kátia Paulos, Cláudia Costa, Teresa Dentinho, João Almeida, Ana Paula Portugal, Alexandra Francisco, Ana Paula Santos, Ana Teresa Belo, Patrícia Lage, Ana Timóteo e Judite Marques que me apoiaram e ajudaram em vários assuntos relacionados com o trabalho e também pelo apoio no laboratório. Um agradecimento especial ao meu colega José Batista pela compreensão do tempo que roubei ao serviço para estar em foco no trabalho e também pelo conhecimento técnico de laboratório que me transmitiu.

Aos meus pais Maria do Carmo e João Costa que me apoiaram e motivaram de várias formas e me deram força para continuar esta caminhada exigente.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha esposa Inês Pedro e ao meu filho João Maria que nasceu durante esta jornada. A eles um muito obrigado pela compreensão das ausências que fui fazendo e pelas noites retiradas a eles em benefício do trabalho.

Obrigado!

Acrónimos/Siglas

a* - Coordenada vermelho/verde

ADF – Acid detergente fiber

ADL – Legnin detergente fiber

AGV – Ácidos gordos voláteis

APA - Agência Portuguesa do ambiente

AMSA - American Meat Science Association

AT – *Asparagopsis taxiformis*

AR – Covariância autorregressiva

b* - Coordenada amarelo / azul

CH₄ – Metano

CHBr₃ – Bromofórmio

CIELAB – Comissão Internacional da Iluminação

cm² – Centímetro quadrado

CO₂ – Dióxido de carbono

CE – Comissão Europeia

CS – Simetria Composta

DMO – Digestibilidade da matéria orgânica

EN – Norma Europeia

EM – Energia metabolizável

EPM – Erro padrão da média

EU – European Union

eV – Eletrão-volt

EZN – Estação Zootécnica Nacional

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FMV-ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa

g – Grama

Gás-wch₄ – Gás sem metano

GB – Gordura bruta

GC-FID - Cromatografia gasosa com detetor de chama ionizada

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

GEE – Gases com efeito de estufa

GMD – Ganho médio diário

h – Hora

H₂ – Hidrogénio

HCL – Ácido clorídrico

i.e. – Isto é

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

ICMS – Índice de conversão da matéria seca

ISO – International Organization for Standardization

K⁺ - Potássio

kg – Quilograma

l – Litro

L* - Luminosidade

LI - *Longissimus lumborum*

LSMeans – Média dos mínimos quadrados

m – Metro

m² – Metro quadrado

mg – Miligrama

Min – Minuto

ml – Mililitro

mm – Milímetro

MO – Matéria orgânica

Mo dig – Matéria orgânica digestível

MS – Matéria seca

MSI – Matéria seca ingerida

N - Newton

Na⁺ - Sódio

NDF – Neutral detergente fiber

NP – Norma Portuguesa

N-total – Azoto total

°C – Graus centígrados

P-value – Significância

PB – Proteína bruta

PCQ – Peso da carcaça quente

PF – Peso final

PI – Peso inicial

PRR – Plano de recuperação e resiliência

PVC - Polyvinyl chloride

Rpm – Rotações por minuto

s – Segundo

SAS - Sistema de análise estatística

SF6 - Hexafluoreto de enxofre

Tan – Arco de tangente

V/V – Volume / volume

µm – Microlitro

3-NOP – 3-Nitrooxypropanol

Efeito do nível de inclusão de bromofórmio nos parâmetros de crescimento, na qualidade das carcaças e nas emissões de metano *in vitro* de borregos em crescimento.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da utilização da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (AT), como fonte de bromofórmio (CHBr_3), no ganho médio diário (GMD), índice de conversão (IC), ingestão, qualidade da carcaça, nos parâmetros fermentativos *in vitro*, características físicas e químicas da carne e no estado sanitário de borregos. Realizou-se um ensaio com a duração de 5 semanas com 18 borregos. A alga AT foi mergulhada em óleo de girassol, que foi utilizado como veículo transportador de CHBr_3 . Utilizou-se 3 dietas, onde B0 constituiu o controlo com 0 mg de CHBr_3 / kg matéria seca (MS), B50 50 mg de CHBr_3 / kg e B100 100 mg de CHBr_3 / kg. Os animais alimentados com as dietas com maior suplementação tiveram menor ingestão. Observou-se uma redução de CH_4 de 59% e 81%, nos tratamentos B50 e B100. A utilização de CHBr_3 pode não ser inócuo para a saúde dos animais.

Palavras-chave: *Asparagopsis taxiformis*, bromofórmio.

Effect of bromoform inclusion level on growth parameters, carcass quality and in vitro methane emissions of growing lambs.

Abstract

This work aimed to investigate the effect of using the red alga *Asparagopsis taxiformis* (AT), as a source of bromoform (CHBr₃), on average daily gain (ADG), conversion index (CI), intake, carcass quality, on the parameters *in vitro* fermentative processes, physical and chemical characteristics of meat and the health status of lambs. A 5-week trial was carried out with 18 lambs. The AT algae was immersed in sunflower oil, which was used as a CHBr₃ transport vehicle. Three diets were used, where B0 constituted the control with 0 mg of CHBr₃/ kg dry matter (DM), B50 50 mg of CHBr₃/ kg and B100 100 mg of CHBr₃/ kg. Animals fed diets with greater supplementation had lower intake. A CH₄ reduction of 59% and 81% was observed in treatments B50 and B100. The use of CHBr₃ may not be harmless to the health of animals.

Keywords: *Asparagopsis taxiformis*, bromoform.

Índice

Agradecimentos	I
Acrónimos/Siglas	II
Resumo	V
Abstract	VI
Introdução.....	1
Objetivo	2
Enquadramento teórico.....	2
Problemática ambiental.....	2
Impacte da produção animal no ambiente.....	3
Processo digestivo nos ruminantes.....	5
O processo digestivo e a produção de metano nos ruminantes	5
Anatomia digestiva	7
Formas de mitigação das emissões de metano com origem na produção de ruminantes	8
Vacinação	9
Seleção genética.....	9
Manipulação da dieta	9
Figura 3:Alga vermelha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	12
Técnicas de medição de CH ₄	13
Figura 4: Câmara respiratória e sistema GreenFeed, utilizado nas instalações do INIAV-Fonte Boa.	15
Capítulo 2	16
Metodologia	16
Processo de recolha da alga e enriquecimento do óleo com bromofórmio	16
Animais	16
Dietas.....	17
Maneio	19
Abate	20

Métodos de análise	21
Análise estatística	25
Capítulo 3	27
Resultados.....	27
Discussão.....	33
Conclusão.....	38
Bibliografia.....	40

Índice de figuras

Figura 1: Setores com maior emissão de GEE em Portugal em 2022.....	3
Figura 2: Estimativa de emissões de CH ₄ entérico (kg/animal por ano).....	4
Figura 3:Alga vermelha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	12
Figura 4: Câmara respiratória e sistema GreenFeed	15
Figura 5: Misturador experimental.....	17
Figura 6: Aspeto geral das instalações onde decorreu o trabalho.	20
Figura 7: Procedimento para a determinação das emissões de gás e de metano no sistema Ankom.	23
Figura 8: Determinação da força de corte em texturómetro.	25
Figura 9: Aspeto geral das carcaças dos borregos em ensaio.	29
Figura 10: Aspeto das alterações da mucosa do rúmen proveniente de animais alimentados com as dietas B50 e B100.	30

Índice de tabelas

Tabela 1: Composição em matérias-primas da dieta base.....	18
Tabela 2: Parâmetros químicos da dieta base e feno.	19
Tabela 3: Efeito do nível de inclusão de CHBr ₃ obtido por imersão de <i>Asparagopsis taxiformis</i> em óleo de girassol no ganho médio diário de peso, na ingestão e no índice de conversão de borregos.	27

Tabela 4: Efeito do nível de inclusão de níveis crescentes de CHBr3 obtido por imersão de <i>Asparagopsis taxiformis</i> em óleo de girassol no ganho médio diário de peso, no peso ao abate e nas características das carcaças de borregos.....	28
Tabela 5: Efeito do nível de inclusão de CHBr3 obtido por imersão de <i>Asparagopsis taxiformis</i> em óleo de girassol na degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e nos parâmetros fermentativos in vitro individuais de borregos.....	31
Tabela 6: Efeito do nível de inclusão de CHBr3 obtido por imersão de <i>Asparagopsis taxiformis</i> em óleo de girassol no pH e na composição química da carne de borregos.	32
Tabela 7: Efeito do nível de inclusão de CHBr3 obtido por imersão de <i>Asparagopsis taxiformis</i> em óleo de girassol nas características físicas da carne.....	33

Capítulo 1

Introdução

O presente trabalho inclui-se no projeto de investigação GEEBovMit, mitigação das emissões de gases com efeito de estufa (GEE) na produção de bovinos de carne – pastagens, forragens e aditivos naturais, atualmente em curso no Polo de Inovação do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

A Comissão Europeia (CE) adotou um conjunto de propostas legislativas que têm como objetivo a redução dos GEE em pelo menos 55% até 2030, redução de 30% das emissões de CH₄ até 2030 face ao nível de 2020 e a neutralidade em 2050. As emissões de GEE são uma preocupação global e o setor agrícola representa 12% do total dessas emissões (Moumen *et al.*, 2016). O CH₄ é um dos principais GEE, com um potencial de aquecimento 28 vezes maior que o dióxido de carbono (CO₂) num período de 10 anos (Moumen *et al.*, 2016). Este valor pode ser diferente se o espaço temporal se alterar. O sector agrícola é responsável por mais de 40 % das emissões de CH₄ (Agência Portuguesa do Ambiente [APA], 2023).

A alteração da dieta dos ruminantes, com recurso a suplementos alimentares, é uma das vias possíveis para a redução das emissões de CH₄ (Hristov *et al.*, 2018). Segundo Machado *et al.* (2016), a espécie de macroalgas AT, é uma alternativa importante para mitigação das emissões entéricas de CH₄. O CHBr₃, o composto secundário halogenado em maior proporção na alga AT, demonstrou ser muito eficaz na redução das emissões de CH₄ (Machado *et al.*, 2014). Este efeito foi comprovado em alguns ensaios *in vitro* (Machado *et al.*, 2014) e *in vivo* em bovinos (Stefenoni *et al.*, 2021) em que a AT foi liofilizada antes de ser incorporada em baixos níveis de suplementação na dieta dos animais. Estes estudos demonstraram eficácia instantânea, atingindo níveis de redução das emissões ruminais de CH₄ superiores a 90% (Black *et al.*, 2021).

Contudo, a liofilização é um processo muito dispendioso em termos económicos e tem também elevados custos ambientais, o que torna a sua utilização difícil de transpor para a prática. Como alternativa à liofilização Magnusson *et al.* (2020), desenvolveram um método de processamento eficaz para preservar e manter estável o CHBr₃. Após a recolha da AT do mar faz-se a imersão das massas em óleo vegetal onde deve permanecer por um período não inferior a 12 dias. Este processo permite obter um óleo enriquecido em CHBr₃, com bons níveis de recuperação e que se mantém estável à temperatura ambiente (25 °C) por um período de 24 semanas desde que mantido ao

abrigo do ar (Tan *et al.*, 2022). Este processo torna a utilização da alga económica e ambientalmente mais sustentável.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de CHBr_3 extraído da alga AT nos parâmetros de crescimento, na qualidade das carcaças, nas emissões de metano *in vitro* e no estado sanitário de borregos em crescimento.

Enquadramento teórico

Problemática ambiental

As alterações climáticas e o efeito de estufa são um problema intrínseco a nível global, o aumento da temperatura média no planeta e a crescente libertação de GEE para a atmosfera são cada vez mais preocupantes e alarmantes.

Para avaliar as alterações de temperatura, os seus impactes e riscos utiliza-se como referência o período 1850 – 1900, que se aproximam da temperatura global pré-industrial, e três períodos de referência futuros: 2021 – 2040 (curto prazo); 2041- 2060 (médio prazo); e 2081 – 2100 (longo prazo) (Pörtner *et al.*, 2022).

Segundo Pörtner *et al.* (2022) a temperatura aumentou 1,09 °C no período 2011 – 2020. Estima-se que há uma probabilidade de 50% de que o aquecimento global atinja ou exceda 1,5 °C a curto prazo, mesmo num cenário de baixas emissões de GEE (Pörtner *et al.*, 2022). Desde 1950, o CO_2 presente na atmosfera aumentou 28% e o CH_4 aumentou 70% até 2020 (Black *et al.*, 2021). A concentração de CH_4 na atmosfera aumenta a uma taxa anual de 1% (Moumen *et al.*, 2016). A redução das emissões de CH_4 é considerado um objetivo chave para a redução dos GEE, devido ao seu elevado poder de aquecimento global e ao seu curto tempo de vida na atmosfera que, segundo Glasson *et al.* (2022), é em média de 10 - 12 anos.

O efeito de estufa faz com que a temperatura à superfície da terra seja amena. Os GEE absorvem parte da radiação solar que atinge as partes altas da atmosfera e refletem parte da radiação que é emitida para a atmosfera pela superfície terrestre. Este efeito é extremamente importante para manter a temperatura no planeta. No entanto, a crescente libertação e acumulação de GEE para a atmosfera, que se verificou nos diversos setores da economia, tem desequilibrado este processo natural (APA, 2021). A elevada concentração de GEE está a resultar num aumento do aquecimento a nível global, e para isso contribuem fortemente os setores da energia (no qual está incluído os transportes), resíduos, agricultura e processos industriais (Figura 1).

■ Energia ■ Resíduos ■ Agricultura ■ Processos industriais

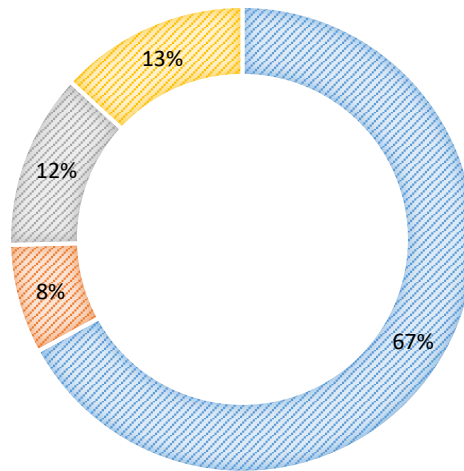


Figura 1: Setores com maior emissão de GEE em Portugal em 2022. Adaptado de: APA (2023).

Como forma de atenuar e prevenir os impactos das alterações climáticas foram criadas pela CE, inserido no pacote climático e energético 2020, três objetivos principais: reduzir em 20% o nível das emissões de GEE para a atmosfera, em relação a níveis de 1990; aumentar para 20% a proporção de energia proveniente de fontes renováveis da EU (European Union) e a melhoria em 20% na eficiência energética.

Impacte da produção animal no ambiente

O consumo de produtos derivados dos animais tem vindo a aumentar, principalmente nos países em desenvolvimento onde a população humana está em franco crescimento. Este consumo deve-se ao aumento da população, à urbanização e ao aumento dos rendimentos das famílias (Lan & Yang, 2019).

A indústria pecuária proporciona rendimentos a mais de 1,3 mil milhões de pessoas em todo o mundo e contribui aproximadamente em 33% para o produto interno bruto agrícola (Lan & Yang, 2018). No entanto, são referidos alguns inconvenientes diretos e indiretos da produção animal, relacionados com a utilização dos recursos naturais e o impacto no ambiente. Steinfeld *et al.* (2006) referem a este propósito que as atividades relacionadas com o setor pecuário ocupam cerca de um terço das terras não cobertas por gelo do planeta, consomem cerca de 8% da água doce extraída dos rios e aquíferos, e que é responsável por emissões apreciáveis de GEE e em muitas regiões está associada à degradação dos solos e à poluição ambiental.

A produção animal e principalmente os animais ruminantes (Figura 2) são uma fonte importante de emissões de CO₂ e CH₄ para a atmosfera. De acordo com Ferreira (2019), em Portugal, o setor animal é responsável por 83% das emissões de CO₂ resultantes de atividades agrícolas. Por outro lado, a fermentação entérica dos ruminantes é responsável por 58% das emissões agrícolas de CH₄ (Olivier *et al.*, 2005). Em 2006 a Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas, publicou um documento focado no impacto global da atividade pecuária nas questões ambientais, incluindo as emissões de GEE. De acordo com as estimativas referidas nesse trabalho, a pecuária contribui com 14,5% do total de emissões de GEE de origem antropogénica. Este valor foi contestado por Jiménez (2020), que criticou a metodologia seguida pela FAO nas suas estimativas, referindo que houve sobreposição da contribuição de alguns setores, como o transporte e a produção de eletricidade. De acordo com aquele autor, a percentagem real devida à produção pecuária é de 5% porque as emissões de transporte (terra, ar e marítimo) não devem estar diretamente ligadas à pecuária.

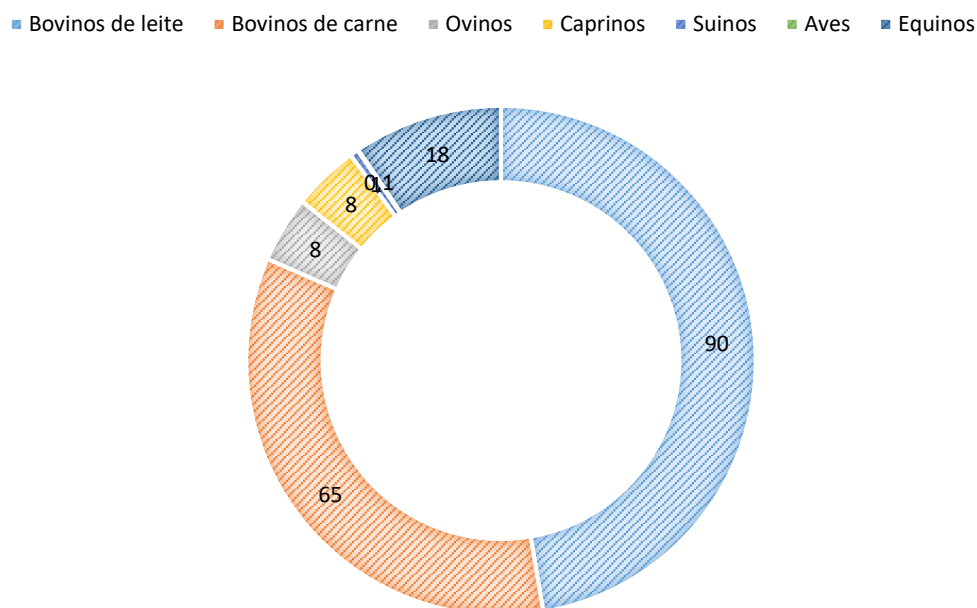


Figura 2: Estimativa de emissões de CH₄ entérico (kg/animal por ano). Adaptado de Moumen *et al.*, (2016).

Processo digestivo nos ruminantes

O processo digestivo e a produção de metano nos ruminantes

O processo digestivo nos ruminantes é um processo complexo que envolve a participação de uma extensa e complexa comunidade microbiana estabelecida no ecossistema ruminal e o equipamento enzimático do sistema endócrino associado ao tubo digestivo. Os ruminantes são animais herbívoros, que têm capacidade para digerir os elementos fibrosos dos constituintes vegetais das dietas, nomeadamente as forragens frescas ou conservadas. Essa capacidade resulta da simbiose que se estabelece entre os animais e a população presente no retículo-rúmen, que totaliza até 400 espécies diferentes de bactérias, bacteriófagos, protozoários, fungos e metanogénicos, que vivem em meio anaeróbio (Zhu *et al.*, 2021).

As bactérias representam cerca de 50% da biomassa microbiana e são as que tem maior importância nas fermentações dos hidratos de carbono. Grande parte destas bactérias tem origem no próprio sistema digestivo, no entanto algumas bactérias presentes podem ser diferentes dependendo do tipo de alimentação do animal (Dentinho, 1997).

Os protozoários ruminais são organismos eucariotas unicelulares, e geralmente representam cerca de 40% da biomassa microbiana (Jarrige *et al.*, 1990). A composição e dimensão da fauna microbiana pode variar também consoante a dieta do animal. Atuam na digestão dos hidratos de carbono, nomeadamente da celulose. Apesar de não ser degradada diretamente pelos protozoários, a ação hidrolítica que exercem sobre as hemiceluloses, com quebra das ligações entre estes compostos e a lenhina, faz com que a celulose fique mais disponível para a ação das enzimas microbianas (Jarrige *et al.*, 1990).

Os fungos são seres que penetram nos fragmentos vegetais através da cutícula, ao contrário das bactérias que só entram através dos estomas dos tecidos vegetais intactos ou por zonas destruídas pela mastigação (Dentinho, 1997). Em dietas ricas em forragens é normal encontrar-se uma grande concentração de fungos, conseguindo utilizar vários glúcidos como fonte de energia como é o caso da celulose, maltose, sacarose, celobiose e xilanas. Os fungos conseguem degradar alimentos muito lenhificados, mas não tem a capacidade de degradar a lenhina (Dentinho, 1997).

O processo digestivo, tem como produtos finais os ácidos gordos voláteis (AGV), CH₄, CO₂ e amónia. Isto deve-se à fermentação microbiana de hidratos de carbono e

de aminoácidos que ocorre no rúmen e em, muito menor escala no intestino grosso, onde são fermentados a fração dos alimentos que não foram degradados anteriormente (Dentinho, 1997). Os AGV são absorvidos em grande parte no retículo e no rúmen e são a principal fonte de energia que o animal ruminante tem. O ácido acético, ácido propiónico e o ácido butírico são os AGV com maior importância. O ácido acético está disponível em maior quantidade quando existe maior conteúdo de paredes celulares no alimento, o ácido propiónico aumenta com a presença de cereais e o ácido butírico aumenta com a presença de alimentos ricos em glúcidos solúveis e proteínas (Jarrige *et al.*, 1990).

O processo de digestão gera elevadas quantidades de (Hidrogénio) H_2 que tem de ser eliminado do meio sob pena de impedir a atividade do microbiota ruminal e as fermentações ruminais, com efeitos negativos na digestão dos alimentos (Zhu *et al.*, 2021). Os polissacarídeos (celulose, hemicelulose e amido) são hidrolisados e transformados em glucose e outros compostos simples (Beauchemin *et al.*, 2020). Os monossacarídeos são posteriormente metabolizados em AGV e CO_2 . Nestes processos fermentativos que convertem os monossacarídeos em AGV, há libertação de H_2 , com capacidade para reduzir os cofatores intracelulares (Beauchemin *et al.*, 2020). Para que as fermentações continuem a ocorrer, esses cofatores devem ser reoxidados. Este processo dá-se através da atividade da hidrogenase com formação de H_2 (Beauchemin *et al.*, 2020). O H_2 presente no rúmen existe sob a forma dissolvida ou gasosa. Só o H_2 gasoso é utilizado pelos microrganismos, sendo transferido do aparelho fermentativo de bactérias, protozoários e fungos para as *Archaea* metanogénicas, que o utilizam para reduzir o CO_2 e outros compostos monocarbonados, em CH_4 , através da via hidrogenotrófica (Hristov *et al.*, 2013). Os agentes metanogénicos também podem utilizar outros substratos como sejam a acetil-CoA, como dador de H_2 metabólico para a metanogénese ruminal. O CH_4 também pode ser produzido no rúmen através da utilização de grupos metilo e acetato. Assim o CH_4 representa o maior sumidouro de H_2 metabólico no rúmen. Também de referir que apesar da maior parte do H_2 metabólico produzido pela fermentação microbiana além de ser utilizado por agentes metanogénicos também é em parte utilizado para a produção de propionato (Beauchemin *et al.*, 2020).

As *Archaea* metanogénicas, que pertencem ao domínio *Archaea* e ao reino *Euryarchaeota*, são seres procaríotas altamente especializados (Hristov *et al.*, 2013). Apesar de serem os principais agentes da metanogénese, neste processo também interferem outras comunidades de microrganismos (Hristov *et al.*, 2013). Todos estes agentes metanogénicos tem em comum a presença da coenzima F420 que é o cofator

necessário para as enzimas hidrogenase e formato desidrogenase (Hook *et al.*, 2010). Outra coenzima característica dos metanogénicos é a coenzima M, que é produzida pelos metanogénios (*Methanobacterium*) ou proveniente de uma fonte externa como é o caso da *Methanobrevibacter ruminantium* (Hook *et al.*, 2010).

Os agentes metanogénicos são responsáveis pela captura de H₂ e CO₂ num processo redutor onde se dá a formação de CH₄. A síntese de CH₄ representa uma perda de carbono do rúmen que se liberta para o exterior principalmente por eructação, com perda de energia (Moumen *et al.*, 2016), que poderá representar entre 2 a 12% da energia total do alimento (Glasson *et al.*, 2022). As características celulares dos metanogénicos variam. A *Methanobrevibacter ruminantium* tem forma de bastonete com motilidade variável e é capaz de utilizar H₂, CO₂ e formiato como substrato para a produção de CH₄. A *Methanobacterium formicicum* pode ter a forma de bastonete ou filamento sem motilidade e é capaz de utilizar os mesmo substratos que a *Methanobrevibacter*. A *Methanomicrobium mobile* tem a forma de bastonete e é móvel, utiliza tanto o H₂ como o CO₂ e o formiato para produzir CH₄. A *Methanosarcina barkeri* e a *Methanosarcina mazeii* tem ambas a forma de cocóide sem motilidade. A ordem *Methanosarcinales* contém os únicos metanogénicos com citocromos que se podem desenvolver numa ampla gama de substratos. Os citocromos são transportadores de eletrões ligados à membrana que desempenham um papel importante na oxidação dos grupos metilo. A *Methanosarcina barkeri* é produtora de CH₄ a partir de H₂, CO₂, acetato, metilaminas e metanol. A *Methanosarcina mazeii* pode utilizar os mesmo substratos exceto o H₂ e o CO₂ (Hook *et al.*, 2010).

Anatomia digestiva

Os animais ruminantes são caracterizados por uma anatomia digestiva diferenciada. Estes animais tem quatro reservatórios gástricos, o rúmen, retículo abomaso e omaso:

1. O rúmen é o maior compartimento e representa 50 a 60% do volume total do aparelho digestivo. Numa vaca leiteira o rúmen pode conter até 80 kg de alimento e água. A água presente no rúmen provém dos alimentos, da água bebida e principalmente da saliva, a qual segrega abundantemente durante a mastigação a ingestão e a ruminação. No caso dos ovinos, a produção diária de saliva pode ser até 10 litros (Jarrige *et al.*, 1990). A saliva tem pH alcalino na ordem dos 8,2 e é rica em sódio, bicarbonato e fosfato que contribuem para manter o pH do rúmen na ordem dos 6,2 a 6,5 (Jarrige *et al.*, 1990).

O conteúdo ruminal é agitado de forma contínua e segue um circuito estabelecido que recorre às paredes do rúmen aos pilares e às pregas para se deslocar (Jarrige *et al.*, 1990).

É aqui que se dá 60 a 90% da digestão dos alimentos (Thivend *et al.*, 1985).

Desta fermentação resultam gases que são expulsos por eructação e AGV que são absorvidos nas paredes do rúmen, retículo e omaso (Jarrige *et al.*, 1990).

2. O retículo é o compartimento que se segue ao rúmen, estando separados apenas por uma prega, a separação é apenas parcial visto que a comunicação entre eles é permanente.
3. O omaso é um órgão com uma forma ovoide que tem tamanho superior ao retículo e a sua mucosa é formada por lamelas paralelas dispostas no sentido do trânsito intestinal. O omaso não tem secreções digestivas, atuando principalmente na regulação do trânsito e no controlo das partículas de alimento. Aqui dão-se fermentações necessárias à degradação de algumas partículas. O omaso tem uma grande capacidade de absorção de água, eletrólitos e também de AGV que não foram absorvidos no rúmen. No omaso é também onde se dá a absorção de bicarbonato, amoníaco, Na^+ e K^+ (Engelhardt & Hauffe, 1975).
4. O abomaso corresponde ao estômago dos monogástricos e neste compartimento, e também no intestino delgado, ocorre um processo digestivo marcadamente enzimático, que degrada os resíduos alimentares que não foram fermentados anteriormente. Esta digestão efetua-se através de suco gástrico, biliar, secreções intestinais e do suco pancreático. Os produtos resultantes destas fermentações são absorvidos no local (Dentinho, 1997).
5. No intestino grosso a matéria que não foi digerida anteriormente é de novo sujeita à ação microbiana onde permanece 15 a 24 horas. Neste compartimento as fermentações são muito parecidas com as que se dão no rúmen, no entanto os microrganismos responsáveis são diferentes onde prevalecem as bactérias celulolíticas e a ausência de protozoários. Aqui a atividade é bastante baixa devido aos constituintes degradáveis serem poucos. O intestino grosso em condições normais contribui com 5 a 10% para a digestão do alimento (Dentinho, 1997). Após este processo, o conteúdo digestivo é seco no colon e excretado (Jarrige *et al.*, 1990).

Formas de mitigação das emissões de metano com origem na produção de ruminantes

A abordagem correta de mitigação de CH_4 deve ser adaptada às necessidades de cada exploração de forma a mante-las rentáveis. Existem atualmente vários estudos

que comprovam que a mitigação das emissões do CH₄ ruminal é possível, existindo várias estratégias que demonstraram ser eficazes e sustentáveis.

Vacinação

A vacinação é um método que está a ser desenvolvido para reduzir a produção de CH₄. A vacinação baseia-se na estimulação do sistema imunológico do ruminante a produzir anticorpos contra agentes metanogénicos (Hook *et al.*, 2010). Este processo pode ser comprometido pela localização geográfica dos animais, visto que a população de metanógenos pode ser diferente. Também pode existir um desenvolvimento de espécies ou géneros metanogénicos alternativos depois da vacinação, o que compromete esta abordagem (Moumen *et al.*, 2016).

Seleção genética

Alguns autores identificam a seleção genética como forma de reduzir as emissões de CH₄, como sendo a via menos dispendiosa e com um efeito a longo prazo satisfatório. Selecionar os animais com uma tendência natural para uma menor produção de CH₄ pode ter efeitos a médio prazo (Capper *et al.*, 2009).

O melhoramento genético baseado na eficiência alimentar produz efeitos permanentes e cumulativos ao longo do tempo. Animais com maior eficiência alimentar valorizam mais as rações mais energéticas e produzem menos CH₄ (Moumen *et al.*, 2016).

Segundo De Vries & De Boer (2010), a produção de CH₄ diminui na ordem dos 11 a 26% em dez anos com a seleção genética. A correlação genética positiva entre consumo alimentar residual e emissões previstas indica que os animais com menores consumos alimentares residuais têm menores emissões previstas (De Vries & De Boer., 2010)

Manipulação da dieta

De todas as estratégias utilizadas para mitigar as emissões de CH₄, a que apresenta melhores resultados é a adição de ingredientes ao alimento dos animais (Glasson *et al.*, 2022).

Existem diferentes possibilidades para alcançar a mitigação do CH₄ a partir da manipulação da dieta dos animais através da inclusão de aditivos que atuem ao nível da metanogénese. Estes aditivos podem resultar em alterações do microbioma pela inibição dos grupos bacterianos produtores de CH₄, através da inclusão de bactérias

que competem diretamente com as bactérias metanogénica (Moumen *et al.*, 2016). A redução das emissões de CH₄ pode também resultar da competição entre microrganismos que utilizam o H₂, e o CO₂, que são os principais substratos utilizados pelos organismos metanogénicos (Lan & Yang., 2018; Auffret *et al.*, 2018).

Defaunação

O tratamento para a defaunação consiste na remoção de protozoários do rúmen. Tem sido utilizado sulfato de cobre, ácidos, produtos químicos tensoativos, triazina, lípidos, taninos, ionóforos e saponinas para este fim. Os protozoários partilham uma relação de simbiose com os metanogénicos, fornecendo o H₂ suficiente aos agentes produtores de CH₄. Esta simbiose é responsável por 9 a 37% da produção de CH₄ no rúmen (Hook *et al.*, 2010). A defaunação reduz 13% da produção de CH₄ mas pode variar dependendo da dieta do animal. Uma dieta rica em concentrado revela uma maior redução do CH₄ devido ao seu elevado teor em amido (Hook *et al.*, 2010).

Compostos ionóforos

Compostos ionóforos são também utilizados como agente inibidor da metanogénese. São agentes antimicrobianos amplamente utilizados na produção de animais ruminantes. A monensina demonstrou diminuir a produção de CH₄ utilizando o efeito antimicrobiano seletivo em micróbios ruminais. Este composto é conhecido por inibir microrganismos gram-positivos responsáveis por fornecer substrato para a metanogénese (Moumen *et al.*, 2016). Os efeitos causados pela monensina na célula microbiana são mediadas pela capacidade de interferir com o fluxo de iões. A monensina estimula a produção de propionato no rúmen o que favorece o desenvolvimento de microrganismos gram-negativos (Hook *et al.*, 2010). Este suplemento ocorre apenas numa fase inicial da alimentação porque a flora ruminal tende a restaurar ao longo do tempo (Moumen *et al.*, 2016). Desde 2006 que é proibida a utilização de antibióticos como aditivos na alimentação de ruminantes pelo que, apesar das vantagens reconhecidas na redução da metanogénese, não é permitido utilizar monensina como aditivo.

Lípidos

A adição de lípidos à dieta dos animais é uma outra via para conseguir a redução do CH₄ entérico sem alterar o pH do rúmen. A adição de ácidos gordos e óleos são opções que têm sido investigadas quer *in vitro* quer *in vivo*, com resultados significativos. Segundo Moumen *et al.* (2016), a redução de CH₄ *in vitro* foi de 80% e *in vivo* foi de 25%. O aumento do teor de lípidos leva à redução de CH₄ pela inibição dos protozoários,

o aumento de ácido propiónico e da biohidrogenação de ácidos gordos insaturados. Os ácidos gordos insaturados podem ser utilizados como recetores de H₂ (Moumen *et al.*, 2016). Pensa-se que os ácidos gordos inibem diretamente os organismos metanogénicos, ligando-se à membrana celular, interrompendo o seu transporte (Moumen *et al.*, 2016). Os ácidos gordos como é o caso do ácido mirístico reduz em 22% as emissões de CH₄. Segundo Hook *et al.* (2010), em estudos *in vitro* verificou que a utilização de ácidos gordos combinados têm maior supressão da metanogénese devido a um efeito sinérgico do que quando o ácido gordo atua isoladamente.

Taninos e saponinas

A adição de taninos pode também ser utilizada como forma de mitigar a metanogénese. Os taninos são polifenóis naturais com diferentes pesos moleculares e complexidades que são sintetizados durante o metabolismo secundário das plantas. Podem ligar-se a macromoléculas, como proteínas carboidratos estruturais ou amido e assim diminuir a sua disponibilidade para digestão (Moumen *et al.*, 2016). A presença de taninos no rúmen está relacionada com a proteção da proteína dietética contra a degradação por microrganismos ruminais, aumentando o fluxo de proteína a ser absorvida no intestino (Moumen *et al.*, 2016).

As saponinas são um conjunto de compostos bioativos presentes nas plantas, que em geral consiste numa aglicona ligada a um ou mais núcleos constituídos por açúcares. Estes compostos tem a capacidade de formar uma espuma estável no rúmen. O grupo polar do núcleo de açúcar e o grupo apolar da aglicona permite que a saponina diminua a tensão superficial. A saponina tem um efeito inibitório na metanogénese por limitar alguns protozoários e também diminuir a disponibilidade de H₂ (Moumen *et al.*, 2016).

Compostos químicos de síntese

Alguns compostos químicos de síntese, usados como aditivos na dieta dos animais, têm elevado efeito como inibidores da metanogénese. Entre estes compostos realça-se o bromoclorometano, bromometano sulfonato, 3-Nitrooxypropanol (3-NOP) clorofórmio e a ciclodextrina. Estes compostos inibiram em 50% o CH₄ emitido em estudos *in vivo* (ovinos, caprinos e bovinos) (Hristov *et al.*, 2013). No entanto, segundo o mesmo autor, a produção de CH₄ aumentou gradualmente com o passar do tempo, dando a entender que houve uma adaptação do ecossistema ruminal aos compostos. O efeito a longo prazo destes inibidores químicos de CH₄ é incerto e são necessários mais dados para comprovar os seus efeitos tendo em vista que alguns destes agentes tem um efeito cancerígeno (Hristov *et al.*, 2013).

A comercialização do composto 3-NOP foi já autorizada pela Bovaer® em mais de 45 países, incluindo a União Europeia, Austrália, Brasil, Chile, Paquistão, Suíça e Turquia. Tem um efeito inibitório sobre a metil-coenzima M redutase que catalisa a etapa final da metanogénese no rúmen. Este composto atua na mesma via de metanogénese, sequestrando o grupo protético requerido pela metil-coenzima M. Assim este composto compete com o CH₄ para as reações de transferência (Roque *et al.*, 2020). Segundo Beauchemin *et al.* (2020) os resultados indicam que as emissões entéricas de CH₄ diminuíram em mais de 20% com a suplementação de 3-NOP em dietas forrageiras, sem afetar a ingestão de MS. A comunidade microbiana predominante no rúmen e a digestibilidade aparente dos nutrientes no trato intestinal não demonstraram alterações.

Compostos químicos naturais (Asparagopsis taxiformis)

As algas desde há muitos anos que são utilizadas na nutrição humana, cosmética e na indústria farmacêutica, demonstrando propriedades antibacterianas, antivíricas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Li *et al.*, 2016). As algas são classificadas por tamanhos, micro e macroalgas. Nas macroalgas a classificação é feita a partir da sua pigmentação (verde, vermelha e castanha) e do habitat onde se encontram (água doce ou salgada) (Kinley *et al.*, 2016). A AT é uma macroalga marinha do género macroalga vermelha (Figura 3) e pode encontrar-se nos ecossistemas tropicais e temperados.



Figura 3:Alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (Adaptado de: Brian Azzopardi., 2024).

Como alimento a AT é uma fonte de polissacáridos de alta qualidade, proteínas, compostos bioativos, ácidos gordos e fibras alimentares, que no seu conjunto podem

satisfazer, parcialmente, as necessidades diárias dos animais ruminantes (Zhu *et al.*, 2021).

Algumas das macroalgas são ricas em lípidos, taninos e metabolitos secundários, que demonstram propriedades antimetanogénicas. A AT produz compostos bioativos (haloformas e dihalometanos) em glândulas especializadas com a finalidade de se proteger dos predadores herbívoros marinhos (Li *et al.*, 2016). O CHBr_3 é o composto halogenado mais abundante na AT (Machado *et al.*, 2016). O efeito dos metabolitos secundários na antimetanogénese foi demonstrado na fermentação *in vitro*, no qual as fermentações sofrem alterações dependendo da dose aplicada. No caso da AT, baixas taxas de inclusão reduzem drasticamente as emissões de CH_4 . (Machado *et al.*, 2016). Segundo Glasson *et al.*, (2022), a utilização desta alga como agente antimetanogénico redireciona a energia perdida sob a forma de CH_4 para metabolismos benéficos, resultando numa maior eficiência de utilização dos alimentos, refletindo-se num maior aproveitamento produtivo.

As espécies do género *Asparagopsis* sintetizam compostos orgânicos halogenados e também compostos halogenados inorgânicos como é o caso do CHBr_3 . Neste caso o teor de CHBr_3 presente na AT foi identificado como o constituinte ativo chave para inibir a metanogénese (Zhu *et al.*, 2021), através da inibição enzimática por reação com a vitamina B12 reduzida que inibe a eficácia da enzima metil transferase, que são essenciais para a biossíntese de CH_4 (Vucko *et al.*, 2016). Estes autores concluíram, em ensaios *in vitro*, que a utilização de $1,0 \text{ mg g}^{-1}$ de CHBr_3 é suficiente para inibir completamente a produção de CH_4 .

A redução da produção de CH_4 entérico é um objetivo muito importante, mas para que este objetivo seja prático tem de ser eficaz e sem efeitos negativos nas fermentações, incluindo a degradabilidade do substrato orgânico e a produção de AGV, que são a principal fonte de energia dos animais ruminantes (Machado *et al.*, 2016). A energia libertada durante as fermentações dos hidratos de carbono é utilizada na síntese de proteína microbiana e os AGV absorvidos pelas paredes do rúmen (Glasson *et al.*, 2022).

Técnicas de medição de CH_4

Atualmente existem várias técnicas de medição das emissões de CH_4 , quer sejam elas diretas ou indiretas.

As técnicas indiretas estão geralmente associadas a uma menor precisão e maior incerteza nos dados das emissões (Hristov *et al.*, 2018). Nas técnicas indiretas

inclui-se a relação de CO_2 e CH_4 no ar inalado para estimar as emissões de CH_4 . A técnica de sniffer, consiste na estimativa da emissão de CH_4 durante um evento de eructação e a frequência de eructação durante um período de tempo. A detecção laser de CH_4 , onde o dispositivo é direcionado para a boca e narinas do animal enquanto se alimenta e assim a leitura é realizada. Ainda o método *in vitro* pelo sistema ANKOM, em que se faz a recolha do suco de rúmen e uma amostra de alimento é colocado em fermentadores junto com uma solução tampão (Menke & Steingass, 1988) onde permanece 48h. Após este período recolhe-se o gás total e procede-se à análise de CH_4 por cromatografia gasosa.

Dentro das técnicas de medição diretas estão incluídas as câmaras de respiração (Figura 4). Nestas câmaras os animais são mantidos num espaço fechado com uma dinâmica de mistura de fluxo de ar constante. O CH_4 é identificado com detetores em pontos específicos da câmara que são calibrados diariamente com uma fonte de CH_4 puro. Os animais são mantidos nestas câmaras e as leituras são efetuadas durante 23 horas, sendo 1 hora para maneo. Após estas leituras, faz-se uma média da taxa de produção de CH_4 (Hristov *et al.*, 2018).

O método do traçador de hexafluoreto de enxofre (SF_6) consiste na medição da taxa de emissão do gás SF_6 libertado a partir do rúmen. Este gás não é tóxico, é fisiologicamente inerte e é estável. Além de ser um gás de baixo custo também tem um limite de detecção extremamente baixo. De modo a existir uma taxa de libertação continua deste gás, é colocado no rúmen um tubo com SF_6 de pequenas dimensões com taxa de permeação conhecida. O ar expirado é amostrado através de um tubo capilar colocado na narina do animal adaptado a um cabresto. Por sua vez este tubo está conectado a um tubo de Polyvinyl chloride (PVC) com pressão negativa que faz a recolha das amostras dos gases. Após a recolha dos gases as concentrações são determinadas por cromatografia gasosa. A partir da taxa conhecida de libertação do SF_6 no rúmen e das concentrações de CH_4 e SF_6 nas amostras de gás medidas, calcula-se o fluxo de CH_4 libertado pelo animal (Moura *et al.*, 2015).

O sistema GreenFeed é um aparelho no qual se faz a medição dos gases emitidos pela boca e pelas narinas dos bovinos. É constituído por um comedouro, um reservatório de alimento, sensor de gases, sensor de presença do animal, um medidor de fluxo de ar e um exaustor. Os animais são atraídos para o comedouro com alimento concentrado, são alimentados por um sistema pré-programado que liberta automaticamente o alimento assim que deteta o brinco. Ao colocar a cabeça no aparelho o animal é identificado e ao mesmo tempo o ventilador começa a funcionar de forma a

aspirar o ar exalado. O sensor mede a quantidade de CO_2 e de CH_4 e envia essas medições para o computador (Figura 4).



Figura 4: Câmara respiratória e sistema GreenFeed, utilizado nas instalações do INIAV-Fonte Boa.

Capítulo 2

Metodologia

Para alcançar os objetivos propostos realizou-se um ensaio com borregos em crescimento, alojados individualmente. O ensaio teve a duração de 5 semanas e decorreu na Estação Zootécnica Nacional (EZN) atualmente o Polo de Inovação de Santarém do INIAV (INIAV-Fonte-Boa), situado na Quinta da Fonte Boa, Vale de Santarém. Este trabalho foi realizado na Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Produção e Saúde Animal, envolvendo os laboratórios de nutrição e de tecnologia e segurança alimentar, as instalações para ovinos e o matadouro do núcleo de Sistemas e Técnicas de Produção. O trabalho está integrado no projeto GEEBovmit – Mitigação das emissões de GEE na produção de bovinos de carne – pastagens, forragens e aditivos naturais (PRR-C05-i03-I-000027-LA3.4) atualmente em curso e coordenado pelo INIAV-Fonte Boa.

Processo de recolha da alga e enriquecimento do óleo com bromofórmio

A alga AT foi recolhida por uma empresa parceira do projeto ao largo da ilha do Faial, Angústias, nos Açores em maio de 2022 pela empresa parceira do projeto seaExpert. A alga foi recolhida por mergulho a uma profundidade entre os 3 a 6 m. Na embarcação as algas foram drenadas e imersas em óleo de girassol na proporção 50:50 (peso:volume) e acondicionadas em contentores de 150 L opacos. Foram levados para terra onde permaneceram fechados durante 28 dias. Decorrido este período o óleo enriquecido em CHBr_3 (Denominado bromoil) foi separado da água e da biomassa por gravimetria e armazenado em garrafas opacas de 5 L, que foram enviadas para as instalações do INIAV – Fonte-Boa. Foi retirada uma amostra representativa de todas as barricas e obteve-se uma concentração média de 2,97 mg/mL de CHBr_3 . Segundo Magnusson *et al.* (2020), a utilização de óleo vegetal, retém e previne a degradação de compostos bioativos, que através da volatilização se pode perder.

Animais

Os animais utilizados neste ensaio foram 15 borregos machos e 3 fêmeas cruzados da raça Lacaune, nascidos em agosto de 2021 no efetivo da Quinta da França (Caria - Covilhã) pertencente à Terraprima e desmamados a 2 de outubro de 2021. Cerca de duas semanas após o desmame os borregos foram transportados para as instalações do INIAV-Fonte Boa. À chegada foram pesados e nessa altura foram definidos 2 blocos para os machos de acordo com os pesos iniciais (PI) (i.e. alto PI ou baixo PI) e um terceiro bloco com 3 fêmeas, onde foram aleatoriamente distribuídos os

3 tratamentos. Foi também aleatória a atribuição dos tratamentos aos parques onde os borregos foram alojados individualmente, com acesso permanente a água limpa e com cama de aparas de madeira.

Dietas

As dietas dos animais foram elaboradas com base num alimento composto, farinado, cuja composição em matérias-primas se apresenta na tabela 1. A este alimento base foi acrescentado diariamente o bromoil de modo a fornecer a quantidade de CHBr_3 estabelecida para os 3 tratamentos: 0 mg/ kg MS (B0); 50 mg/ kg MS (B50); 100 mg/ kg MS (B100). As dietas foram misturadas num misturador de sem-fim com a capacidade de 50 L. Na dieta B0 foi misturado óleo de girassol comercial sem CHBr_3 na proporção estabelecida (Figura 5).



Figura 5: Misturador experimental utilizado para uniformizar a distribuição do bromoil no alimento base.

O alimento base era colocado no misturador e com o auxílio de proveta volumétrica era colocado o volume pretendido de óleo de girassol e ou de bromoil na diluição estabelecida. Este procedimento era feito de forma lenta e faseada para evitar a formação de grânulos. As dietas foram misturadas sequencialmente, iniciando-se com o tratamento B0 até ao B100, para reduzir o risco de contaminação com CHBr_3 . Decorrido o tempo necessário para a mistura (em média 10 minutos) abria-se uma válvula na parte inferior do misturador e deixava-se escoar para um saco, sendo imediatamente distribuída.

Tabela 1: Composição em matérias-primas da dieta base em percentagem da matéria seca (MS)

Componente	
Milho (%)	7,00
Cevada (%)	7,50
Trigo (%)	7,50
Polpa de citrinos (%)	7,50
Polpa de beterraba (%)	7,50
Casca de soja (%)	7,00
Bagaço de Soja (%)	10,00
Bagaço de Girassol (%)	3,15
Carbonato de Cálcio (%)	1,40
Bicarbonato de sódio (%)	0,80
Sal marinho (%)	0,45
Vitatec borregos (%)	0,20
Luzerna desidratada (%)	40,00

Diariamente as sobras eram recolhidas dos comedouros e eram pesadas. O valor de sobras era subtraído à quantidade distribuída no dia anterior, obtendo-se assim a ingestão do dia anterior. Diariamente era distribuída uma quantidade de alimento superior em 10% à quantidade ingerida no dia anterior, de forma a que houvesse sempre sobras. Era ainda distribuído feno em todos os parques, numa proporção de 10 % do alimento concentrado.

Foram efetuadas recolhas de amostras destas dietas no início, no meio e no final do ensaio para serem enviadas ao laboratório para análise. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros químicos da dieta base e feno calculados em amostras compósitas de 3 períodos diferentes (início, meio e final de ensaio).

	Dieta base			Feno
	B0 ¹	B50 ²	B100 ³	
MS ⁴ (%)	87,4	87,3	87,3	89,4
MO ⁵ (% MS)	88,9	88,9	88,6	90,1
PB ⁶ (% MS)	15,0	15,9	15,6	6,0
GB ⁷ (% MS)	3,6	2,7	4,10	0,9
FB ⁸ (% MS)	19,6	19,8	19,8	39,4
NDF ⁹ (% MS)	44,3	43,8	43,7	74,9
ADF ¹⁰ (% MS)	26,1	26,1	25,6	50,3
ADL ¹¹ (% MS)	4,1	4,1	3,94	8,0
Açúcar (% MS)	7,7	7,9	7,52	3,28
Amido (% MS)	16,9	16,1	17,8	2,03
Cinzas (% MS)	11,4	11,1	11,4	9,9
Digestibilidade (%)	MS	72,5	74,5	73,1
	MO	72,5	74,7	73,1

¹B0: 0 µg CHBr3/g de MS substrato; ²B50: 50 µg CHBr3/g de MS substrato, ³B100: 100 µg CHBr3/g de substrato MS, ⁴Matéria seca, ⁵Matéria orgânica, ⁶Proteína bruta, ⁷Gordura bruta, ⁸Fibra bruta, ⁹Neutral detergent fiber, ¹⁰Acid detergent fiber, ¹¹Acid detergent legnine.

Maneio

Os animais permaneceram em parques com camas de aparas de madeira que eram mantidas secas com nova aplicação sempre que necessário. Todos os parques tinham água limpa em balde ou em bebedouro automático. A área média de cada parque era 1,25 m² e os animais estavam separados entre si com grades de metal que permitiam o contacto visual e físico (Figura 6).

Semanalmente (quarta-feira) todos os animais eram encaminhados para a balança para serem pesados.



FIGURA 6: Aspeto geral das instalações onde decorreu o trabalho.

Abate

O abate decorreu em 2 datas diferentes (5, e 7 de dezembro) por forma a permitir realizar o trabalho laboratorial subsequente. Os 9 borregos (3 por tratamento) seleccionados para cada dia foram transportados em reboque de transporte de gado para o matadouro do INIAV- Fonte-Boa.

No matadouro os animais foram insensibilizados por eletronarcose e imediatamente sangrados de acordo com a legislação do bem-estar e proteção animal (Regulamento (CE) n.º 1099/2009), legislado por Decreto-Lei n.º 113/2019). Após a esfolagem e evisceração, as carcaças foram pesadas de forma a obter o peso da carcaça quente (PCQ).

Logo que se procedeu à evisceração, o conteúdo ruminal foi recolhido individualmente, filtrado por quatro camadas de gaze e funil de porcelana e foi transportado para o laboratório em garrafa térmica, onde foi utilizado como inóculo nos fermentadores ANKOM para avaliação das emissões de CH₄ associadas a cada tratamento. Pesquisou-se por observação visual o aparecimento de lesões nas paredes do rúmen de todos os animais.

As carcaças foram mantidas em condições de refrigeração (2 °C) e vinte e quatro horas depois do abate efetuou-se a classificação visual das carcaças de acordo com a grelha SEUROP (European Commission [EC], 2011) e com a grelha da EU para ovinos ligeiros. As carcaças foram divididas em 2 metades segundo o eixo longitudinal e

procedeu-se à desmancha das metades esquerdas de acordo com o corte descrito por (Santos-Silva *et al.*, 2002). Colheram-se as peças correspondentes ao lombo para determinação de parâmetros químicos e doseamento de CHBr_3 . Depois de determinados os parâmetros da cor no músculo *Longissimus lumborum* (LI), este foi isolado e moído numa picadora de uso doméstico (Moulinex-123 A320R1, Group SEB Portugal Lda, Lisbon, Portugal) (3 × 5 s). Parte da amostra de músculo foi embalada a vácuo, conservada a - 20°C e enviada para o laboratório da Nutrição Animal do INIAV-Fonte Boa para determinação de parâmetros químicos (MS, pH, proteína bruta (PB) e gordura bruta (GB)). Outra porção de músculo foi conservada do mesmo modo e enviada para a FMV-ULisboa para doseamento de CHBr_3 . Nas metades direitas das carcaças foi retirada a porção correspondente ao lombo, que foi embalada a vácuo e mantida a - 20°C até ser utilizada para a caracterização dos parâmetros físicos da carne

Métodos de análise

Alimentos

Para a caracterização dos alimentos fornecidos aos animais determinaram-se a MS pela Norma Portuguesa (NP) International Organization for Standardization (ISO) 6496:2018, a cinza bruta pela NP ISO 5984:2014, o azoto total (N-total) pelo método kjeldahl (NP norma europeia (EN) ISO 5983-2:2009), a GB pela NP ISO 6492:2014, a fibra bruta (FB) pela NP EN ISO 6865:2009, a fibra em detergente neutro (NDF) pela NP EN ISO 16472:2013, a fibra em detergente ácido (ADF) e a lenhina em detergente ácido (ADL) pela EN ISO 13906:2008, o açúcar e o amido pelo método de Clegg (1956) e o pH foi pela NP 3441:2007.

A digestibilidade da MS e da MO das dietas foi determinada *in vitro* pelo método Tilley and Terry (1961). As amostras foram previamente secas a 103 °C. Pesaram-se 0,5000g de cada amostra em duplicado para frascos com tampa equipada com válvula de bunsen, que se colocaram em banho termostaticado a 38 °C. Fizeram-se soluções de microelementos e de macroelementos, que foram misturadas nas quantidades de 5000 ml e 50 ml e depois com suco de rúmen numa proporção de 4:1 v/v para obter o inóculo de fermentação. O suco de rúmen foi obtido logo após o abate de um novilho no Matadouro Regional de Santarém, foi filtrado por 4 camadas de gaze para um funil de porcelana e recolhido em garrafa térmica para ser transportado para o laboratório. Todo este material foi mantido a 38 °C. Procedeu-se à incubação das amostras colocando 50 ml da mistura em cada tubo em banho termostaticado, saturou-se o meio com CO_2 . Decorridas 48h fez-se uma acidificação forte com 2 ml de ácido clorídrico (HCl) a 5 N e adicionou-se 50 ml de solução de pepsina ácida que atuou durante 48h. No fim deste

período o conteúdo de cada frasco foi filtrado com ajuda de água quente e vácuo para um cadinho com placa filtrante nº 2. Levaram-se os cadinhos à estufa durante 12 horas a 103 °C, pesaram-se e levaram-se à mufla a 550 °C durante 2 horas e pesaram-se novamente.

Fermentação in vitro para obtenção do gás total

O gás total produzido através das fermentações foi obtido com recurso ao sistema de produção de gás da ANKOM RF (ANKOM Gas Production System, technology, NY, EUA). No matadouro recolheu-se individualmente suco de rúmen de cada borrego, que foi filtrado por quatro camadas de gaze e colocado em garrafa térmica mantida a 39 °C. Foi de imediato levado para o laboratório no INIAV-Fonte Boa. Pesou-se 1 g de MS da dieta correspondente ao animal dador para o respetivo frasco de fermentação. Cada fermentador e seu duplicado correspondeu a um animal e à dieta que consumiu durante o ensaio. Foi feita a mistura de suco de rúmen e solução tampão na proporção 1:2 (v/v). Nos fermentadores já com a amostra foram colocados 90 ml da mistura e 2 ml de solução redutora (Menke & Steingass, 1988) e saturou-se o meio com CO₂. A incubação fez-se em banho maria a 39 °C com agitação (50 rpm), durante 48 horas, sendo as leituras de gás registadas automaticamente, com intervalos de 20 min, utilizando um software dedicado BacVis. A pressão do gás foi convertida em moles de gás usando a lei dos gases ideais e convertido em ml de gás produzido usando a lei de Avogrado. No final de cada ciclo de incubação, recolheram-se amostras de gases do headspace em seringa, de cada fermentador e analisado a quantidade de CH₄ por cromatografia gasosa (GC) (HP6890A, Agilent, Avondale, PA, EUA) utilizando uma coluna capilar (TG Bond Q 30 m × 0,53 mm × 20 µm, Thermo Scientific) e detetor de chama ionizada. A temperatura da coluna do GC foi mantida em 150 °C e as temperaturas do injetor e do detetor foram 200 °C e 220 °C, respetivamente. Para cada corrida injetaram-se 200 µL de gás, utilizando uma seringa, Pressure-lock precision analytical syringe (Supelco, Bellefonte, PA, EUA, série A-2, 1 ml), considerando 5 réplicas por amostra (Santos-Silva *et al.*, 2020). Na figura 7 estão documentados alguns dos passos desta determinação

Filtração conteúdo do rúmen



Incubação



Recolha de gás



Seringa para injeção do gás no cromatógrafo



FIGURA 7: Procedimento para a determinação das emissões de gás e de metano no sistema Ankom.

Determinação do bromofórmio no óleo e na carne

A determinação da concentração de CHBr_3 foi feita através da adaptação do procedimento relatado por Magnusson *et al.*, (2020). Para a extração do CHBr_3 no óleo, adicionou-se a 1 ml de óleo, igual volume de CH_4 e 10 μL de padrão interno (Naftaleno a 1 mg/ml), e após agitação em vortex a mistura foi mantida a 4 °C, durante 2 horas. No fim desse período, diluiu-se 50 μL da solução em metanol para um volume final de 5 ml e transferiu-se 1 ml para um vial de cromatografia. Para a extração do CHBr_3 nas amostras de carne, pesou-se 5 g de amostra para um tubo de vidro, adicionou-se 9,5 ml de metanol e 500 μL de padrão interno (Naftaleno a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A mistura foi colocada nos ultrassons durante 15 min, e deixou-se repousar 72h, a 4°C. No final transferiu-se 1 ml para um vial de cromatografia.

A quantificação do CHBr_3 em ambos os extratos foi realizada por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa (GC-MS) utilizando um equipamento Shimadzu GC MS QP2010-plus, com uma coluna capilar de sílica fundida (Supelcowax10, 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno, espessura de filme de 0,20 μm ,

Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA) e em modo de seleção de íons (SIM) como descrito por Sena *et al.*, (2023). A concentração de CHBr_3 foi calculada a partir da área de pico sobre a área do padrão interno e convertido em concentração através da construção de curvas de calibração na gama entre 1 e 45 $\mu\text{g/ml}$ para o óleo e 5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ para a carne.

Composição química da carne

A determinação da MS na carne foi realizada através da NP 1614:2002.

O teor de PB foi calculado através da determinação do teor de azoto total, seguindo a NP EN ISO 5983-2, que prevê a digestão da matéria orgânica da amostra por via húmida com ácido sulfúrico em presença de catalisador, seguida da alcalinização da solução resultante por adição de solução de hidróxido de sódio e posterior destilação por arrastamento de vapor, recolha em ácido bórico e titulação do amoníaco libertado com solução de HCL.

A GB foi determinada em músculo liofilizado através da adaptação do método Folch *et al.*, (1957), em que para o processo de extração se fez a substituição do clorofórmio e o metanol (2:1, v/v) por diclorometano:metanol (2:1 v/v).

Cor da carne, perda de água e força de corte

Para as determinações físicas as amostras de carne foram descongeladas durante 20 horas em refrigeração $2^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. A determinação da cor da carne foi realizada com um colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Japão) com uma abertura de 10 mm de diâmetro e iluminante D65 e calibrado com um padrão branco. A cor foi avaliada depois de 60 min de exposição ao ar, correspondendo o valor de cada parâmetro à média de 3 leituras, em 3 pontos diferentes da superfície da carne. A avaliação da cor foi feita no sistema CIELAB em que L^* corresponde à luminosidade, $+a^*$ ao índice de vermelho e $+b^*$ ao índice de amarelo. A partir dos valores de a^* e b^* , determinaram-se ainda o índice de saturação da cor, Chroma $((a^2 + b^2)^{1/2})$ e a tonalidade, Hue $(\tan^{-1}(b^*/a^*))$ (American Meat Science Association [AMSA], 2012).

Para avaliação da textura da carne, procedeu-se inicialmente à remoção do músculo *longissimus dorsi* da coluna vertebral seguida da limpeza dos tecidos adiposos envolventes. As amostras foram pesadas (PI) antes de preparadas em forno elétrico de convecção natural a 170°C até atingirem 71°C no centro térmico da amostra. A monitorização desta temperatura foi realizada com termopares tipo T acoplados a um termómetro Omega RDXL4SD (Manchester, EUA). Depois disso, as amostras foram arrefecidas em água corrente, secas com papel absorvente e de novo pesadas (PF). As

perdas de peso determinaram-se como as diferenças nos pesos das amostras antes e depois de cozinhadas e foram expressas como percentagem do PI. Para determinar a força máxima de corte, as amostras foram cortadas paralelamente à direção das fibras musculares (1×1×3 cm), 24 horas depois de cozinhadas, tendo sido mantidas em condições de refrigeração. Estas subamostras foram avaliadas num texturómetro TA-XT2 (Stable Micro System, Surrey, Inglaterra) equipado com uma célula de carga de 30 kg e um dispositivo de corte Warner-Bratzler, e realizou o corte a uma velocidade de 2 mm/s, ao longo de 25 mm (Figura 8). As curvas foram analisadas, determinada a força máxima de corte expressa em N/cm², e a média das 25 a 30 medições efetuadas por amostra foi utilizada para análises estatísticas (Almeida *et al.*, 2018).



Figura 8: Determinação da força de corte em texturómetro.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Proc MIXED do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), utilizando nos modelos o peso como bloco (alto PI e baixo PI), sendo o animal a unidade experimental. A homogeneidade das variâncias foi testada para $P= 0,01$, e quando significativas foram acomodadas no modelo utilizando o comando “repeated group” do Proc Mixed.

O consumo de MS e dos nutrientes foi analisado com um modelo que considerou medidas repetidas no tempo em cada animal com uma estrutura de covariância autorregressiva (AR(1)), que incluiu o tratamento e o bloco como efeitos fixos. O GMD foi determinado individualmente por regressão linear e foi estudado por um modelo que incluiu os efeitos fixos do tratamento e do bloco.

Os resultados do ensaio *in vitro* foram estudados com um modelo que considerou os dois fermentadores do mesmo borrego como subamostras, a dieta como um efeito fixo e o dia do abate como um efeito aleatório. A estrutura de covariância utilizada para a subamostragem foi a simetria composta (CS), selecionada de acordo com os critérios AICC.

O PVA e o peso da carcaça foram ajustados ao PI num modelo que incluiu o tratamento e o bloco como efeitos fixos. Os resultados do IC e dos parâmetros da qualidade físico-química da carne foram analisados por um modelo idêntico, mas sem incluir o efeito da covariável.

Em todos os modelos, quando o efeito do tratamento foi significativo ($P < 0.05$), fez-se a comparação das Médias dos Mínimos Quadrados (LSMeans) para encontrar as diferenças entre tratamentos. São estes os valores apresentados nos quadros, associados ao Erro Padrão da Média.

Capítulo 3

Resultados

Na tabela 3 estão apresentados os resultados referentes ao crescimento, ingestão e IC. Quanto ao GMD, não se encontraram diferenças significativas, sendo o valor médio de $174,1 \pm 71,62$ g. Como se esperava, a ingestão de CHBr_3 refletiu a diferença nos níveis de suplementação e foi superior no tratamento B100. A ingestão de MS, PB, NDF, açúcar e energia metabolizável (EM), foi superior no tratamento B0, sendo menor e semelhante entre os tratamentos B50 e B100. A ingestão de GB foi superior para o tratamento B0, seguido do B100 e do B50. A ingestão de amido foi superior para o tratamento B0, seguido do B50 e pelo B100. O ICMS não foi afetado pelos tratamentos.

Tabela 3: Efeito do nível de inclusão de CHBr_3 obtido por imersão de *Asparagopsis taxiformis* em óleo de girassol no ganho médio diário de peso, na ingestão e no índice de conversão de borregos.

	Tratamentos			EPM ⁴	P-value ⁵
	B0 ¹	B50 ²	B100 ³		
GMD ⁶ (g/dia)	187,6	165,6	152,0	31,92	0,725
Ingestão					
CHBr ₃ (mg/dia)	-	41,4	81,0	1,85	<0,001
MS ⁷ (g/dia)	997 ^b	831 ^a	798 ^a	23,6	<0,001
PB ⁸ (g/dia)	159 ^b	140 ^a	132 ^a	3,9	<0,001
GB ⁹ (g/dia)	37,5 ^c (0,94)	23,4 ^a (0,62)	29,8 ^b (0,94)		<0,001
NDF ¹⁰ (g/dia)	526 ^a	436 ^b	418 ^b	12,2	<0,001
Açúcar (g/dia)	176 ^b	139 ^a	148 ^a	4,2	<0,001
Amido (g/dia)	80,8 ^c	68,8 ^b	62,8 ^a	1,94	<0,001
EM ¹¹ (MJ/dia)	9,29 ^b	7,95 ^a	7,48 ^a	0,224	<0,0001
ICMS ¹²	5,51 (0,883)	5,84 (0,883)	8,98 (2,75)		0,544

¹B0: 0 µg CHBr_3 /g de MS substrato; ²B50: 50 µg CHBr_3 /g de MS substrato, ³B100: 100 µg CHBr_3 /g de substrato MS, ⁴Erro Padrão da Média; ⁵Significância; ⁶Ganho médio diário; ⁷Matéria seca; ⁸Proteína bruta; ⁹Gordura bruta; ¹⁰Fibra detergente neutro; ¹¹Energia metabolizável; ¹²Índice de conversão da matéria seca.

A tabela 4 apresenta os resultados do PVA, do PCQ e do rendimento da carcaça. Não houve diferenças entre tratamentos para o PVA e para o rendimento da carcaça, com valores médios de $23,5 \pm 3,98$ kg e $46,1 \pm 3,08$ %, respetivamente. O PCQ foi afetado pelos tratamentos ($P=0,042$), sendo menor com o tratamento B100 do que com os tratamentos B0 e B50, os quais entre si não apresentam diferenças significativas. O valor obtido para o B100 foi menor do que o obtido para o B0, apresentando o B50 um valor intermédio

Tabela 4: Efeito do nível de inclusão de níveis crescentes de CHBr₃ obtido por imersão de *Asparagopsis taxiformis* em óleo de girassol no ganho médio diário de peso, no peso ao abate e nas características das carcaças de borregos.

	Tratamentos			EPM ⁴	P-value ⁵
	B0 ¹	B50 ²	B100 ³		
PVA ⁶ (kg)	24,3 (0,90)	23,5 (0,95)	21,9 (0,90)		0,206
PCQ ⁷ (kg)	11,4 ^a (0,44)	11,0 ^{ab} (0,44)	9,60 ^b (0,469)		0,042
Rendimento (%)	46,6	45,8	44,9	1,36	0,683

¹B0: 0 µg CHBr₃/g de MS substrato; ²B50: 50 µg CHBr₃/g de MS substrato, ³B100: 100 µg CHBr₃/g de substrato MS, ⁴Erro Padrão da Média; ⁵Significância; ⁶Peso vivo ao abate; ⁷Peso da carcaça quente.

Classificação da carcaça

A classificação das carcaças de borrego foi feita com base em duas grelhas diferentes. Para as carcaças com peso inferior a 13kg utilizou-se a grelha da EU para ovinos ligeiros (Regulamento (CE) N° 1249/2008), que corresponderam a 78% dos animais. Destes, 50% foram classificados na classe B (7-10 kg) e 50% na classe C (10-13 kg) quanto ao peso. Em relação à categoria, 57% foram de primeira categoria e 43% de segunda categoria. Para as carcaças com mais de 13 kg, que corresponderam a 22% dos animais, utilizou-se a grelha SEUROP da UE para carcaças de ovinos (EC, 2011), que corresponderam a 22% das animais. Nesta grelha todas foram classificadas na classe O quanto à conformação (Regular) e na classe 2 (magras) quanto ao acabamento (Figura 9).



Figura 9: Aspeto geral das carcaças dos borregos em ensaio.

A avaliação visual da parede do rúmen dos animais envolvidos no ensaio foi feita imediatamente após a evisceração, por um veterinário e docente na Faculdade de Medicina Veterinária (ULisboa), com larga experiência na observação e manipulação deste tipo de material biológico. A observação visual permitiu verificar que os rúmen dos animais pertencentes ao grupo B0 não mostraram nenhuma alteração. Contudo, nos animais pertencentes aos grupos B50 e B100, foram detetadas alterações da condição normal do rúmen em 50 % dos animais, localizadas na zona ventral. A gravidade dessas alterações foi variável entre animais. Nalguns casos as alterações caracterizaram-se pela diminuição da densidade das papilas e nos casos mais graves observaram-se alterações do tipo proliferativo, com a formação de estruturas de aspeto esponjiforme em forma de cogumelos, conforme se pode observar nas figuras 10 A e B.

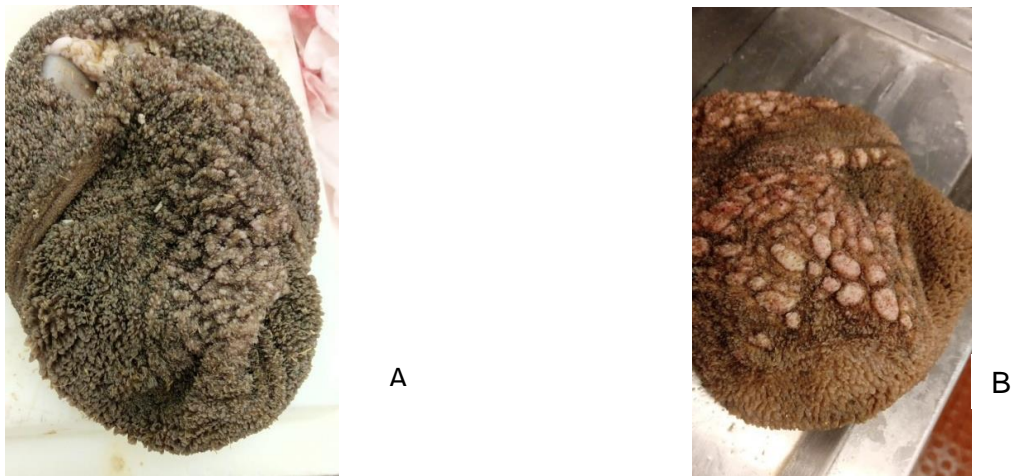


Figura 10: Aspeto das alterações da mucosa do rúmen proveniente de animais alimentados com as dietas B50 e B100. Forma mais atenuada (A) e forma mais grave (B).

Na tabela 5 são apresentados os resultados da degradabilidade da matéria orgânica e dos parâmetros fermentativos analisados *in vitro*. A DMO (g/kg) e as produções de gás total, incluindo ou não o CH₄, não foram afetadas pelos tratamentos, com valores médios de 73,6 ± 8,52 %, 188,7 ± 62,10 ml e 170,2 ± 53,0 ml. As produções de CH₄, expressas em volume total ou em percentagem do gás total, diminuíram com o aumento da inclusão de bromoil na dieta, com diferenças significativas entre tratamentos. As produções totais de gás, incluindo ou não o CH₄, quando expressas em ml/g MO degradada não foram afetadas pelos tratamentos, com valores médios de 312,8 ± 127,15 e 283,1 ± 109,70 respectivamente. A produção de CH₄ expressa no mesmo referencial foi afetada pelos tratamentos, sendo o valor obtido para o B0 superior aos obtidos para os B50 e B100 que não apresentaram diferenças entre si.

Tabela 5: Efeito do nível de inclusão de CHBr_3 obtido por imersão de *Asparagopsis taxiformis* em óleo de girassol na degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e nos parâmetros fermentativos *in vitro* individuais de borregos

	Tratamentos			EPM ⁴	P-value ⁵
	B0 ¹	B50 ²	B100 ³		
DMO ⁶ (g/kg)	642 (6,2)	684 (5,5)	682 (6,3)		0,733
Produção total de gás (mL)	211 (19,4)	159 (18,6)	202 (20,3)		0,152
Produção total de gás sem CH_4 (mL)	174 (16,9)	147 (16,3)	195 (17,6)		0,165
Produção de CH_4 (mL)	36,8 ^c (5,98)	11,8 ^b (2,34)	6,56 ^a (2,365)		0,005
Produção de CH_4 (% total)	17,4 ^c (1,92)	7,19 ^b (1,075)	3,30 ^a (1,075)		<0,001
Produção total de gás (mL/g MO degradada)	363 (46,3)	260 (42,3)	331 (45,0)		0,270
Produção total de gás sem CH_4 (mL/g MO degradada)	302 (41,9)	241 (38,3)	321 (40,4)		0,346
Produção de CH_4 (mL/g MO degradada)	61,3 ^b (12,22)	19,2 ^a (3,75)	10,6 ^a (3,80)		0,016

¹B0: 0 μg CHBr_3 /g de MS substrato; ²B50: 50 μg CHBr_3 /g de MS substrato, ³B100: 100 μg CHBr_3 /g de substrato MS, ⁴Erro Padrão da Média; ⁵Significância; ⁶Degradabilidade da matéria orgânica.

A tabela 6 apresenta os resultados da composição química da carne e do pH, obtidos após a utilização de CHBr_3 nas dietas de borregos. O pH não foi afetado pelos diferentes tratamentos, com um valor médio de $5,52 \pm 0,063$. A MS, PB e GB da carne também não foram diferentes entre tratamentos, com valores médios de $23,3 \pm 1,08$ % $19,2 \pm 0,63$ % e $2,42 \pm 0,847$ %, respectivamente.

Tabela 6: Efeito do nível de inclusão de CHBr_3 obtido por imersão de *Asparagopsis taxiformis* em óleo de girassol no pH e na composição química da carne de borregos.

	Tratamentos			EPM ⁴	P-value ⁵
	B0 ¹	B50 ²	B100 ³		
pH	5,52	5,50	5,53	0,027	0,783
Macronutrientes					
MS ⁶ (%)	23,7	23,0	23,3	0,45	0,561
PB ⁷ (%)	19,3	19,1	19,2	0,27	0,875
GB ⁸ (%)	2,14	2,68	2,45	0,346	0,389

¹B0: 0 μg CHBr_3/g de MS substrato; ²B50: 50 μg CHBr_3/g de MS substrato, ³B100: 100 μg CHBr_3/g de substrato MS, ⁴Erro Padrão da Média; ⁵Significância; ⁶Matéria seca; ⁷Proteína bruta; ⁸Gordura bruta.

Na tabela 7 são apresentados os resultados do efeito dos níveis de inclusão de CHBr_3 nas características físicas da carne. Não houve diferenças significativas para nenhum dos parâmetros da cor da carne, com valores médios de $45,3 \pm 2,09$, $16,0 \pm 1,32$, $8,91 \pm 1,22$, $18,3 \pm 1,67$ e $29,1 \pm 2,04$ para L^* , a^* , b^* , Chroma e Hue, respectivamente. As perdas de água e a força de corte também não foram afetadas pelos tratamentos, sendo as médias de $33,8 \pm 5,69\%$ e $6,24 \pm 1,372 \text{ kg/cm}^2$, respectivamente.

Tabela 7: Efeito do nível de inclusão de CHBr_3 obtido por imersão de *Asparagopsis taxiformis* em óleo de girassol nas características físicas da carne.

	Tratamentos			EPM ⁴	P-value ⁵
	B0 ¹	B50 ²	B100 ³		
Cor					
L^{*6}	45,4	45,2	45,2	0,91	0,977
a^{*7}	16,1	15,1	16,7	0,49	0,103
b^{*8}	9,10	8,28	9,33	0,492	0,311
Chroma ⁹	18,5	17,2	19,2	0,63	0,130
Hue ¹⁰	29,3	28,7	29,2	0,88	0,868
Perdas de água (%)	35,9 (1,42)	33,0 (1,40)	32,5 (3,71)		0,379
Força de corte (kg/cm ²)	6,58	6,02	6,13	0,586	0,777

¹B0: 0 μg CHBr_3/g de MS substrato; ²B50: 50 μg CHBr_3/g de MS substrato, ³B100: 100 μg CHBr_3/g de substrato MS, ⁴Erro Padrão da Média; ⁵Significância; ⁶ L^* - Luminosidade; ⁷ a^* - Índice vermelho/verde; ⁸ b^* - Índice amarelo/azul; ⁹Chroma – Saturação; ¹⁰Hue ° – Tonalidade.

Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de CHBr_3 extraído da alga AT nos parâmetros de crescimento, na qualidade das carcaças, nas emissões de metano *in vitro* e no estado sanitário de borregos em crescimento.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho experimental com borregos em crescimento em que se utilizou a suplementação de CHBr_3 veiculado em óleo, neste caso óleo de girassol (bromoil). A grande parte das publicações de trabalhos anteriores referem-se à utilização com AT liofilizada, como a forma de suplementar a dieta de ruminantes com CHBr_3 para reduzir as emissões de CH_4 . Nos trabalhos em que é indicado a concentração de CHBr_3 na AT liofilizada, pode verificar-se que os níveis de suplementação foram muito inferiores aos que usamos no presente trabalho (Chagas *et al.*, 2019; Black *et al.*, 2021) utilizaram concentrações de 20mg/kg de MO). Black *et al.* (2021) refere que estas concentrações (20mg/kg) não diminuiu a digestibilidade do alimento, nem teve efeitos negativos no consumo da dieta ou na função ruminal. As concentrações que utilizamos para a realização deste trabalho foram

baseadas na experiência adquirida pela nossa equipa em trabalhos realizados *in vitro* e já publicados (Sena *et al.*, 2024). Nesse trabalho, concluiu-se que só com níveis de suplementação acima de 75 mg de $\text{CHBr}_3/\text{kg MS}$ há efeito na redução das emissões de CH_4 e que com 150 mg de CHBr_3/kg a taxa de redução é de 87%. Admitimos que os níveis de suplementação em modelos *in vitro*, em que o suplemento é adicionado na totalidade no início de um período de incubação de 48 horas, poderá ser mais elevado ao que será necessário utilizar em condições de produção, em que o aporte de CHBr_3 ao meio ruminal é determinado pela dinâmica da ingestão de alimento ao longo de 24 horas. Daí que tenhamos optado por um nível de suplementação de 100 mg/kg de MS como nível superior e um nível intermédio de 50 mg/kg de MS.

A inclusão de bromoil na dieta reduziu a ingestão de MS, em 17 % para o tratamento B50 e em 20 % para o tratamento B100. Esta diminuição na ingestão de MS determinou os resultados obtidos para a ingestão dos diversos nutrientes. Vários autores verificaram que a suplementação com AT pode ter um impacto negativo nas performances de crescimento dos animais, devido a um impacto negativo na ingestão (Roque *et al.*, 2020; Stefenoni *et al.*, 2021). Muizelaar *et al.*, (2021) num estudo de 22 dias com 12 vacas leiteiras alimentadas com uma dieta basal onde incluíram a AT liofilizada, numa mistura de dextrose, trigo, polpa desidratada de beterraba e água (Mistura de AT), em concentrações de 67g, 133g e 333g de MS (concentração de CHBr_3 na AT de 1,26mg/kg MS) observaram a diminuição da ingestão voluntária de alimento e a rejeição da alga quando misturada com o alimento fresco, levando à perda de condição corporal. Contudo, noutros trabalhos a suplementação com AT não afetou a ingestão. Li *et al.* (2016), não encontrou efeitos sobre a ingestão nem sobre o peso vivo final quando utilizou níveis de inclusão de AT na dieta de 0, 13, 26, 58 e 80 g/dia, correspondentes a uma concentração de 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 e 3.0% da MO da dieta. Não está referida a concentração de CHBr_3 na alga. O ensaio teve a duração de 72 dias e foi realizado com machos castrados cruzados de Merino. A AT foi oferecida depois de seca em forno solar a 45 °C durante 72 horas, moída em partículas de 3 mm e misturada com sementes de tremço trituradas (veículo transportador). No entanto, os autores referem que houve animais que foram retirados do ensaio por recusarem as dietas suplementadas com os níveis mais elevados de AT. Referem também que alguns animais submetidos aos tratamentos com os níveis mais altos de suplementação nem sempre consumiram todo o concentrado que lhes foi oferecido.

De acordo com nosso conhecimento, há apenas um trabalho disponível na bibliografia em que foi utilizado um óleo enriquecido em CHBr_3 proveniente de *Asparagopsis armata* (também pertencente ao grupo das algas marinhas vermelhas)

como suplemento da dieta, neste caso de bovinos. Alvarez-Hess *et al.*, (2024) realizou um estudo com 39 vacas lactantes alimentadas com feno de ervilhaca oferecido *ad libitum* e suplementadas com 480 mg de CHBr_3 / dia, veiculado numa mistura com cereais oferecido 2 vezes por dia durante a ordenha, que correspondeu a uma proporção na MS total da dieta próxima de 17 mg de CHBr_3 / kg. O estudo teve a duração de 32 dias e nesse período não houve diminuição da ingestão nos animais suplementados com CHBr_3 . Contudo, os autores referem que os animais suplementados reduziram o consumo de concentrado e que durante o período de adaptação, ao alimento alguns animais reduziram fortemente a ingestão, tendo que ser retirados da experiência. Esta diferente aceitação das dietas pelos animais, que se traduziu numa variabilidade na ingestão individual das dietas suplementadas com AT, que foi observada pelos autores atrás citados e também neste trabalho, pode ser atribuída à menor palatabilidade das dietas com CHBr_3 , tal como foi sugerido por Stefanoni *et al.*, (2021). No caso concreto do presente trabalho, durante e depois da preparação as dietas suplementadas, B50 e B100, era evidente um odor intenso em resultado da mistura do bromoil na dieta base. Foi também evidente a variabilidade individual na reação dos animais às dietas suplementadas com CHBr_3 , já que alguns iniciavam o consumo logo após a distribuição do alimento enquanto que outros mostraram pouca recetividade ao alimento. Neste estudo, utilizaram-se dietas com elevada concentração de CHBr_3 , o que poderá tornar esta questão ainda mais contundente. Eventualmente com dietas de menor concentração, com maior incorporação de forragens, a resposta dos animais e a aceitação das dietas suplementadas possa ser diferente.

Apesar da redução da ingestão em resultado da inclusão de bromoil na dieta, o GMD e o PVA não refletiram esse efeito. No entanto, os resultados obtidos para o PCQ mostraram que houve uma redução de cerca de 16 % no tratamento B100. O baixo número repetições considerado neste trabalho (n=5) associado a uma variabilidade elevada nas taxas de crescimento talvez não tenham permitido evidenciar diferenças nas taxas de crescimento e no peso ao abate dos animais.

As emissões de gases não foram medidas diretamente no animal, mas sim através de ensaios laboratoriais *in vitro*, pelo que as conclusões do trabalho terão de considerar esta limitação. Contudo, para aproximar as condições *in vitro* às *in vivo*, nomeadamente ao rúmen dos animais vivos, utilizou-se, para cada amostra de alimento incubada no fermentador, suco de rúmen retirado de um animal que, durante o ensaio, consumiu o mesmo. O objetivo foi garantir que o inóculo de líquido ruminal usado estava perfeitamente adaptado ao alimento utilizado na incubação. De acordo com os resultados obtidos esta forma de suplementação das dietas com bromoil foi eficaz,

reduzindo substancialmente a produção de CH₄ ruminal em borregos em crescimento. O CH₄ teve uma redução de 59% no tratamento B50 e 81% no tratamento B100, em comparação com a dieta controlo B0, ($p < 0.001$). O tratamento B100 produziu menos 30,24 mL de CH₄ do que a dieta B0. Estes resultados confirmam a conclusão de Li *et al.*, (2016), de que há uma relação dose-resposta para os diferentes níveis de inclusão de CHBr₃ na redução da metanogénese em ovinos. O mesmo autor refere que a inclusão de 3% de AT liofilizada na MO reduziu em 80% a produção de CH₄ ao longo de 72 dias. Alvarez-Hess *et al.*, (2023) num estudo já referido anteriormente também obteve reduções de CH₄ entérico. O que vai ao encontro dos resultados obtidos neste estudo.

Os restantes parâmetros obtidos nas fermentações *in vitro* indicam que apesar da redução da produção de CH₄ a fermentação não foi afetada. Essa é a conclusão que se pode tirar do facto da produção total de gás com inclusão de CH₄ ou sem inclusão do CH₄ e a DMO não terem sido afetadas pelos tratamentos, o que está de acordo com o que foi referido em trabalhos anteriores realizados *in vitro* (Machado *et al.*, 2014). Segundo Sena *et al.* (2023), altas taxas de CHBr₃ podem diminuir a atividade microbiana e a produção de AGV. Apesar de neste estudo a produção dos AGV não ter sido determinada, os resultados obtidos para a produção total de gás e para a DMO não sustentam esta hipótese.

Os tratamentos não afetaram as características químicas determinadas na carne de borrego. Apesar de neste estudo terem sido utilizados borregos de raça Lacaune, os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos anteriores conduzidos no INIAV-Fonte Boa com animais de outras raças, mas em condições de produção idênticas e dietas semelhantes (Francisco *et al.*, 2020; Santos-Silva *et al.*, 2019). Os valores de GB são inferiores a 5 %, pelo que correspondem a uma carne magra, de acordo com a classificação do Food Advisory Committee (1990). Os valores determinados para o pH estão dentro dos valores normais para carne depois de atingir o *rigor mortis* (Lawrie, 2006).

A cor da carne é um fator importante que influencia a aceitação e a decisão de compra do consumidor. Os valores de L^* e a^* não foram afetados pelos tratamentos e em média foram de 45,3 e 16,0 respetivamente. Segundo Khliji *et al.* (2010), que realizaram um estudo no qual participaram 541 consumidores em duas cidades da Austrália para avaliar a relação entre a aceitabilidade e a cor da carne de borrego, concluíram que valores de L^* acima de 34 e de a^* acima de 9,5 correspondem a carnes com boa aceitação pelo consumidor. Os resultados obtidos neste estudo estão bem

acima destes limiares, o que sugere que a cor não tenha qualquer implicação na aceitação das carnes que foram produzidas.

A força de corte apresentou valores acima do esperado. Francisco *et al.* (2020), relata valores médios de 3,23 kg/cm² para animais cruzados de Merino Branco num ensaio em que utilizaram dietas completas com 40 % de incorporação de luzerna e Santos-Silva *et al.* (2019) determinaram uma força de corte média de 2,68 kg/cm², num ensaio com borregos cruzados de Merino branco. Os valores mais elevados encontrados neste trabalho poderão estar relacionados com o processamento das carcaças após o abate nos diferentes ensaios. Nos trabalhos referidos as carcaças foram mantidas durante 24 horas em câmara de refrigeração a 12 °C antes de serem refrigeradas a 2 °C. No presente trabalho, as carcaças foram diretamente refrigeradas numa câmara de 2 °C. Este procedimento poderá ter determinado o encurtamento pelo frio, principalmente dos músculos mais superficiais da carcaça, devido ao arrefecimento rápido em condições de pH elevado, o que resulta numa menor tenrura e consequentemente uma maior força de corte (Lawrie, 2006).

A utilização do bromoil, nos níveis de suplementação que foram utilizados neste trabalho, revelou não ser inócua para a saúde dos animais. A observação visual da mucosa ruminal dos animais logo após o abate, revelou a presença de alterações da zona inferior do saco ventral em 50 % dos casos nos grupos submetidos aos tratamentos B50 e B100. Este facto já tinha sido relatado por Muizelaar *et al.* (2021), que verificou anormalidades na parede ruminal de vacas leiteiras suplementadas com AT. A gravidade das situações foi variável, surgindo casos em que houve regiões com ausência ou diminuição da dimensão normal das papilas e nos casos mais graves verificou-se a presença de estruturas proliferativas, com aspeto que lembra cogumelos esponjiformes. No conjunto da bibliografia disponível encontrámos em dois trabalhos a referência a alterações da parede do rúmen, compatíveis com as que foram agora observadas, um deles realizado com bovinos leiteiros (Muizelaar *et al.*, 2021) e outro em ovinos (Li *et al.*, 2016). Segundo Li *et al.* (2016), num exame macroscópico realizado a 12 animais foi detetada uma extensa área de proliferação nodular com descoloração branco-amarelada com embotamento das papilas ruminais. Esta alteração foi evidente em 5 animais, todos eles suplementados com AT liofilizada.

A sensibilidade dos animais à toxicidade do CHBr₃ parece não ser uniforme, já que só metade dos animais revelaram alterações macroscópicas da mucosa do rúmen. Poderão haver fatores genéticos associados ao animal ou ao microbioma ou a ambos que determinem uma maior ou menor resistência a agentes químicos, neste caso ao

CHBr₃. Estas alterações no rúmen que não foram sistemáticas e surgiram em metade dos animais suplementados, certamente também terão contribuído para os efeitos encontrados ao nível da ingestão nomeadamente para a redução do grupo e para a variação no consumo individual em animais sujeitos ao mesmo tratamento.

Conclusão

Com base no estudo realizado *in vitro*, podemos concluir que:

1. A inclusão de CHBr₃ nas dietas diminuiu as emissões de CH₄, sendo a redução superior a 80 % quando a inclusão de CHBr₃ foi de 100 mg/kg MS.
2. A produção de gás total manteve-se estável em todas as dietas, que indica que as fermentações ruminais e a atividade microbiana não foram afetadas.

Este estudo não permitiu concluir que a suplementação com bromoil até 100 mg / MS da dieta tenha diminuído a taxa de crescimento, mas reduziu a ingestão para níveis de suplementação de CHBr₃ de 50 mg/kg MS, o que sugere que níveis de suplementação desta ordem possam diminuir o desempenho produtivo dos animais.

A suplementação com bromoil não afetou a qualidade das carcaças ou os parâmetros físico-químicos da qualidade da carne e não foram encontrados resíduos de CHBr₃ na carne.

A suplementação com bromoil resultou em alterações da mucosa ruminal com gravidade variável entre animais, independentemente do nível de inclusão de CHBr₃. Os resultados sugerem que haja uma elevada variabilidade individual na tolerância ao CHBr₃ e que a suplementação com 50 mg / kg MS da dieta resulte num risco para a saúde dos animais.

Como perspetivas futuras a utilização do bromoil poderá ser uma alternativa válida para a redução das emissões de CH₄ na fase de engorda de borregos e eventualmente também de novilhos. Contudo, este trabalho revelou que este suplemento não pode ser utilizado sem riscos para o bem-estar e saúde dos animais com perda de produtividade. Há que encontrar alternativas ao procedimento seguido neste trabalho que evitem ou minimizem estes aspetos.

A dose mais baixa de inclusão de CHBr₃ (50 mg/kg MS) resultou numa diminuição próxima de 60 % das emissões de CH₄, mas surgiram lesões da mucosa do

rúmen em 50 % dos borregos submetidos a este tratamento. A dieta utilizada foi uma dieta de elevada densidade, o que poderá justificar o facto das lesões se terem localizado na região ventral do rúmen.

Como perspetivas futuras, pode considerar-se:

1. A realização de novos testes com níveis mais baixos de CHBr_3 para verificar qual o efeito na redução das emissões do CH_4 e no estado sanitário dos animais, procurando encontrar um equilíbrio dose/reposta;
2. Encontrar uma forma de desodorização do bromoil, como forma de atenuar os problemas na ingestão;
3. Testar o efeito da dieta nos resultados, recorrendo a dietas com elevada incorporação de forragem em troços longos;
4. Testar o efeito da espécie nos resultados da suplementação com CHBr_3 , nomeadamente da espécie bovina;
6. Testar técnicas da suplementação em que a libertação CHBr_3 seja lenta e prolongada como forma de reduzir o efeito no rúmen.

Bibliografia

- Agência Portuguesa do ambiente (2021). Acedido em março. 17, 2023. Disponível em: Clima | Agência Portuguesa do Ambiente (apambiente.pt).
- Almeida, J., Bressan, M. C., Santos-Silva, J., Moreira, O., Bettencourt, C., & Gama, L. T. (2018). Physicochemical characteristics and sensory attributes of meat from heavy-weight Iberian and F1 Large White × Landrace pigs finished intensively or in free-range conditions. *Journal of Animal Science* 96 (7). <https://doi.org/10.1093/jas/sky181>.
- Alvarez-Hess, P. S., Thomson, A. L., Williams, S. R. O., Logan, A., Taylor, C., Singh, T., Roque, B. M., Neachtain, A. S. O., Kinley, R. D & Jacobs, J. L. (2024). The influence of feeding canola oil steeped *Asparagopsis armata* on resulting fatty acid profile and dairy processing properties of cow's milk. *Animal Feed Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115924>
- Alvarez-Hess, P. S., Jacobs, J. L., Kinley, R. D., Roque, B. M., Neachtain, A. S. O., Chandra, S. & Williams, S. R. O. (2023). Twice daily feeding of canola oil steeped with *Asparagopsis armata* reduced methane emissions of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115579>.
- American Meat Science Association (AMSA). (2012). Meat Color Measurement Guidelines. *American Meat Science Association*. 201 West Springfield Avenue, Suite 1202 Champaign, Illinois USA 61820 800-517-2672. 123pp.
- Auffret, M. D., Martinez-alvaro, M., Dewhurst, R. J., Duthie, A., Rooke, J. A., Wallace, R. J., Freeman, T. C., Stewart, R., Watsno, M & Roehe, R. (2018). Changes in rumen microbiome interaction explain the methane emissions differences in beef cattle.
- Beauchemin, K. A., Ungerfeld, E. M., Eckard, R. J. & Wang, M. (2020). Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*. doi:10.1017/S1751731119003100.
- Black, J. L., Davison, T. M., & Box, I. (2021). Methane Emissions from Ruminants in Australia: Mitigation Potential and Applicability of Mitigation Strategies. *Animals*, 11, 951.
- Brian Azzopardi (2024). Disponível em: <https://www.atlantisgozo.com/coral-sea-plants/asparagopsis-taxiformis-red-algae>. Consultado a 09 de janeiro de 2024.
- Capper, J. L., Cady, R. A., & Bauman, D. E. (2009). The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *American Society of Animal Science*. doi:10.2527/jas.2009-1781.
- Chagas, J. C., Ramin, M., & Krizsan, S. J. (2019). *In Vitro* Evaluation of Different Dietary Methane Mitigation Strategies. *Animals*. doi:10.3390/ani9121120.

- Clegg, K. M. (1956). The application of the antrona reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7, 40-44.
- Commission, E. (2011). Community scale for the classification of carcasses of ovine animals. In E. Commission (Ed.), (Vol. KF-31-10-388-EN-D). Luxembourg: Office for official publications of european communities.
- DEC-LEI n.º 113/2019. Diário da república, 1.ª série. N.º 157 de 19 de agosto de 2019. Presidência do Concelho de Ministros. Assegura a execução, na ordem jurídica nacional, do Regulamento (CE) n.º 1099/2009, relativo à occisão dos animais criados ou mantidos para a produção de alimentos, lã, peles, peles com pelo ou outros produtos, bem como à occisão de animais para efeitos de despovoamento e operações complementares.
- Dentinho, M.T.P. (1997). Valor Nutritivo da Sula (*Hedysarum coronarium L.*). Tese de Mestrado em Nutrição e Alimentação Animal. Universidade Técnica de Lisboa/ Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 112 pp.
- De Vries, M., & De Boer, I. J. M. (2010). Comparing environmental impacts for livestock products: A review of life cycle assessments. *Livestock Science*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.11.007>.
- Engelhardt, W & Hauffe, R. (1975). Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A Funktionen des Blättermagens bei kleinen *Hauswiederkäuern*. Volume 22, edição 5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1975.tb01442.x>.
- Ferreira, L. (2019). Descarbonização de gados. *Público* nº 10.546.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Food Advisory Committee, U. (1990). Report on review of food labeling and advertising. Retrieved from London.
- Francisco, A. E., Janícek, M., Dentinho, T., Portugal, A. P. V., Almeida, J. M., Alves, S. P., Fialho, L., Jerónimo, E., Bessa, R. J. B., & Santos-Silva, J. (2020). Effects of alfalfa particle size and starch content in diets on feeding behaviour, intake, rumen parameters, animal performance and meat quality of growing lambs. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107964>
- Glasson, C. R. K., Kinley, R. D., Nys, R., King, N., Adams, S. L., Packer, A. P., Svenson, J., Eason, C. T., & Magnusson, M. (2022). Benefits and risks of including the bromoform containing seaweed *Asparagopsis* in feed for the reduction of methane production from ruminants. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102673>.

- Hook, S. E., Wright, A., & McBride, B. (2010). Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. Review article. Hindawi Publishing Corporation *Archaea*. Volume 2010, Article ID 945785, 11 pages. Doi:10.1155/2010/945785.
- Hristov, A. N., Kebreab, E., Niu, M., Oh, J., Bannink, A., Bayat, A. R., Boland, T. M., Brito, A. F., Casper, D. P., Crompton, L. A., Dijkstra, J., Eugène, M., Garnsworthy, P. C., Haque, N., Hellwing, A. L. F., Huhtanen, P., Kreuzer, M., Kuhla, B., Lund, P., Madsen, J., Martin, C., Moate, P. J., Muetzel, S., Muñoz, C., Peiren, N., Powell, J. M., Reynolds, C. K., Schwarm, A., Shingfield, K. J., Storlien, T. M., Weisbjerg, M. R., Yáñez-Ruiz, D. R. & Yu, Z. (2018). Uncertainties in enteric methane inventories, measurement techniques, and prediction models. Symposium review.
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P.S., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P. J., Henderson, B., & Tricarico, J. M. (2013). Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *American Society of Animal Science*. doi:10.2527/jas2013-6583.
- ISO/FDIS 13906-2008. International Organization for Standardization (2008). Final draft international standard. Animal feeding stuffs Determination of acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents. 17pp.
- Jarrige, J., Andrieu, J., Berge, P., Bocquier, F., Brelurut, A., Coulon, J. B., Dermarquilly, C., Faverdin, P., Geay, Y., Guenguen, L., Honde, A., Jarrige, R., Journet, M., Lamand, M., Meschy, F., Michalet-Doreau, B., Micol, D., Morand-Feher, P., Petit, M., Peyraud, J. L., Prache, S., Sauvant, D., Theriez, M., Toullec, R., Toccon, J. L., Verite, R., Vermorel, M., & Wolter. (1990). Alimentacion de bovinos, ovinos y caprinos. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, 432 pp.
- Jiménez, A. (2020). Desmontando el mito de que los rumiantes son una causa importante del calentamiento global. *Sostenibilidad - Albéitar* - N°241.
- Khlijji, S., Van de Vem, R., Lamb, T. A., Lanza, M., & Hopkins, D. L. (2010). Relationship between consumer ranking of lamb colour and objective measures of colour. *Meat Science*. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.01.002.
- Kinley, R. D., Nys, R., Vucko, M. J., Machado, L. & Tomkins, N. W. (2016). The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during *in vitro* fermentation with rumen fluid. *Animal Production Science*, 2016, 56, 282–289. <http://dx.doi.org/10.1071/AN15576>.
- Lan, W & Yang, C. (2019). Ruminant methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.180>.

- Lawrie, R. A. (2006). Lawrie's Meat Science. Lawrie's. *Meat Science*, 1. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Li, X., Norman, H. C., Kinley, R. D., Laurence, M., Wilmot, M., Bender, H., & Tomkins, N. (2016). *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. *Animal Production Science*, 58(4), 681-688. doi:https://doi.org/10.1071/AN15883
- Machado, L., Magnusson, M., Nicholas A. P., Kinley, R., Nys, R., & Tomkins, N. (2016). Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity *in vitro*. *J Appl Phycol* (2016) 28:3117–3126
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N., Nys, R. & Tomkins, N. (2014). Effects of Marine and Freshwater Macroalgae on *In Vitro* Total Gas and Methane Production. *Plosone*, Volume 9.
- Magnusson, M., Vucko, M., Neoh, T. & Nys, R. (2020). Using oil immersion to deliver a naturally-derived, stable bromoform product from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis*. *Algal Research* 51.
- Menke, H. H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Moumen, A., Azizi, G., Chekroun, K., & Baghour, M. (2016). The effects of livestock methane emission on the global warming: a review. *Int. J. Global Warming*, Vol. 9, No. 2.
- Moura, A. M., Gonçalves, C. L., Ferreira, P. D. S., Côrtes, I. H. G., Cruz, D. S. G., Melgaço, F. P., Oliveira, J. P. C. A., & Diniz, T. H. F. (2015). Métodos para medir a emissão individual de metano por ruminantes Hexafluoreto de enxofre, produção de gases *in vitro*, respirometria. *Nutritime*. Vol. 12, Nº 06, nov/dez de 2015 ISSN: 1983-9006.
- Muizelaar, W., Groot, M., van Duinkerken, G., Peters, R., & Dijkstra, J. (2021). Safety and Transfer Study: Transfer of Bromoform Present in *Asparagopsis taxiformis* to Milk and Urine of Lactating Dairy Cows. *Foods*, 10(3). doi:10.3390/foods10030584
- NP EN ISO 5983-2. Norma Portuguesa. Norma Europeia. International Organization for Standardization (2009). Alimentos para animais. Determinação do teor de azoto e cálculo do teor de proteína bruta. Parte 2: Método da mineralização em bloco e destilação pelo vapor. Instituto Português da qualidade. 21pp.
- NP ISO 5984-2014. Norma Portuguesa. International Organization for Standardization (2014). Alimentos para animais. Determinação de cinza bruta. Instituto Português da qualidade. 9pp.

- NP ISO 6492-2014. Norma Portuguesa. International Organization for Standardization (2014). Alimentos para animais. Determinação do teor de gordura. Instituto Português da qualidade. 13pp.
- NP ISO 6496-2018. Norma Portuguesa. International Organization for Standardization (2018) - Alimentação para animais. Determinação da humidade e de outros teores de matérias voláteis. Instituto Português da qualidade. 12pp.
- NP EN ISO 6865-2009. Norma Portuguesa. Norma Europeia. International Organization for Standardization (2009). Alimentos para animais. Determinação do teor de celulose bruta, método com filtração intermédia. Instituto Português da qualidade. 17pp.
- NP EN ISO 16472-2013. Norma Portuguesa. Norma Europeia. International Organization for Standardization (2009). Alimentos para animais. Determinação do teor de fibra detergente neutra tratada com amilase. Instituto Português da qualidade. 21pp.
- NP 3441-2007. Norma Portuguesa. Carnes e produtos cárneos. Medição do pH. Instituto Português da qualidade. 8pp.
- NP 1614:2002. Norma Portuguesa. Carne e produtos cárneos: determinação do teor de humidade: método de referência/ Instituto Português da Qualidade. 5pp.
- Olivier, J. G. J., Van Aardenne, J. A., Dentener, F. J., Pagliari, V., Ganzeveld, L. N., & Peters, J. A. H. W. (2005). Recent trends in global greenhouse gas emissions: regional trends 1970–2000 and spatial distribution of key sources in 2000. *Environmental Sciences*, 2(2-3), 81-99. doi:<https://doi.org/10.1080/15693430500400345>
- Pörtner, H., Roberts, D., Tignor, M. M. B., Poloczanska, E., Mintenbeck, K., Alegría, A., Craig, M., Langsdorf, S., Löschke, S., Möller, V., Okem, A. & Rama, B. (2022). Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. *Intergovernmental panelo climate change [IPCC]*.
- Roque, B. M., Venegas, M., Kinley, R., Denys, R., Neoh, T. L., Duarte, T. L., Yang, X., Salwen, J. K. & Kebread, E. (2020). Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.204958>
- Regulamento (CE) N° 1249/2008 da comissão de 10 de dezembro de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Relatório do Estado do Ambiente, Portal do estado do ambiente Portugal (2023). Acedido em março. 23, 2023 disponível em: Emissões de Gases com Efeito de Estufa | Relatório do Estado do Ambiente (apambiente.pt).
- Santos-Silva, J., Alves, S., Francisco, A., Portugal, A., Almeida, J., Fialho, L., Jerónimo, E., & Bessa, R. (2020). Efeitos de uma dieta rica em fibras e pobre em amido no desempenho

de crescimento e carcaça e qualidade da carne de touros jovens da raça Alentejana. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108191>.

Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B., & Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. I. growth, carcass composition and meat quality. *Livestock Production Science*, 77, 187-194. doi:10.1016/S0301-6226(02)00059-3.

Santos-Silva, J., Francisco, A., Alves, S. P., Portugal, P., Dentinho, T., Almeida, J., Soldado, D., Jerónimo, E & Bessa, R. J. B. (2019). Effect of dietary neutral detergent fibre source on lambs growth, meat quality and biohydrogenation intermediates. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.08.015>.

Sena, F., Portugal, P. V., Dentinho, M. T., Paulos, K., Costa, C., Soares, D. M., Bessa, R. J. B. (2024). Effects of sunflower oil infusions of *Asparagopsis taxiformis* on *in vitro* ruminal methane production and biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 107(3), 1472-1484. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2023-23506>.

Sena, F., Portugal, P., Dentinho, T., Paulos, K., Costa, C., Soares, D., Oliveira, A., Ramos, H., Alves, S., Santos-Silva, J., & Bessa, R. (2023). Effects of sunflower oil infusions of *Asparagopsis taxiformis* on *in vitro* ruminal methane production and biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids. *American Dairy Science Association*. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23506>.

Stefenoni, H. A., Räisänen, S. E., Cueva, S. F., Wasson, D. E., Lage, C. F. A., Melgar, A., Fetter, M. E., Smith, P., Hennessy, M., Vecchiarelli, B., Bender, J., Pitta, D., Cantrell, C. L., Yarish, C., & Hristov, A. N. (2021). Effects of the macroalga *Asparagopsis taxiformis* and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational performance of dairy cows. *American Dairy Science Association*. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19686>.

Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., & de Haan, C. (2006). *Livestock's Long Shadow*: FAO.

Tan, S., Harris, J., Roque, B. M., Askew, S., & Kinley, R. D. (2022). Shelf-life stability of *Asparagopsis bromiform* in oil and freeze-dried powder. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-022-02876-y.

Thivend P., Fonty G., Jouany J. P., Durand M., & Gouet Ph. (1985). Le fermenteur rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 25 (4B): 729-735.

Tilley, J. M. & Terry, R. A. (1961). A two - stage technique for the *in vitro* digestion of forage drops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18.104. Determinação da Digestibilidade *In vitro* da MS, MO.

Vucko, J. M., Magnusson, M., Kinley, D. R., Villart, C. & Nys, R. (2016). The effects of processing on the *in vitro* antimethanogenic capacity and concentration of secondary metabolites of

Asparagopsis taxiformis. *Springer Science+Business Media*. DOI 10.1007/s10811-016-1004-3.

Zhu, P., Li, D., Yang, Q., Su, P., Wang, H., Heimann, K. & Zhang, W. (2021). Commercial cultivation, industrial application, and potential halocarbon biosynthesis pathway of *Asparagopsis* sp. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102319>.