ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Sabela
Al-Soufi Novo

Tese de doutoramento

# Algas mariñas como alternativa ao uso de antibióticos en coellos

Lugo, 2024

**Programa de Doutoramento en Medicina e Sanidade Veterinaria**

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA USC

TESE DE DOUTORAMENTO

# ALGAS MARIÑAS COMO ALTERNATIVA AO USO DE ANTIBIÓTICOS EN COELLOS


Autora

Sabela Al-Soufi Novo

Directores/as:

Marta López-Alonso

Javier García Alonso

Ana Paula Losada García

Titora: Marta López-Alonso



**PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA E SANIDADE VETERINARIA**

LUGO, 2024

# DECLARACIÓN DA AUTORA DA TESE

# CONFLITO DE INTERESES

**Algas mariñas como alternativa ao uso de antibióticos en coellos**

Eu, Sabela Al-Soufi Novo, con DNI 34280597V, presento a miña Tese de Doutoramento, seguindo o procedemento adecuado ao Regulamento, e declaro non presentar ningún conflito de interese en relación á tese doutoral.

En Lugo, a 6 de maio de 2024

Fdo: Sabela Al-Soufi Novo

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# DECLARACIÓN DA AUTORA DA TESE

# TESE CON EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

**Algas mariñas como alternativa ao uso de antibióticos en coellos**

Eu, Sabela Al-Soufi Novo, con DNI 34280597V, declaro que esta Tese de Doutoramento foi realizada ao amparo dun proxecto de investigación seguindo as regulacións e leis establecidas para experimentación animal pola Unión Europea (2010/63/UE) e pola lexislación española (Real Decreto 53/2013 e 1386/2018), e aprobadas polo Comité de Bioética da Universidade Politécnica de Madrid (ver anexo I). Os procedementos experimentais que implicaron o manexo de animais vivos foron realizados polo profesor Javier García (Universidade Politécnica de Madrid) e pola estudante de doutoramento (certificados no anexo I).

En Lugo, a 6 de maio de 2024

Fdo: Sabela Al-Soufi Novo

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# PUBLICACIÓNS CON CONTIDOS REPRODUCIDOS

Na presente tese reprodúcense determinados contidos das seguintes publicacións:

**Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming.**

Sabela Al- Soufi [1], Javier García [2] , Antonio Muíños [3], Marta López-Alonso [1]

[1] Departamento de Patoloxía Animal, Facultad de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España

[2] Departamento de Producción Agraria, Escola Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Agroalimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España

[3] Porto Muíños SL, 15185 Cerceda, España

Referencia da publicación: Al-Soufi, S.; García, J.; Muíños, A.; López-Alonso, M. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming. *Animals* 2022, *12*, 2346. https://doi.org/10.3390/ani12182346

Ano e revista de publicación: Animals, 2022.

Factor de impacto: 3.0 (JCR 2022)

Ranking: Q1 13/144

Categoría: Veterinary Sciences

Ao tratarse dun artigo de revisión, a contribución de S. Al-Soufi consistiu na escrita do manuscrito orixinal, así como parte da súa revisión e a elaboración das figuras.

Este artigo está publicado na revista *Animals* da editorial MDPI, de acceso aberto. Por tanto, os contidos atópanse baixo unha licenza Creative Commons (CC BY 4.0) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) e non precisan dunha autorización concreta para a súa reprodución (ver Anexo II).

Na introdución da tese aparece reproducido parte do texto adaptado, así como unha adaptación das Figuras (Fig. 1.1, 1.2 e 1.3).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition: *In Vitro* Digestibility, Caecal Fermentability, and Microbial Inhibitory Activity of Seven Macroalgae Species from Galicia (NW Spain).**

Sabela Al- Soufi [1], Nuria Nicodemus [2], María Dolores Carro [2], Marta López-Alonso [1], Marta Miranda [3*], Antonio Muíños [4], Eugenio Cegarra [5], Beatriz Vázquez-Belda [6], Herminia Domínguez [7], María Dolores [1], Noelia Flórez-Fernández [7] e Javier García [2]

[1] Departamento de Patoloxía Animal, Facultad de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España

[2] Departamento de Producción Agraria, Escola Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Agroalimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España

[3] Departamento de Anatomía, Produción Animal e Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España

[4] Porto Muíños SL, 15185 Cerceda, España

[5] De Heus Nutrición Animal, 15004 A Coruña, España

[6] Laboratorio de Hixiene, Inspección e Control de Alimentos, Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España

[7] Departamento de Enxeñaría Química, Universidade de Vigo, 32004 Ourense, España

Referencia da publicación: Al-Soufi, S.; Nicodemus, N.; Carro, M.D.; López-Alonso, M.; Miranda, M.; Muíños, A.; Cegarra, E.; Vázquez-Belda, B.; Domínguez, H.; Torres, M.D.; et al. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition: *In Vitro* Digestibility, Caecal Fermentability, and Microbial Inhibitory Activity of Seven Macroalgae Species from Galicia (NW Spain). *Agriculture* 2023, *13*, 1995. https://doi.org/10.3390/agriculture13101995

Ano e revista da publicación: Agriculture, 2023.

Factor de impacto: 3.6 (JCR 2022)

Ranking: Q1 17/88

Categoría: Agronomy

A contribución de S. Al-Soufi consistiu nas tarefas de: investigación, análise de datos, escrita do manuscrito orixinal e revisión, e elaboración de figuras.

Este artigo está publicado na revista *Agriculture* da editorial MDPI, de acceso aberto. Por tanto, os contidos atópanse baixo unha licenza Creative Commons (CC BY 4.0) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) e non precisan dunha autorización concreta para a súa reprodución (ver Anexo II).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nos métodos e nos resultados e discusión do capítulo I da tese aparece reproducido a maior parte do texto de forma adaptada, así como unha adaptación das Táboas (Tab. 4.1.2-8) e Figuras (Fig. 4.1.1).

**Consumer perception of supplementing rabbit diets with seaweed to reduce antibiotic use in rabbit production in Spain**

Sabela Al-Soufi [1], Carlota Vivero-Saavedra [2], Ana María Pernas [2], Marta Miranda [3*], Marta López-Alonso [1]

[1] Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

[2] Atoupa S. Coop. Galega Xuvenil, 27800 Vilalba, Lugo, Spain

[3] Departamento de Anatomía, Producción Animal e Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

Referencia da publicación (aceptado a día 02/04/2024): Al-Soufi S., Vivero-Saavedra C., Pernas A.M., Miranda M., López-Alonso M. 2024. Consumer perception of supplementing rabbit diets with seaweed to reduce antibiotic use in rabbit production in Spain. *World Rabbit Sci., no: ip-fp.*

Ano e revista da publicación: World Rabbit Science, 2024

Factor de impacto: 0.8 (JIF 2022)

Ranking: Q4 47/62

Categoría: Agriculture, Dairy & Animal Science

A contribución de S. Al-Soufi consistiu nas tarefas de: elaboración da enquisa, investigación, análise de datos, escrita do manuscrito orixinal e revisión, e elaboración de figuras.

Este artigo está publicado na revista *World Rabbit Science*, que pertence á Universitat Politécnica de Valencia, e é de acceso aberto. Por tanto, os contidos atópanse en aberto e non precisan dunha autorización concreta para a súa reprodución (ver Anexo II).

Nos métodos e nos resultados e discusión do capítulo VI da tese aparece reproducido a maior parte do texto de forma adaptada, así como unha adaptación das Táboas (Tab. 4.6.1 - 4.6.5) e Figuras (Fig. 4.6.1 – 4.6.7).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# AGRADECEMENTOS

Aos meus directores de tese, Marta López, Javier García e Ana Losada, o meu maior agradecemento por todas as vosas ensinanzas, polo voso apoio e paciencia comigo. Grazas por tantas horas de dedicación e por sacar sempre o mellor das cousas, pola vosa guía constante no profesional e tamén no persoal. E sobre todo grazas polo voso cariño, por compartir con tanta xenerosidade e por deixarme un recordo tan bonito destes anos.

A Marta Miranda e a Víctor Pereira, por estar sempre aí, pola vosa axuda incondicional e polo voso acompañamento agarimoso, foi unha sorte enorme tervos tan preto.

A Nuria Nicodemus e todo o equipo da UPM polo voso gran traballo e apoio, por converter as longas horas de mostraxes nunha bonita experiencia.

A Nerea, Verónica e Sandra pola paciencia e axuda, e por facer do laboratorio un lugar tan agradable.

A Manuela, Eugenio e todo o equipo de TIRAC polo voso traballo, por estar sempre dispostas e pola vosa confianza.

A Carlota e Ana pola vosa ilusión, por compartir con nós o voso bonito proxecto e polos reencontros.

Ás gandeiras e gandeiros que colaboraron neste proxecto, pola súa labor indispensable.

Á miña familia, ás miñas irmás, a Gracia e aes miñes amigues, pola vosa leda compañía e coidados no cotiá e na vida.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esta tese desenvolveuse dentro do proxecto de innovación TIRAC (“Técnicas Innovadoras para a Redución de Antibióticos en Cunicultura”), cofinanciado nun 80% polo Fondo Europeo Agrícola de Desenvolvemento Rural (FEADER) da Unión Europea e nun 20% polo Ministerio de Agricultura, Pesca e Alimentación, no marco do Programa Nacional de Desenvolvemento Rural 2014-2020. A Dirección Xeral de Desenvolvemento Rural, Innovación e Formación Agroalimentaria (DGDRIFA) é a autoridade encargada da aplicación de ditas axudas. Presuposto: 491.919,39€. Subvención total: 485.043,39 €.



# ÍNDICE

**RESUMO** ..... **14**

**RESUMEN** ..... **16**

**SUMMARY** ..... **18**

**ABREVIATURAS** ..... **20**

**1. INTRODUCIÓN** ..... **22**

**1.1. ESTADO ACTUAL DA CUNICULTURA** ..... **22**

**1.1.1. Produción cunícola en España** ..... **22**

**1.1.2. Caracterización da carne de coello** ..... **23**

**1.1.3. Problemáticas e desafíos da cunicultura** ..... **24**

1.1.3.1. O período post-desteta é crítico ..... 24

1.1.3.2. A redución do uso de antibióticos ..... 25

**1.1.4. Necesidades do sector** ..... **26**

**1.2. MACROALGAS MARIÑAS EN NUTRICIÓN ANIMAL** ..... **28**

**1.2.1. Descrición xeral das macroalgas mariñas** ..... **29**

**1.2.2. Beneficios sobre a saúde intestinal** ..... **30**

**1.2.3. Gran aporte de minerais: beneficios e limitacións** ..... **32**

**1.2.4. Efectos sobre a calidade da carne** ..... **33**

**1.2.5. Beneficios medioambientais** ..... **35**

**2. OBXECTIVOS** ..... **39**

**3. METODOLOXÍA** ..... **41**

**3.1. ESPECIES DE ALGAS MARIÑAS ESTUDADAS E PRODUTOS EMPREGADOS** ..... **41**

**3.2. DESEÑO EXPERIMENTAL** ..... **42**

**3.2.1. Caracterización das macroalgas e potenciais efectos *in vitro* sobre a saúde intestinal dos coellos** ..... **42**

**3.2.2. Probas experimentais *in vivo*** ..... **43**

3.2.2.1. Probas en granxa experimental ..... 43

3.2.2.2. Proba en granxa comercial ..... 43

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**3.3. MÉTODOS EMPREGADOS ..... 44**

**3.3.1. Capítulo I: Estudo *in vitro*: dixestibilidade, fermentabilidade cecal e actividade inhibidora microbiana de sete especies de macroalgas de Galicia. ... 44**

**3.3.1.1. Dixestibilidade *in vitro* ..... 45**

3.3.1.2. Estimación do valor nutricional ..... 45

3.3.1.3. Fermentación cecal *in vitro* e produción de AGV ..... 45

3.3.1.4. Concentracións mínimas inhibitorias (CMI) ..... 46

*3.3.1.4.1. Microorganismos aeróbicos: método de dilución en caldo .. 47*

*3.3.1.4.2. Microorganismos anaerobios: método de dilución en agar . 47*

3.3.1.5. Composición química ..... 48

3.3.1.6. Análise estatística ..... 48

**3.3.2. Capítulo II: Avaliación de macroalgas e extractos de macroalgas como fonte de minerais en múltiples sistemas de produción gandeira. ..... 50**

3.3.2.1. Preparación das mostras e análise de macro e microelementos ..... 50

*3.3.2.1.1. Dixestión ácida ..... 50*

*3.3.2.1.2. Extracción alcalina ..... 50*

*3.3.2.1.3. ICP-MS ..... 50*

3.3.2.2. Especiación de arsénico ..... 51

3.3.2.3. Cálculo do nivel máximo de inclusión de macroalgas deshidratadas e extractos en alimentación animal ..... 52

**3.3.3. Capítulo III: Inclusión de tres produtos de macroalgas nas dietas dos coellos: efectos sobre os rendementos produtivos e a saúde intestinal ..... 54**

3.3.3.2. Rendementos produtivos ..... 55

3.3.3.3. Toma de mostras ..... 55

3.3.3.4. Estudo histopatolóxico e medidas morfométricas ..... 56

3.3.3.5. Reconto de coccidios ..... 56

3.3.3.6. Illamento de *Escherichia coli* ..... 56

3.3.3.7. Determinación de *Clostridium perfringens* e *Clostridioides difficile* mediante qPCR ..... 57

3.3.3.8. Análise do microbioma ..... 57

3.3.3.9. Determinación de mucina ileal ..... 58

3.3.3.10. Análise PCR cuantitativa da expresión xénica ..... 58

3.3.3.11. Análise estatística ..... 59

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**3.3.4. Capítulo IV: Inclusión de catro produtos de macroalgas nas dietas dos coellos: efectos sobre a calidade da carne. ..... 60**

3.3.4.1. Deseño experimental ..... 60

3.3.4.2. Recollida de mostras ..... 62

3.3.4.3. Composición química e análise fisicoquímica e antioxidante da carne ..... 63

3.3.4.4. Perfil de ácidos graxos da carne ..... 63

3.3.4.5. Análise sensorial da carne ..... 63

3.3.4.6. Análise estatística ..... 64

**3.3.5. Capítulo V: Elementos esenciais e tóxicos na carne e vísceras de coellos alimentados con macroalgas. ..... 65**

3.3.5.1. Deseño experimental ..... 65

3.3.5.2. Recollida de mostras ..... 65

3.3.5.3. Preparación da mostra ..... 66

3.3.5.4. Análise de minerais ..... 66

3.3.5.5. Análise estatística ..... 67

**3.3.6. Capítulo VI: Percepción das persoas consumidoras sobre suplementar as dietas dos coellos con algas mariñas para reducir o uso de antibióticos na produción cunícola en España. ..... 68**

3.3.6.1. Deseño da enquisa ..... 68

3.3.6.2. Localización da investigación e selección da mostra ..... 69

3.3.6.3. Recollida de datos ..... 69

3.3.6.4. Análise estatística ..... 69

# 4. RESULTADOS E DISCUSIÓN ..... 71

**4.1. CAPÍTULO I: ESTUDO *IN VITRO*: DIXESTIBILIDADE, FERMENTABILIDADE CECAL E ACTIVIDADE INHIBIDORA MICROBIANA DE SETE ESPECIES DE MACROALGAS DE GALICIA. ..... 72**

**4.1.1.Composición química ..... 72**

**4.1.2. Dixestibilidade *in vitro* e contido enerxético estimado ..... 75**

**4.1.3. Produción *in vitro* de gas e AGV ..... 77**

**4.1.4. Concentracións mínimas inhibitorias ..... 83**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**4.2. CAPÍTULO II: AVALIACIÓN DE MACROALGAS E EXTRACTOS DE MACROALGAS COMO FONTE DE MINERAIS EN MÚLTIPLES SISTEMAS DE PRODUCIÓN GANDEIRA. ..... 85**

**4.2.1. Composición mineral das macroalgas deshidratadas ..... 85**

4.2.1.1. Macrominerais ..... 85

4.2.1.2. Elementos traza esenciais ..... 87

4.2.1.3. Elementos traza potencialmente tóxicos ..... 90

**4.2.2. Variación das concentracións de minerais nos extractos de macroalgas .. 92**

**4.2.3. Límites de inclusión de macroalgas deshidratadas e os seus extractos en alimentación animal ..... 94**

**4.3. CAPÍTULO III: INCLUSIÓN DE TRES PRODUTOS DE MACROALGAS NAS DIETAS DOS COELLOS: EFECTOS SOBRE OS RENDEMENTOS PRODUTIVOS E A SAÚDE INTESTINAL ..... 98**

**RESULTADOS ..... 98**

**4.3.1. Rendementos produtivos ..... 98**

**4.3.2. Efectos das macroalgas sobre os parámetros de saúde intestinal ..... 98**

4.3.2.1. Poboacións das especies bacterianas seleccionadas ..... 98

4.3.2.2. Reconto de coccidios ..... 99

4.3.2.3. Estudo histolóxico e morfométrico ..... 99

4.3.2.4. Contido de mucina bruta no íleo ..... 102

4.3.2.5. Microbioma ..... 102

4.3.2.6. Expresión de xenes de inmunidade e das proteínas de unión estreita dos enterocitos, a nivel do apéndice cecal ..... 104

**DISCUSIÓN ..... 105**

**4.4. CAPÍTULO IV: INCLUSIÓN DE CATRO PRODUTOS DE MACROALGAS NAS DIETAS DOS COELLOS: EFECTOS SOBRE A CALIDADE DA CARNE. ..... 110**

**4.4.1. Composición química e propiedades fisicoquímicas e antioxidantes da carne ..... 110**

**4.4.2. Perfil de ácidos graxos da carne ..... 112**

**4.4.3. Análise sensorial da carne ..... 115**

**4.5. CAPÍTULO V: ELEMENTOS ESENCIAIS E TÓXICOS NA CARNE E VÍSCERAS DE COELLOS ALIMENTADOS CON CATRO PRODUTOS DE MACROALGAS. ..... 117**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**4.5.1. Macrominerais** ..... **117**
**4.5.2. Microminerais** ..... **120**
**4.5.3. Elementos tóxicos** ..... **124**
**4.5.4. Interaccións entre elementos** ..... **126**
**4.6. CAPÍTULO VI: PERCEPCIÓN DAS PERSOAS CONSUMIDORAS SOBRE SUPLEMENTAR AS DIETAS DOS COELLOS CON ALGAS MARIÑAS PARA REDUCIR O USO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUCIÓN CUNÍCOLA EN ESPAÑA.** ..... **128**
**4.6.1. Características socio-demográficas e hábitos xerais de consumo** ..... **128**
**4.6.2. Perfil das persoas consumidoras de carne de coello** ..... **130**
**4.6.3. Características positivas e negativas da carne de coello** ..... **132**
**4.6.4. Consumo de algas** ..... **134**
**4.6.5. Disposición a consumir carne de coello alimentada con algas** ..... **136**
**4.6.6. Beneficios de incluír algas na alimentación do coello** ..... **140**
**5. CONCLUSIÓNS** ..... **142**
**BIBLIOGRAFÍA** ..... **145**
**ANEXOS** ..... **170**
**ANEXO I: APROBACIÓN DO COMITÉ DE BIOÉTICA E CERTIFICADOS DE CAPACITACIÓN.** ..... **170**
**ANEXO II: LISTA DE VERIFICACIÓN ARRIVE PARA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.** ..... **174**
**ANEXO III: PERMISOS PARA REPRODUCIR CONTIDOS PUBLICADOS** ..... **178**
**ANEXO IV: PUBLICACIÓNS DERIVADAS DA TESE DE DOUTORAMENTO** ..... **179**
**PUBLICACIÓN 1.** ..... **180**
**PUBLICACIÓN 2.** ..... **196**
**PUBLICACIÓN 3.** ..... **216**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# RESUMO

O sector cunícola ven enfrontando numerosos retos nos últimos anos que o sitúan nunha situación crítica que precisa de solucións urxentes. As problemáticas do sector veñen dadas principalmente pola redución gradual do consumo de carne de coello e polo aumento da mortalidade nas granxas, especialmente na fase de cebo. Isto débese á dificultade de manter a saúde intestinal dos cazapos no momento da desteta, cando son moi susceptibles de padecer enfermidades gastrointestinais. As recentes restricións no uso de antibióticos de forma profiláctica en alimentación animal dificultan o control destas enfermidades, polo que o sector se atopa ante un incremento das mortalidades e unha falta de alternativas. Nos últimos anos realizáronse numerosos esforzos por desenvolver estratexias nutricionais que mellorasen a saúde intestinal dos coellos, mais até o momento estas non foron capaces de controlar totalmente a aparición de certas enfermidades, e por tanto é preciso procurar novas alternativas. O uso de macroalgas mariñas en alimentación animal aparece como unha oportunidade prometedora para mellorar a saúde intestinal dos cazapos, debido aos potenciais beneficios que xa demostraron ter noutras especies animais como en porcino, sector que sofre problemáticas similares ao cunícola. As macroalgas presentan unha composición moi variada e única, moi diferente á dos ingredientes empregados en nutrición animal. Presentan unha elevada cantidade de fibra soluble, potencialmente fermentable como prebiótico, así como altos contidos en minerais como o iodo. O obxectivo principal deste estudo foi avaliar o emprego de macroalgas mariñas nas dietas dos coellos durante o período post-desteta, co fin último de mellorar a súa saúde intestinal e servir de alternativa ao uso de antibióticos. Para elo, caracterizáronse *in vitro* as propiedades de diversas algas mariñas e os seus extractos, determinouse o seu perfil mineral para calcular as doses máximas de inclusión na dieta e avaliáronse *in vivo* os potenciais efectos sobre a saúde intestinal dos coellos. Paralelamente, estudáronse os efectos sobre a calidade da carne e sobre a deposición de minerais na carne e nas vísceras dos coellos, e realizouse unha enquisa á poboación do concello de Lugo para estudar a potencial aceptabilidade deste tipo de produtos. O estudo *in vitro* das macroalgas mostrou unha elevada fermentabilidade, e por tanto un potencial prebiótico, de todos os produtos derivados da alga parda *Saccharina latissima*, mentres que os produtos derivados de *Himanthalia elongata* produciron elevadas concentracións de butirato, o cal proporcionaría beneficios sobre a saúde intestinal. A maior parte das macroalgas demostraron ser unha moi boa fonte de macrominerais, aportando cantidades maiores que as da maioría dos ingredientes empregados en nutrición animal; e certas especies de algas pardas -*Saccharina latissima* e *Laminaria ochroleuca*- presentaron moi elevadas cantidades de iodo, o cal resultou ser o principal mineral limitante á hora de incluír estas especies nos pensos animais. A maior parte das macroalgas mostraron elevados niveis de arsénico, se ben todas elas presentaron niveis mínimos de arsénico inorgánico, de elevada toxicidade, polo que o seu emprego non suporía un risco para os animais. Dentro das macroalgas incluídas nas probas *in vivo*, *S. latissima* mostrou resultados positivos sobre a saúde intestinal dos coellos, ao reducir os recontos de coccidios e aumentar a altura das vilosidades no xexuno. As algas probadas *in vivo* non produciron ningún efecto negativo sobre a calidade da carne ou sobre as propiedades sensoriais do produto; e a inclusión da alga verde *Ulva* spp.

USC DE COMPOSTELA

mellorou o perfil de ácidos graxos da carne. O elevado contido de iodo das macroalgas pardas foi transferido á carne dos coellos alimentados con estas especies, o que sería de grande interese en zonas con deficiencia de iodo endémica; mentres que os residuos de arsénico na carne e nas vísceras foron mínimos. A aceptación deste tipo de produto por parte da poboación enquisada foi moi elevado, polo que este tipo de dieta podería ser potencialmente empregada como estratexia de "marketing" para incrementar o consumo de carne de coello por parte de persoas preocupadas pola sustentabilidade medioambiental, xa que fomentaría a economía circular ao empregar os descartes xerados na produción de macroalgas para alimentación humana.

**Palabras clave**: macroalgas, nutrición do coello, alternativas aos antibióticos, saúde intestinal, minerais, iodo, arsénico, calidade da carne, consumo de carne.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# RESUMEN

El sector cunícola se ha enfrentado en los últimos años a numerosos retos que lo sitúan en una situación crítica que necesita soluciones urgentes. Los problemas del sector se deben principalmente a la reducción gradual del consumo de carne de conejo y al aumento de la mortalidad en las granjas, especialmente en la fase de cebo. Esto se debe a la dificultad de mantener la salud intestinal de los gazapos en el momento del destete, cuando son muy susceptibles a padecer enfermedades gastrointestinales. Las recientes restricciones al uso profiláctico de antibióticos en la alimentación animal dificultan el control de estas enfermedades, por lo que el sector se enfrenta a un aumento de la mortalidad y a la falta de alternativas. En los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos para desarrollar estrategias nutricionales que mejoren la salud intestinal de los conejos, pero hasta el momento estas no han logrado controlar del todo la aparición de determinadas enfermedades, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas. El uso de macroalgas marinas en la alimentación animal aparece como una prometedora oportunidad para mejorar la salud intestinal de los gazapos, debido a los potenciales beneficios que ya han demostrado tener en otras especies animales como el porcino, sector que sufre problemáticas similares al cunícola. Las macroalgas tienen una composición muy variada y única, muy diferente a la de los ingredientes utilizados en nutrición animal. Tienen una elevada cantidad de fibra soluble, potencialmente fermentable como prebiótico, así como altos niveles de minerales como el yodo. El principal objetivo de este estudio fue evaluar el uso de macroalgas marinas en la dieta de conejos durante el periodo post-destete, con el objetivo final de mejorar su salud intestinal y servir como alternativa al uso de antibióticos. Para ello, se caracterizaron *in vitro* las propiedades de diversas algas y sus extractos, se determinó su perfil mineral para calcular los niveles máximos de inclusión en la dieta y se evaluaron *in vivo* los potenciales efectos sobre la salud intestinal de los conejos. Paralelamente se estudiaron los efectos sobre la calidad de la carne y sobre el depósito de minerales en la carne y vísceras de los conejos, y se realizó una encuesta entre la población del municipio de Lugo para estudiar la potencial aceptabilidad de este tipo de producto. El estudio *in vitro* de las macroalgas mostró una alta fermentabilidad, y por tanto un potencial prebiótico, de todos los productos derivados del alga parda *Saccharina latissima*, mientras que los productos derivados de *Himanthalia elongata* produjeron altas concentraciones de butirato, lo que proporcionaría beneficios para la salud intestinal. La mayoría de las macroalgas demostraron ser una muy buena fuente de macrominerales, aportando cantidades mayores que la mayoría de los ingredientes utilizados en la nutrición animal; y ciertas especies de algas pardas -*Saccharina latissima* y *Laminaria ochroleuca*- presentaron cantidades muy elevadas de yodo, que resultó ser el principal mineral limitante a la hora de incluir estas especies en alimentación animal. La mayoría de las macroalgas mostraron niveles elevados de arsénico, aunque todas ellas mostraron niveles mínimos de arsénico inorgánico, de alta toxicidad, por lo que su uso no supondría un riesgo para los animales. Entre las macroalgas incluidas en las pruebas *in vivo*, *S. latissima* mostró resultados positivos sobre la salud intestinal de los conejos, al reducir el recuento de coccidios y aumentar la altura de las vellosidades en el yeyuno. Las algas probadas *in vivo* no produjeron ningún efecto negativo sobre la calidad de la carne ni

USC DE COMPOSTELA

sobre las propiedades sensoriales del producto; y la inclusión del alga verde *Ulva* spp. mejoró el perfil de ácidos grasos de la carne. El alto contenido en yodo de las macroalgas pardas se transfirió a la carne de los conejos alimentados con estas especies, lo que sería de gran interés en zonas con deficiencia endémica de yodo; mientras que los residuos de arsénico en la carne y las vísceras fueron mínimos. La aceptación de este tipo de productos por parte de la población encuestada fue muy alta, por lo que este tipo de dieta podría ser potencialmente utilizada como estrategia de "marketing" para incrementar el consumo de carne de conejo por parte de personas preocupadas por la sostenibilidad ambiental, ya que fomentaría la economía circular mediante el aprovechamiento de los descartes generados en la producción de macroalgas para consumo humano.

**Palabras clave:** macroalgas, nutrición de conejos, alternativas a los antibióticos, salud intestinal, minerales, yodo, arsénico, calidad de la carne, consumo de carne.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## SUMMARY

The cuniculture sector has been facing numerous challenges in recent years that place it in a critical situation that needs urgent solutions. The challenges in the sector are mainly derived from the gradual reduction in the consumption of rabbit meat and the increase in mortality in farms, especially in the growing phase. This is due to the difficulty of maintaining the gut health of rabbits at the post-weaning period, when they are very susceptible to gastrointestinal diseases. The recent restrictions on the prophylactic use of antibiotics in animal feed make it difficult to control these diseases, and therefore these productions are facing an increase in mortality and a lack of alternatives. In recent years, numerous efforts have been made to develop nutritional strategies that improve the gut health of rabbits, but so far these have not been able to totally control the appearance of certain diseases, and therefore it is necessary to search for new alternatives. The use of marine macroalgae in animal feed appears as a promising opportunity to improve the gut health of post-weaning rabbits, due to the potential benefits that they have already demonstrated in other animal species such as pigs, a sector that suffers from similar problems as rabbit farming. Macroalgae have a very variable and unique composition, very different from that of the ingredients used in animal nutrition. They have a high amount of soluble fiber, potentially fermentable as a prebiotic, as well as high levels of minerals such as iodine. The main objective of this study was to evaluate the use of marine macroalgae in the diets of rabbits during the post-weaning period, with the aim of improving their gut health and serve as an alternative to the use of antibiotics. For this, the properties of various macroalgae and their extracts were characterized *in vitro*, their mineral profile was determined to calculate the maximum levels of inclusion in the diet and the potential effects on the gut health of rabbits were evaluated *in vivo*. At the same time, the effects on the meat quality and on the deposition of minerals in the meat and viscera of rabbits were studied, and a survey was carried out among the population of the municipality of Lugo to study the potential acceptability of this type of product. The *in vitro* study of macroalgae showed a high fermentability, and therefore a prebiotic potential, of all the products derived from the brown algae *Saccharina latissima*, while the products derived from *Himanthalia elongata* produced high concentrations of butyrate, which would provide gut health benefits. Most macroalgae have demonstrated to be a very good source of macrominerals, providing greater amounts than most of the ingredients used in animal nutrition; and certain species of brown algae - *Saccharina latissima* and *Laminaria ochroleuca* - presented very high amounts of iodine, which appeared to be the main limiting mineral when including these species in animal feed. Most of the macroalgae showed high levels of arsenic, although all of them showed minimal levels of inorganic arsenic, of high toxicity, so their use would not pose a risk to animals. Among the macroalgae included in the *in vivo* trials, *S. latissima* showed positive results on the gut health of rabbits, by reducing coccidia recounts and increasing villi height in jejunum. The macroalgae tested *in vivo* did not produce any negative effect on meat quality or on the sensory properties of the product; and the inclusion of the green algae *Ulva* spp. improved the fatty acid profile of the meat. The high iodine content of brown macroalgae was transferred to the meat of rabbits fed with these species, which would be of great interest in areas with endemic iodine deficiency; while arsenic residues in meat and offal

USC
DE COMPOSTELA

were minimal. The acceptance of this type of product by the surveyed population was very high, so this type of diet could potentially be used as a marketing strategy to increase the consumption of rabbit meat by consumers concerned about environmental sustainability, since it would promote the circular economy by using the discards generated in the production of macroalgae for human consumption.

**Keywords**: macroalgae, rabbit nutrition, alternatives to antibiotics, gut health, minerals, iodine, arsenic, meat quality, meat consumption.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# ABREVIATURAS

**AGV:** ácidos graxos volátiles

**As:** arsénico

**AsB:** arsenobetaína

**BRICS (países):** Brasil, Rusia, India, China e Sudáfrica

**Ca:** calcio

**Cd:** cadmio

**CDE:** dixestibilidade fecal aparente da enerxía bruta

**CDMS:** dixestibilidade fecal aparente da materia seca

**CDMSiv:** dixestibilidade fecal *in vitro* da materia seca

**CDPBiv:** dixestibilidade fecal *in vitro* da proteína bruta

**CLDN: claudina**

**CMI:** concentracións mínimas inhibitorias

**CMDA**: consumo medio diario de alimento

**Co:** cobalto

**Cu:** cobre

**DMA:** ácido dimetilarsínico

**EEC:** enteropatía epizoótica do coello

**EEM**: erro estándar da media

**ED:** enerxía dixerible

**Fe:** ferro

**FAD:** fibra ácido deterxente

**FDT:** fibra dietética total

**FS:** fibra soluble

**FND:** fibra neutro deterxente

**GMD**: ganancia media diaria

**Hg:** mercurio

**HPLC:** cromatografía líquida de alto rendemento

USC DE COMPOSTELA

**I:** iodo

**IC**: índice de conversión

**ICP-MS:** espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente

**JAM:** junctional adhesion protein

**K:** potasio

**LAD:** lignina ácido deterxente

**LD:** limite de detección

**LL:** músculo *longissimus lumborum*

**Mg:** magnesio

**Mn:** manganeso

**Mo:** molibdeno

**MS:** materia seca

**MUFA:** ácidos graxos monoinsaturados

**Na:** sodio

**NRC:** National Research Council

**n-3:** ácidos omega-3

**n-6:** ácidos omega-6

**OCLN**: ocludina

**PB:** proteína bruta

**Pb:** chumbo

**PUFA:** ácidos graxos poliinsaturados

**S:** xofre

**Se:** selenio

**TNF-α:** factor de necrose tumoral alfa

**UE:** Unión Europea

**Zn:** zinc

**ZO**: zonula occludens

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 1. INTRODUCIÓN

## 1.1. ESTADO ACTUAL DA CUNICULTURA

### 1.1.1. Produción cunícola en España

O sector cunícola en España, ao igual que na maior parte dos países produtores, é minoritario comparado co resto de producións animais cárnicas, xa que é unha carne menos común e menos consumida que outras como o polo, o porco ou a tenreira. Aínda así, a carne de coello é moi valorada nos países mediterráneos, onde o seu consumo ven desde tempos moi antigos e segue a formar parte da súa gastronomía tradicional [1]. A Unión Europea (UE) é o terceiro produtor mundial de carne de coello [2], despois de China, sendo España, Francia e Italia os principais países produtores [3]. Nestes países a cría de coellos foi sempre moi común na agricultura familiar, ata que a partir da década de 1970 a produción cunícola intensiva popularizouse e derivou nunha industria altamente especializada e técnica, aínda que a día de hoxe conviven ambos tipos de producións e existen aínda pequenas explotacións en proceso de modernización [3,4].

O coello é considerado unha especie ideal para a produción de carne, debido ás súas características produtivas: ten un ciclo de vida e un período de xestación curtos, é moi prolífico e ten unha gran capacidade para converter forraxes en proteína. Isto débese á súa fisioloxía dixestiva, altamente eficiente, que lle permite aproveitar os nutrientes da dieta a través da súa fermentación no cego e a cecotrofia [5].

A produción cunícola maioritaria é a intensiva, onde as femias reprodutoras son aloxadas en gaiolas individuais, mentres que os cazapos en período de cebo son aloxados en gaiolas colectivas, de acordo cos estándares establecidos pola UE (Directiva CE 98/58). A diferenza doutras producións como a avicultura ou o porcino, as explotacións cunícolas non soen estar integradas senón que son independentes [3]. Os animais non teñen acceso ao exterior e son alimentados a base de pensos industriais, nalgúns casos empregando un único tipo para as nais e os cazapos, e cada vez máis, empregando formulacións diferentes para cada fase produtiva.

As características das explotacións cunícolas en España foron estudadas recentemente mediante unha enquisa realizada a 88 produtores de Galicia, Castela e León, Navarra e outras rexións do país [6]. Segundo estes datos, unha importante proporción das granxas ten un tamaño de máis de 1200 reprodutoras (31%), aínda que as segundas máis frecuentes son aquelas dun tamaño medio, entre 500 e 800 reprodutoras. A maior parte das explotacións teñen unha antigüidade de máis de 10 anos (91%) e están xestionadas por un titular de entre 40-60 anos. Sobre o 60% das explotacións contan cun sistema de ventilación forzado, mentres que só a metade contan con sistema de calefacción. En canto ao manexo produtivo, a maior parte delas realizan inseminación artificial con compra de seme ao exterior (95%), e o 90% delas emprega xa tres ou máis tipos de pensos adaptados ás diferentes fases do ciclo produtivo. As reprodutoras insemínanse aos 11 días post-parto na maior parte dos casos (89%), seguindo un réxime intensivo; realizan a desteta dos cazapos aos 32-35 días de vida (64%), aínda que sobre un 20%

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

levan a cabo unha desteta precoz con menos de 32 días e outro 20% unha desteta tardía aos 35-38 días de vida. A idade media ao sacrificio é de 62-65 días na metade das explotacións, mentres que noutro 40% é realizado con 66-70 días. O peso vivo medio ao sacrificio é de 2-2,30 kg na maior parte das explotacións. A práctica do baleiro sanitario en cada ciclo é realizada case no 70% das explotacións. As maiores taxas de mortalidade na explotacións atópanse no niño, de ata o 10% dos cazapos na maior parte delas. No cebo, a mortalidade é algo menor, de ata o 7% dos cazapos. O custo medio de produción máis habitual é superior a 1,85€/kg.

Segundo os propios produtores [6], as patoloxías máis frecuentes nas explotacións cunícolas son as dixestivas, seguidas de preto polas respiratorias. Dentro das enfermidades dixestivas, a Enteropatía Epizoótica do Coello (EEC) é a que máis perdas económicas xera nas explotacións, seguida pola colibacilose, as cales afectan maioritariamente aos cazapos na post-desteta. Estas patoloxías están asociadas a mortalidades elevadas, de máis do 10% no cebo.

### 1.1.2. Caracterización da carne de coello

A carne de coello é unha carne branca de moi alta calidade, debido ás súas excelentes propiedades nutritivas e dietéticas [1,7]. O seu contido en proteínas é elevado (aproximadamente dun 22%) e presenta altos niveis de aminoácidos esenciais. Contén moi pouca cantidade de graxa, e ademais o seu perfil de ácidos graxos é considerado como moi saudable, xa que presenta niveis moi baixos de colesterol e de ácidos graxos saturados (SFA), moito menores que a maior parte das carnes, e ao mesmo tempo é moi rica en ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (60% do total de ácidos graxos), os cales se atopan ben equilibrados entre as series de omega-3 (*n*-3) e omega-6 (*n*-6). Esta carne é tamén unha fonte moi rica en minerais como o potasio (K), o fósforo (P), o magnesio (Mg) e o selenio (Se), mentres que o nivel de sodio (Na) é moi reducido comparado con outras carnes. Tamén é considerada como unha das maiores fontes de vitamina B12, entre outras vitaminas [3,8,9]. Estas características fan que esta carne sexa recomendada nas dietas baixas en colesterol, nas reducidas en sal, naquelas que buscan un alto contido de proteínas e tamén como unha fonte rica de vitamina B12 [7].

A carne de coello presenta un sabor moi característico e intenso, e en moitos casos o seu consumo está asociado a reunións familiares e festividades, polo que o seu consumo soe ser máis reducido que outras carnes (<3% de toda a carne consumida na UE) [3], entre outras razóns. Algunhas desvantaxes desta carne son o seu prezo, algo maior ca outras carnes brancas; e certas particularidades "tecnolóxicas" que dificultan a preparación de produtos de maior procesado ou certas receitas, xa que é unha carne máis seca e fibrosa polo baixo contido en graxa, e ademais presenta numerosos ósos de pequeno tamaño e moi débiles [1].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 1.1.3. Problemáticas e desafíos da cunicultura

A industria cunícola enfróntase a un período crítico e complexo que está caracterizado por certas debilidades estruturais nos sistemas de produción e pola redución gradual do consumo de carne de coello [3]. Unha das maiores problemáticas actuais no sector é a dificultade de manter a saúde dos coellos no momento da desteta, principalmente pola grande incidencia de certas enfermidades gastrointestinais que tradicionalmente eran controladas por medio de antibióticos incluídos nos propios pensos, práctica que actualmente foi moi limitada (Regulamento (CE) 1831/2003). A maiores, esta carne está a sufrir un forte descenso no seu consumo, ao tempo que unha parte da sociedade non acepta a forma en que estes animais son criados, xeralmente en gaiolas; engadido á crecente percepción dos coellos como mascotas.

#### 1.1.3.1. O período post-desteta é crítico

Un dos momentos máis críticos en cunicultura é o período post-desteta, debido aos numerosos cambios que os animais experimentan e a sensibilidade asociada a este período [10]. A desteta prodúcese normalmente arredor dos 35 días de idade, aínda que o alimento sólido comeza a incorporarse gradualmente á súa dieta desde o día 15. Durante este período teñen lugar cambios fisiolóxicos importantes debido ao rápido cambio desde unha dieta exclusivamente baseada en leite ata a inxestión de grandes cantidades de alimento sólido e auga. Esta transición vai acompañada de numerosas adaptacións fisiolóxicas dos sistemas dixestivo e inmunitario, que deben responder a esta nova dieta [11]. O sistema dixestivo transfórmase a varios niveis: o pH gástrico descende de forma brusca de >5 a 1,6 durante a desteta; a cecotrofia comeza a desenvolverse ás 3 semanas de idade; a microbiota intestinal evoluciona de forma continua desde os primeiros dias de vida [12]; e por conseguinte, a fermentación comeza no cego. O sistema enzimático e por tanto a capacidade dixestiva desenvólvense gradualmente, alcanzando os niveis óptimos aos 45-50 días de idade. A actividade fermentativa do microbioma produce ácidos graxos volátiles (AGV), que contribúen á súa vez a modificar as condicións dixestivas [11,13].

O microbioma dixestivo e a mucosa intestinal (células epiteliais e tecidos linfoides asociados ó intestino (GALTs)) manteñen un equilibrio dinámico que é particularmente fráxil en coellos recen destetados. O microbioma estabilízase aos 30-40 días de idade e está enormemente influenciado pola dieta [10], e proporciona numerosos beneficios para o animal ademais de aportar un adecuado perfil de ácidos graxos e AGV. Este actúa como unha barreira ante patóxenos ao previr a súa entrada ás células epiteliais, competindo polos recursos e producindo substancias que manteñen un ambiente desfavorable, como AGV e substancias antimicrobianas. O microbioma tamén é decisivo para o desenvolvemento da inmunidade dixestiva, xa que determina o repertorio primario de anticorpos nos GALTs ás 4-8 semanas de vida [10].

Neste período, os coellos son moi susceptibles a sufrir unha disbiose intestinal, que moi frecuentemente está causada pola Enteropatía Epizoótica do Coello (EEC), un síndrome que xa

fora descrito hai varias décadas [14]. Máis recentemente, a EEC apareceu en Francia en 1996 e rapidamente se estendeu a outras rexións de Europa [15,16], sendo hoxe en día unha das patoloxías máis importantes en cunicultura [17,18]. Esta enfermidade causa unha morbilidade de ata o 90% e taxas elevadas de mortalidade (30-80%), e afecta sobre todo a coellos novos no período de engorde, entre as 6-8 semanas de idade [15,19]. Os coellos son infectados de forma horizontal por vía oral-fecal e por contacto oral-oral [19]. Os animais afectados reducen a súa inxestión de alimento e de auga e presentan un abdome distendido e unha diarrea moderada [15,19,20]. Na necropsia obsérvase impactación cecal e distensión do estómago e o intestino delgado, que se atopan cheos de líquido e gas. A nivel de histoloxía, existen signos de inflamación e conxestión [19], os cales non son observados macroscópicamente en ningún órgano [15]. Ata hoxe, non se identificou unha especie bacteriana como a única causante desta enfermidade, se non que na maioría de casos aparecen implicadas cepas específicas de *Clostridium perfringens*, mentres que outras parecen participar no control dos efectos negativos da EEC, como é o caso de cepas específicas de *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides dorei* [20]. Hoxe en día, a etioloxía desta síndrome aínda non está completamente definida, e non se descarta que exista unha participación ou co-infección de diferentes especies bacterianas [18].

A elevada mortalidade e o descenso na produtividade dos animais que está asociada coa ECC causan perdas de grande importancia nas granxas cunícolas [16–18,21]. Durante as últimas décadas, esta enfermidade foi controlada a base de antibióticos, na maioría dos casos en forma de pensos medicamentosos [20]. Sen embargo, os antibióticos non só afectan aos patóxenos senón tamén ao conxunto da microbiota, o que causa un desequilibrio e unha disbiose intestinal [19,22].

#### 1.1.3.2. A redución do uso de antibióticos

A redución do uso de antibióticos para previr a aparición de resistencias converteuse nunha prioridade para a UE, que nos últimos anos restrinxiu o seu uso indiscriminado como profilácticos e como promotores do crecemento en produción animal (Regulamento CE 1831/2003, sobre uso profiláctico de antibióticos e RE 2019/6 sobre medicamentos veterinarios). Ademais, a nivel nacional tamén se levaron a cabo accións encamiñadas a reducir o seu uso ("Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos" (PRAM) e Programa REDUCE, específico de cunicultura), o cal supuxo un gran reto para a produción cunícola. Esta produción, ao igual que a produción porcina, era altamente dependente do uso de pensos medicamentosos para controlar as altas taxas de mortalidade causadas pola ECC no período post-desteta [20]. Sen embargo, a falta de alternativas aos antibióticos está causando actualmente enormes perdas nas granxas, facendo que estas produción sexan practicamente insostibles economicamente [18,23].

A investigación sobre alternativas aos antibióticos en cunicultura é reducida comparada coa existente noutros sectores máis predominantes como o porcino ou a avicultura. En consecuencia, a cunicultura enfróntase ao gran desafío de atopar estratexias para manter as súas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

producións sen o emprego de antibióticos. Neste senso, é moi importante coñecer os requirimentos de manexo e dietéticos dos coellos no período post-desteta, para asegurar un equilibrio intestinal [11,24].

1.1.3.3. Descenso no consumo de carne de coello

A maiores dos problemas intrínsecos do sector cunícola, este enfróntase a unha redución gradual e constante do consumo de carne de coello en España e na maior parte dos países consumidores desta carne [3]. Esta redución no consumo débese a numerosos factores que xa foran descritos por autores dos diferentes países de tradición cunícola [1,25,26]. Por un lado, o seu consumo entre persoas novas é cada vez máis reducido, nalgúns casos debido á falta de costume na familia e noutros debido ao cambio de percepción sobre o coello, o cal é visto cada vez máis como unha mascota en lugar de como un animal destinado á produción de carne [3,27]. Ademais, actualmente esta carne segue sendo comercializada na maior parte dos casos en forma de canal completa, frecuentemente sen retirar a cabeza, o cal choca coa crecente idea deste animal como mascota e por tanto é rexeitado por algunhas persoas. Esta forma de comercialización tamén é relacionada con formas de preparación tradicionais que na actualidade non son coñecidas nin preferidas por moitas persoas, que cada vez máis buscan outro tipo de produtos máis adaptados á cociña moderna, máis rápida e práctica [1]. Este tipo de produtos a base de carne de coello van aparecendo paulatinamente nos puntos de venda, mais seguen sendo pouco frecuentes e coñecidos. Esta carne tamén é máis cara que outras carnes brancas como o polo ou o pavo, e o seu sabor máis intenso non é aceptado por algunhas persoas [1].

A maiores, a produción intensiva en gaiolas, como é o caso da maior parte da produción cunícola, é cada vez máis rexeitada pola sociedade, que está cada vez máis concienciada e preocupada polo benestar animal [26] e polo impacto ambiental deste tipo de producións, que son altamente dependentes de insumos externos [9].

Debido a estas razóns, o consumo de carne de coello en países tradicionalmente cunícolas, como España, Italia ou Francia, está a descender de forma importante, o que derivou en numerosas accións que tratan de incrementar o seu consumo, principalmente a través da divulgación dos beneficios para a saúde que proporciona esta carne, da difusión de receitas variadas e da promoción de novos produtos derivados da carne de coello [28].

### 1.1.4. Necesidades do sector

O sector da cunicultura precisa con urxencia un plan integral para dar resposta a todos estes retos. É necesario atopar sistemas de produción alternativos e economicamente sostibles, de acordo cos estándares de benestar emerxentes, incorporando á súa vez estratexias dietéticas que permitan mellorar a saúde intestinal dos coellos tras a desteta.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se ben as posibles melloras na dieta dos animais son un punto chave na redución da incidencia de patoloxías intestinais e doutros tipos, estas estratexias deberían vir sempre acompañadas dun manexo adecuado e de melloras nas instalacións das granxas cunícolas, como foi identificado polos propios produtores do sector [6]. Desta forma, existen certas prácticas que melloran o estado sanitario das explotacións e reducen as mortalidades, como son o baleiro sanitario, o emprego de ventilación forzada e a calefacción. Ademais, algunhas medidas de manexo como a desteta a idades tardías, para contar cunha maior madurez intestinal dos cazapos, e unha diminución da presión reprodutiva dos animais, serían tamén vantaxosas á hora de mellorar a súa saúde, se ben isto podería reducir en certo grao a rendibilidade das explotacións [6].

A restrición do uso de antibióticos produciu unha demanda crecente ás industrias dedicadas á nutrición animal de atopar estratexias nutricionais alternativas que permitisen mellorar a saúde intestinal dos animais, o cal demostrou ter unha grande importancia en coellos durante o período post-desteta. Así, a alimentación debe estar deseñada e adaptada á fisioloxía dixestiva dos coellos no momento da desteta, que está en proceso de desenvolvemento con numerosos cambios ocorrendo na microbiota intestinal. O desenvolvemento e a capacidade dixestiva dos cazapos dependen da dieta aportada no período post-desteta, momento no que estes teñen necesidades diferentes ás da nai [11,29] e por tanto precisan dunha dieta específica. A dieta ten un efecto moi importante sobre o ambiente dixestivo e o microbioma [19], xa que inflúe no establecemento da flora e dos parámetros de fermentación, así como no desenvolvemento de patóxenos [11].

Nos últimos anos leváronse a cabo numerosos estudos en cunicultura con diferentes ingredientes e estratexias dietéticas, para observar o seu efecto sobre os rendementos produtivos, a función de barreira intestinal e as taxas de mortalidade debidas a desordes dixestivos; e estes demostraron que certas estratexias nutricionais tiveron un efecto positivo á hora de reducir a incidencia da EEC. Estas estratexias englóbanse en varios puntos: (a) establecemento dos niveis mínimos e máximos de fibra insoluble na dieta (30-36% de fibra neutro deterxente (FND)) con características específicas (>3,5% de lignina ácido deterxente (LAD)) [30–33]; (b) nivel mínimo de inclusión do 12% de fibra soluble [34–36]; (c) o tipo e nivel de inclusión de proteína na dieta (14-16% de proteína bruta (PB), 0,5-1% de glutamina, e preferencia por xirasol e proteínas plasmáticas animais en lugar de soia, chícharos e proteínas da pataca) [21,32,37–41]; (d) limitación do nivel de calcio na dieta [42]; e (e) uso de certos prebióticos como a celobiosa combinados cun nivel baixo de fibra soluble na dieta [43,44].

Para conseguir os efectos beneficiosos da fibra soluble emprégase habitualmente a polpa de remolacha como ingrediente nas dietas. A súa combinación de fibra soluble e fibra insoluble fermentable ten certos efectos positivos sobre a mucosa intestinal no período post-desteta [45,46]. Sen embargo, aínda non se confirmou se estes efectos tamén se poderían obter empregando outros ingredientes ricos en fibra soluble e fermentable. Outra estratexia que normalmente ten efectos positivos sobre a saúde dos coellos é a restrición de alimento tras a desteta [47–49]. Sen embargo, nin sequera a combinación de todas estas estratexias é capaz de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

protexer completamente aos coellos ante brotes de EEC, e por tanto semella necesario combinalas con outras estratexias. Neste senso, o emprego de novos compostos bioactivos con actividade prebiótica aparece como unha potencial estratexia que podería aportar múltiples beneficios sobre a saúde dos cazapos [10].

O termo prebiótico é moi amplo e inclúe "calquera substrato que é empregado de forma selectiva polos microorganismos endóxenos proporcionando un beneficio na saúde" [50]. Os prebióticos dietéticos son ingredientes selectivamente fermentados que producen cambios específicos na composición e/ou actividade da microbiota gastrointestinal, o cal aporta beneficios á saúde do animal [51]. Estes ingredientes deben cumprir tres criterios para ser clasificados como prebióticos [52]: (1) deben resistir a acidez gástrica, a hidrólise dos encimas dos mamíferos e a absorción gastrointestinal; (2) deben ser fermentados pola microbiota intestinal; e (3) deben estimular selectivamente o crecemento e/ou a actividade das bacterias intestinais asociadas coa saúde e o benestar. A estimulación destes microorganismos beneficiosos mellora a competencia fronte a microorganismos indesexables, prevén a adhesión de patóxenos á mucosa e estimula directamente o sistema inmune intestinal [53]. En calquera caso, a microbiota potencialmente simbiótica dos coellos non foi aínda identificada, o que supón unha importante desvantaxe para atopar prebióticos que poidan mellorar a saúde intestinal desta especie.

Nas últimas décadas vense realizando un gran esforzo para identificar compostos con actividade prebiótica que poidan ser empregados de forma rutineira en nutrición animal. A maior parte deste traballo realizouse nas principais especies produtivas, especialmente en porcino e avicultura [22,54,55], aínda que no sector cunícola tamén se está a realizar un importante traballo [53]. Os prebióticos máis estudados e coñecidos son os oligosacáridos (manano-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, a-galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos e celobiosa), a inulina e os produtos derivados de lévedos, aínda que hai outros candidatos como os PUFAs. Tamén se estudaron algunhas fibras solubles fermentables e outros tipos de fibra dietética [22,50,53,54]. Aínda que numerosos prebióticos xa demostraron ter efectos positivos á hora de reducir a incidencia de diarrea en leitóns durante o período post-desteta, é preciso un maior coñecemento do efecto destes compostos sobre a saúde intestinal para poder empregalos de forma estendida nas diferentes producións animais [54], incluída a cunicultura. Neste senso, as diferencias de microbioma e fisioloxía intestinal entre as diferentes especies dificultan obter conclusións xerais aplicables a todas as producións. Neste eido, as macroalgas mariñas aparecen como candidatas prometedoras pola súa potencial acción prebiótica, entre outros moitos beneficios que demostrou ter a súa inclusión en dietas animais.

## 1.2. MACROALGAS MARIÑAS EN NUTRICIÓN ANIMAL

As algas mariñas veñen sendo empregadas na dieta dos animais de forma tradicional nalgunhas partes do mundo, como unha forraxe máis en tempos de escaseza e tamén como suplemento mineral [56–58]. Por exemplo, en Islandia o gando ovino e vacún alimentábase durante varias

semanas a base de macroalgas, que eran "pastoreadas" nas praias directamente, ou preservadas en forma de ensilados para empregalas durante o inverno [59]. As macroalgas tamén formaban parte da dieta do gando noutros lugares como a Bretaña Francesa, Escocia ou Escandinavia, e actualmente seguen a ser a base da dieta das ovellas Orkney (do Norte de Escocia), entre outros casos [56]. Sen embargo, o desenvolvemento da ciencia da nutrición animal chegou ao consenso de que as algas mariñas non eran apropiadas para este uso xa que o seu valor nutricional era moi escaso [59]. Este feito comezou a ser discutido nas últimas décadas, tras coñecer en maior profundidade a súa composición en numerosas substancias beneficiosas, como son algúns polisacáridos, polifenois ou minerais que son de grande interese debido á necesidade urxente de atopar novos compostos bioactivos tanto para nutrición humana como animal [56].

### 1.2.1. Descrición xeral das macroalgas mariñas

O conxunto de macroalgas mariñas é un grupo moi heteroxéneo que engloba máis de 10.000 especies, das cales só algunhas son de potencial interese para nutrición animal. Xeralmente clasifícanse en tres grupos ou clases: algas pardas (*Phaeophyceae*), algas vermellas (*Rhodophyceae*) e algas verdes (*Chlorophyceae*), que difiren tanto na súa cor debido aos diferentes pigmentos que conteñen como na súa composición. Esta composición é única debido ás condicións tan particulares e ambientalmente extremas nas que medran. Dentro de cada grupo existen numerosas ordes e familias que á súa vez presentan propiedades variadas. A composición de cada especie varía amplamente segundo o hábitat e o tempo, e por tanto é diferente segundo o ano e a estación e segundo a localización xeográfica, polo efecto de factores externos como son a temperatura e o pH da auga, a exposición á luz, a salinidade, a concentración de nutrientes na auga ou algúns estresores para estes organismos [57].

Todas as macroalgas mariñas comparten o seu alto contido en humidade (70-90%), feito que limita a súa vida útil e que fai que deban ser consumidas rapidamente ou en forma deshidratada [56]. Tamén destaca o seu contido en vitaminas (A, C, E e B) e polifenois (flavonoides e taninos) que actúan como antioxidantes, e o seu perfil de ácidos graxos, os cales aparecen en baixas concentracións (<5%) pero cunha alta proporción de PUFAs e unha boa relación entre *n*-6 e *n*-3 [60]. Sen embargo, cada grupo e cada familia de macroalgas presentan características e composicións diferentes, de forma que cada unha pode ter un interese diferente en nutrición animal.

As algas pardas caracterízanse polo seu altísimo contido en cinzas (de ata o 50% sobre materia seca (MS)) e por tanto son unha fonte moi interesante de minerais [61], sobre todo de iodo; mentres que o seu aporte de proteína é baixo comparado con outros grupos (3-15% MS). Os carbohidratos principais deste grupo [61] son os alxinatos (17-45% MS), a laminarina (ata 35% MS) e os fucoidanos (5-20% MS), sendo estes dous últimos polisacáridos solubles de grande interese en nutrición animal debido ao seu potencial efecto prebiótico [59]. Dentro deste grupo, os xéneros máis estudados e prometedores para o seu uso en nutrición animal son

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

*Ascophyllum, Saccharina, Laminaria, Sargassum, Fucus* ou *Himanthalia*, que ao mesmo tempo son os máis consumidos en alimentación humana.

As algas verdes presentan un menor contido de cinzas e unha concentración moderada de proteínas (9-26% MS), sendo neste caso os polisacáridos principais os ulvanos (8-29% MS), os galactanos ou xilanos [62]. O xénero máis estudado e frecuente no ambiente é *Ulva*, de grande interese en nutrición animal, aínda que outros como *Codium, Cladophora* ou *Enteromorpha* son tamén amplamente coñecidos [56].

O grupo das algas vermellas caracterízase por un alto contido en proteínas (ata 47% de MS), que posúen moi alta calidade en canto a aminoácidos esenciais [62]. O contido en cinzas é intermedio aínda que algunhas presentan grandes cantidades de calcio [56], e os polisacáridos principais son as carraxeninas (30-75% MS) e o agar, moi empregado na industria alimentaria como xelificante [61]. Os xéneros máis empregados en alimentación son *Porphyra, Chondrus* ou *Palmaria*, entre outros.

### 1.2.2. Beneficios sobre a saúde intestinal

Un dos maiores intereses na actualidade para empregar as macroalgas en nutrición animal débese ao seu alto contido en polisacáridos complexos e oligosacáridos, algúns dos cales demostraron ter un potencial poder prebiótico. As macroalgas presentan un contido moi elevado de fibra dietética (25-75% MS), que está composta por fibra insoluble e soluble [63]. A fibra insoluble está formada por hemicelulosa, celulosa e lignina, e apenas é fermentada; mentres que a soluble componse de alxinatos, laminarina e fucoidanos nas algas pardas, ulvanos e galactanos nas verdes e agar e carraxeninas nas vermellas [64]. Estes polisacáridos solubles xeralmente non son dixeridos no intestino delgado e por tanto son fermentados total ou parcialmente ao chegar ao intestino groso [60,65]. Esta fermentación é realizada pola microbiota intestinal, que produce diferentes gases e metabolitos, como o ácido láctico e os AGV, que modulan o ambiente intestinal ao reducir o pH e estimular o crecemento das bacterias comensais. Ao mesmo tempo, inhiben o crecemento e adhesión dos patóxenos e melloran a arquitectura da mucosa intestinal, xa que certos AGV como o butirato son fonte de enerxía para os colonocitos; e tamén estimulan o sistema inmune [66–68]. Debido a estes efectos, os polisacáridos das macroalgas foron propostos como unha nova fonte de prebióticos, ao cumprir os criterios establecidos para a súa clasificación como tal [52,55,67,69], descritos anteriormente.

O potencial prebiótico dalgúns polisacáridos como a laminarina e os fucoidanos foi amplamente estudado en porcino [55], produción que se enfronta a problemas similares aos mencionados en cunicultura, pola grande incidencia e mortalidade de procesos diarreicos nos leitóns no post-desteta. Esta disbiose tamén era tradicionalmente controlada con pensos medicados con antibióticos e coa suplementación de niveis elevados de minerais como o cobre e o zinc [54]. Por tanto, este sector precisa tamén de estratexias dietéticas que restablezan o equilibrio intestinal e que promovan o crecemento de bacterias beneficiosas que impulsen o

sistema inmune da mucosa, así como que reduzan a proliferación de bacterias patóxenas [55]. Na maior parte dos estudos realizados en porcino estudouse o efecto prebiótico da laminarina e dos fucoidanos, tanto por separado como combinados, a doses de entre 150-300 mg/kg de cada polisacárido en forma pura; aínda que tamén se observaron efectos positivos con outras macroalgas como *Ascophyllum nodosum* ou con alxinato puro. A inclusión destes compostos na dieta tivo numerosos efectos positivos sobre a saúde intestinal dos leitóns (Figura 1.1), reducindo a diarrea post-desteta, como obxectivo final [70–78].

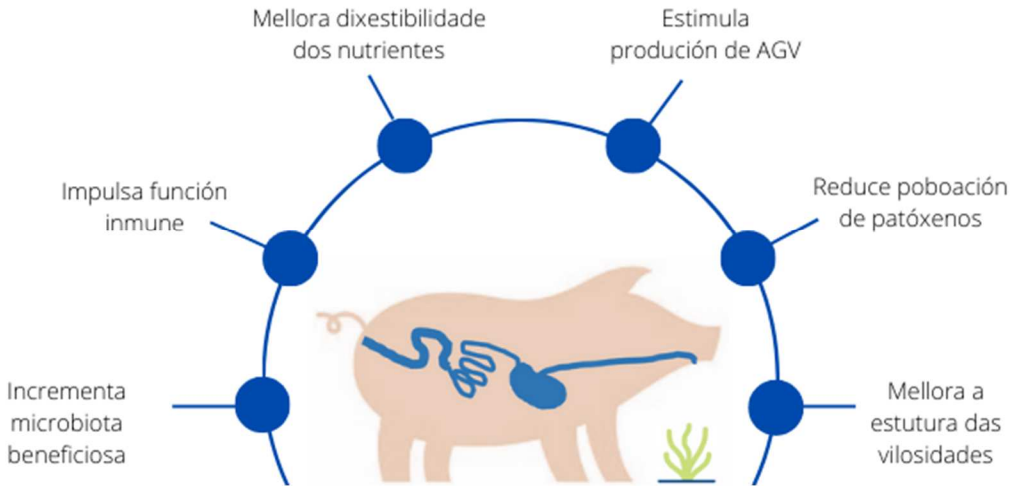



**Figura 1.1. Beneficios da inclusión de polisacáridos derivados de macroalgas sobre a saúde intestinal en porcino. Adaptado de Al-Soufi et al. [79], baixo licenza Creative Common.**

Dada a experiencia positiva en porcino nun contexto similar, sería esperable que estes polisacáridos puideran ter un efecto positivo sobre a saúde intestinal dos cazapos no período post-desteta. En coellos a bibliografía existente é moito menor, mais os estudos realizados neste senso tiveron resultados prometedores. En Exipto, realizáronse dous estudos [80,81] onde incluíron un 1% de *Ulva lactuca* en forma deshidratada na dieta dos coellos e observaron un efecto positivo sobre o crecemento e sobre os parámetros de saúde intestinal dos animais. En Italia [82–85], incluíron na dieta dos coellos un suplemento a base de algas pardas (*Laminaria* spp.) e polifenois extraídos de plantas a doses baixas (0,3 ou 0,6%) e tamén observaron beneficios sobre os parámetros produtivos dos animais así como na calidade da carne e a estabilidade oxidativa. Aínda que non avaliaron directamente o efecto sobre a saúde intestinal, os beneficios sobre os parámetros produtivos poderían indicar unha mellora na absorción dos nutrientes e na súa saúde.

Por tanto, existe un grande interese en avaliar o potencial poder prebiótico destes polisacáridos en diferentes especies animais. Dentro da grande variedade de especies de macroalgas, é necesario caracterizar o contido en polisacáridos de cada unha delas e determinar cales teñen un maior potencial prebiótico, xa que isto dependerá tamén da súa composición. Por exemplo, os polisacáridos sulfatados (fucoidanos, ulvanos, galactanos e carraxeninas) parecen ser menos fermentables que os non sulfatados como a laminarina [86,87]; mentres que certos extractos de ulvanos son empregados para estimular a función inmune do intestino [88].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ademais das diferencias existentes entre especies de macroalgas mariñas, é necesario determinar a composición e potenciais efectos beneficiosos dos diferentes produtos derivados destas especies. Tradicionalmente, as macroalgas veñen sendo empregadas na súa forma deshidratada, aportando todo tipo de compostos dunha forma pouco concentrada. Nos últimos anos comezouse a experimentar a extracción selectiva de certos tipos de compoñentes, segundo fora o interese en cada caso. Desta forma, cando o obxectivo é empregar as macroalgas como fonte de prebióticos, estas poden ser procesadas mediante diferentes técnicas para obter un extracto máis puro dos polisacáridos. Neste senso, existen numerosas posibilidades que varían no tipo de tecnoloxía, de solventes, temperatura ou de encimas empregados [89], polo que a composición final de cada produto será diferente e terá efectos moi variados. No contexto da nutrición animal, o emprego deste tipo de produtos procesados ten a desvantaxe de que ten un custo maior que o emprego das macroalgas deshidratadas, polo que é preciso valorar os potenciais beneficios de cada produto para determinar cal é a forma máis conveniente de empregar as macroalgas en cada caso.

### 1.2.3. Gran aporte de minerais: beneficios e limitacións

As macroalgas mariñas presentan uns niveis de minerais (8-40% MS) que non son comparables con practicamente ningún outro ingrediente empregado en nutrición animal [90]. Este feito constitúe ao mesmo tempo unha gran oportunidade para empregalas como aporte de certos minerais requiridos nas dietas animais, como tamén unha limitación nalgunhas especies para non exceder os límites establecidos legalmente nas dietas animais. É por isto que esta condición é en ocasións considerada como unha característica negativa das algas, xa que pode chegar a limitar o seu uso, mais se é empregada de forma adecuada, pode resultar nunha das maiores potencialidades destes novos ingredientes, tanto para nutrición animal como para alimentación humana.

As macroalgas son organismos que son capaces de absorber unha grande cantidade de minerais do seu entorno, aínda que esta capacidade varía dependendo da especie e tamén das condicións ambientais nas que se desenvolvan [61,91]. Dentro dos numerosos macro minerais -calcio (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P), potasio (K), sodio (Na) e xofre (S)- e os elementos traza esenciais - cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), selenio (Se) e zinc (Zn)- que as macroalgas conteñen [91,92], destaca o seu contido excepcionalmente elevado de iodo (I), sobre todo nalgunhas especies do orde Laminariales [93]. Tradicionalmente véñense empregando certas macroalgas nalgúns lugares do mundo para tratar a deficiencia de iodo nas poboación humanas [71], e tamén se comezan a incluír nas dietas dalgúns animais como en vacún de leite, para aportar os seus requirimentos neste mineral esencial para numerosas funcións [57,94]. Ademais, o iodo tamén pode ser facilmente transferido aos produtos animais (especialmente ao leite e aos ovos, pero tamén á carne) cando é engadido na dieta do gando [71,94], o que podería contribuír a paliar a deficiencia de iodo dos humanos e previr problemas de tiroide [71]. Sen embargo, en certas especies, sobre todo de algas pardas, é necesario axustar adecuadamente as doses ás que se inclúen nas dietas animais, para non

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

exceder os máximos legais (Regulamento EC 1334/2003), xa que pode chegar a ser tóxico a niveis elevados [95].

Esta gran capacidade de absorber minerais fai que as macroalgas poidan chegar a acumular certos minerais potencialmente tóxicos e metais pesados, como o arsénico (As), mercurio (Hg), chumbo (Pb) ou cadmio (Cd), o cal dependerá de numerosos factores como a capacidade de absorción de cada especie, as condicións ambientais (salinidade, temperatura, pH) ou da contaminación ambiental [95]. Este feito resulta unha fonte de preocupación á hora de incluír as macroalgas en nutrición animal, así como para consumir produtos animais que foran alimentados con este ingrediente. O contido nestes compostos é tan variable entre especies e localizacións que non é posible xeneralizar sobre o potencial risco do seu consumo, e por tanto sería aconsellado analizar sempre cada lote de macroalgas para asegurar que non exceden os máximos permitidos pola lexislación en pensos animais (Regulación EC 32/2002, EC 1275/2013). En moitas macroalgas, o As aparece en cantidades bastante elevadas que alertan dun posible risco se son consumidas. Sen embargo, no caso do As o contido total non reflexa a súa toxicidade, xa que dentro deste existen numerosos compostos de variada toxicidade [91]. A maior parte do As nas macroalgas adoita estar presente como formas orgánicas de baixa toxicidade [96,97], que non supoñen ningún risco cando as macroalgas son incluídas a baixas doses nas dietas animais [98]; mentres que só unha pequena parte se atopa en forma de arsénico inorgánico, de elevada toxicidade.

Ademais, tanto o alto contido dalgúns macroelementos atopado en determinadas especies de macroalgas [99], como son o xofre ou o magnesio, como as posibles interaccións entre algúns elementos -a máis coñecida entre iodo e arsénico con selenio [100–102] e entre xofre e selenio [103–105]- apenas foron estudadas en gando alimentado con macroalgas, se ben merecen atención tanto pola saúde dos animais como polos posibles residuos nos produtos derivados. O emprego de macroalgas en nutrición animal pasa por tanto por unha caracterización detallada e individualizada da súa composición mineral, para así poder maximizar o seu uso e beneficios sen que isto supoña un risco para o animal nin para as persoas que consuman estes produtos derivados.

### 1.2.4. Efectos sobre a calidade da carne

A inclusión de macroalgas mariñas nas dietas dos animais pode ter certos efectos sobre os produtos animais derivados destas producións, como é o caso da carne. Por unha banda, é preciso avaliar se este aporte produce algún cambio a nivel organoléptico, xa que en función disto a aceptación por parte das persoas consumidoras pode variar, tanto producindo un rexeitamento como unha mellor valoración do produto. Neste senso, é importante que este novo ingrediente como mínimo non produza sabores, olores ou unha aparencia ou textura desagradables, o que podería ter unha gran repercusión na aceptación deste tipo de produtos. Na maior parte dos estudos previos realizados neste campo, as macroalgas non só non tiveron un efecto negativo sobre a calidade da carne, senón que en moitos casos melloraron certas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

propiedades do produto (Figura 1.2). Por exemplo, en porcino observouse unha mellora na aparencia da carne sen modificar as propiedades organolépticas, cando os animais foron alimentados con extractos de laminarina e fucoidanos [106]. En coellos, o aporte de polisacáridos de *Laminaria* spp. a baixas concentracións mellorou a carne en termos de textura e sabor [83,84]. Os potenciais beneficios das macroalgas sobre as propiedades da carne dependerán da especie empregada así como das doses aportadas, polo que é preciso comprobar os seus efectos nos diferentes casos e nas diferentes especies animais.

Por outra banda, as macroalgas son unha fonte rica noutros compostos, como os antioxidantes, que aparecen en forma de polifenois e vitaminas, os cales demostraron ser de utilidade para mellorar a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante da carne [56,65,95,107]. Este efecto observouse en diferentes especies animais, como é o caso do porcino, onde a inclusión de laminarina e fucoidanos semella reducir a oxidación lipídica e aumentar a capacidade antioxidante desta carne [108,109]. En porcino tamén se observou un efecto sobre a cor da carne que podería estar relacionada co incremento dos compostos antioxidantes [107,110]. Estas modificacións tamén se produciron noutras especies, como en ruminantes [111,112] e en polos de engorde [113].

Outro dos beneficios observados da incorporación de certas macroalgas (por exemplo *L. digitata, L. japonica, A. nodosum*) na dieta dos animais é a mellora do perfil de ácidos graxos da carne, ao incrementar o contido de PUFAs e reducir o de SFAs e o colesterol, como foi descrito en leitóns [106] e en cordeiros [114]. En polos de engorde a inclusión de *Ulva lactuca* na dieta reduciu a cantidade de graxa abdominal [115]; e en coellos, a inclusión de *Laminaria* spp. na dieta das nais reprodutoras a doses de 0,3 e 0,6% reduciu o contido de colesterol da carne da súa proxenie [83].




**Figura 1.2. Efectos observados sobre a calidade da carne tras a inclusión de macroalgas mariñas en distintas dietas animais. Adaptado de Al-Soufi et al. [79], baixo licenza Creative Common.**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En conxunto, estes estudos previos parecen indicar que a inclusión de macroalgas na dieta dos coellos podería mellorar aínda máis a súa calidade, que xa de por si posúe moi boas propiedades. No caso dos coellos, o uso de algas como antioxidantes sería moi beneficioso xa que é un dos factores que máis limitan a súa vida útil debido ao seu alto contido en PUFAs, os cales son moi susceptibles á oxidación e á xeración de compostos tóxicos. Nesta carne, é importante manter o equilibrio entre os niveis de PUFAs e antioxidantes para garantir a súa estabilidade [8], os cales poden ser aportados na dieta, preferentemente de orixe natural como é o caso das algas.

A existencia de efectos positivos sobre a calidade da carne de coello permitiría empregar este enfoque como unha ferramenta de mercado para atraer a persoas consumidoras que busquen produtos cárnicos saudables e sostibles.

### 1.2.5. Beneficios medioambientais

O cultivo de macroalgas mariñas está en aumento en todo o mundo como parte do desenvolvemento dunha economía sostible [116]. China e Indonesia, onde a colleita e cultivo de algas é unha práctica ancestral, son os maiores produtores de macroalgas, contribuíndo co 86,6% da produción global [56,117]. Dentro de Europa, Francia é un dos maiores produtores de macroalgas [117], e esta produción está a expandirse actualmente aos países mediterráneos [118]. As costas atlánticas de Galicia (Noroeste de España) son un enclave privilexiado para a produción de macroalgas, xa que conta cunhas condicións climáticas e orográficas que permiten o crecemento de máis de 700 especies diferentes, cunhas taxas de crecemento moi elevadas [94,119]. Nesta rexión existen varias empresas dedicadas á colleita e cultivo de macroalgas de forma sostible, principalmente destinadas a alimentación humana [120]. As macroalgas mariñas son empregadas con múltiples propósitos ademais de como alimento, tanto de forma enteira (xeralmente deshidratada) como trala extracción de certos compostos de interese, en alimentación animal, nas industrias farmacéuticas, cosméticas e alimentarias, así como para producir biofertilizantes e biocombustibles a partir dos subprodutos derivados destas industrias [61,118,121,122].

O uso de macroalgas mariñas como unha alternativa ao uso de antibióticos en produción animal ten numerosos beneficios medioambientais (Figura 1.3), comezando pola redución directa no vertido de residuos farmacéuticos no ambiente [123]. O consumo global (228 países) de antimicrobianos en produción animal foi estimado en 63.151 (±1560) toneladas en 2010, e espérase que aumente nun 67% en 2030, case duplicándose nos países BRICS (Brasil, Rusia, India, China e Sudáfrica) [124]. Sobre o 40-90% (dependendo do tipo de fármaco) da dose antibiótica administrada é excretada como o composto orixinal en forma activa nas feces e nos ouriños, que finalmente acadan o medio ambiente e contaminan os solos, as augas e as plantas [125]. Unha vez se atopan no medio, os residuos antibióticos poden producir efectos negativos sobre a vida a diferentes niveis tróficos así como sobre a saúde humana, a través da contaminación da auga e do alimento, ao tempo que contribúe a aumentar as poboacións de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bacterias resistentes e a manter a presión selectiva que conduce ao desenvolvemento e/ou diseminación de resistencias [126,127].

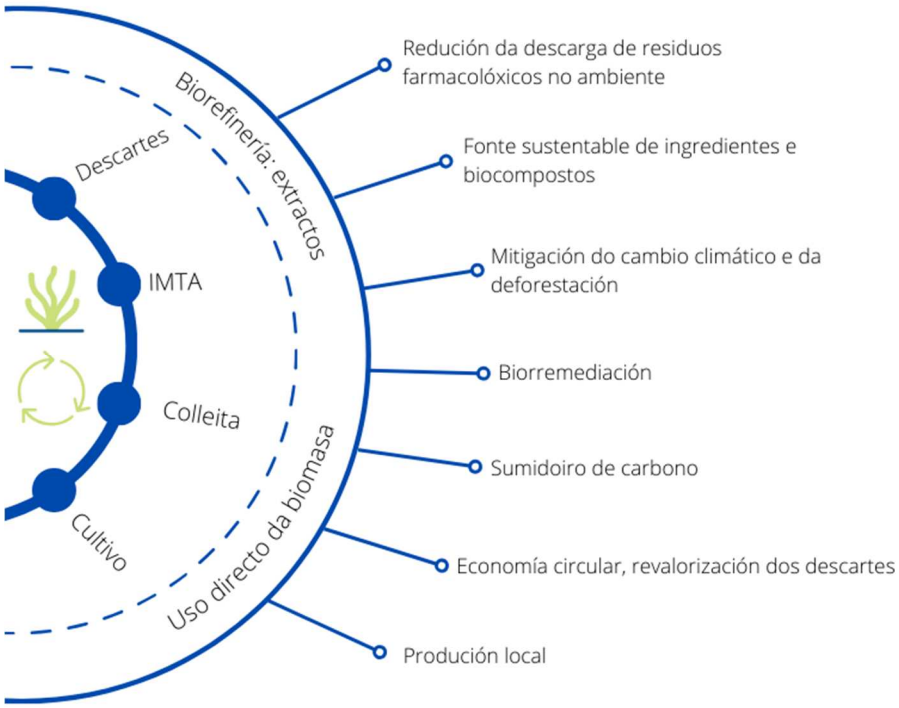



**Figura 1.3. Potenciais beneficios ambientais derivados do emprego de macroalgas mariñas en alimentación animal. Adaptado de Al-Soufi et al. [79], baixo licenza Creative Common.**

Por outro lado, a inclusión de macroalgas como ingrediente na dieta dos animais proporciona aminoácidos esenciais, PUFAs, vitaminas e minerais, antioxidantes e fibra soluble, que en conxunto poden mellorar a saúde animal e contribuír a lograr menores taxas de mortalidade e a unha redución no uso de antibióticos [54,56]. Ao minimizar as mortalidades, reduciríase considerablemente o impacto medioambiental das producións animais tal como a cunicultura, ao aumentar a súa eficiencia [9,128]. Para acadar este obxectivo, é crucial desenvolver dietas ben adaptadas ao período post-desteta e mellorar o manexo da explotación e as condicións hixiénicas [9,11].

É ben coñecido que o maior impacto ambiental das producións de monogástricos é debido á produción do seu alimento, especialmente de certas proteínas como a soia, que están asociadas a grandes deforestacións e emisións derivadas do seu transporte a longas distancias [9,129]. A redución da inxesta de proteína e a substitución de parte da proteína por outras fontes cun menor impacto medioambiental, como é o caso dalgunhas especies de macroalgas, poderían contribuír a mitigar o dano medioambiental e a contaminación debida á excreción de nitróxeno ao medio [9,130,131]. Ademais, no contexto dun gran crecemento da poboación con recursos limitados, poderíanse acadar grandes producións de macroalgas mariñas sen necesidade de gastar auga doce, terra cultivable ou fertilizantes; e por tanto as macroalgas representan unha fonte moi interesante de ingredientes e compostos bioactivos tanto para alimentación humana como animal [57,78,95,131,132].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A maiores, o cultivo de macroalgas é de interese polos beneficios medioambientais que estas proporcionan [116]. As macroalgas posúen propiedades biorremediantes, xa que son capaces de minimizar a eutrofización ao retirar os nutrientes disoltos en exceso, como C, N e P [133,134]. Tamén retiran os metais pesados da auga [135] e actúan como un potencial sumidoiro de carbono que contribúe a mitigar a acidificación dos océanos e o cambio climático [95,122]. Neste senso, o cultivo de macroalgas foi proposto como un co-cultivo beneficioso en acuicultura, dentro dun novo sistema chamado IMTA (Acuicultura Multi-Trófica Integrada), deseñado para reducir o impacto medioambiental da produción de peixes e moluscos [134]. A maricultura intensiva produce grandes cantidades de contaminantes orgánicos e inorgánicos que causan un deterioro medioambiental [133]. O sistema IMTA combina o cultivo de varias especies de diferentes niveis tróficos e funcións ecosistémicas complementarias (especies que son alimentadas (peixes ou crustáceos), especies filtradoras (moluscos como mexillón ou ostra) e especies extractivas (macroalgas)), de forma que os residuos e os nutrientes derivados dun cultivo son reciclados e empregados por outras especies [134,136]. O resultado é un sistema menos daniño para o medio ambiente [133,136], á vez que se acadan producións totais máis elevadas neste sistema que nos monocultivos de cada especie, alcanzando un maior rendemento [137] e produtos de mellor calidade [134]. En Europa xa existe certa experiencia co sistema IMTA, en países como Francia, Alemaña, Noruega, Reino Unido, Irlanda, Portugal e España, así como en Galicia [136,138], aínda que non está tan estendida como en Asia [139]. O valor comercial das algas usadas nestes sistemas é un punto clave para a potencial rendibilidade do sistema IMTA [140]. A inclusión das macroalgas en alimentación animal podería incrementar o valor comercial das algas, especialmente nalgúns países europeos onde a produción animal é economicamente importante, como é o caso de Galicia, de forma que os dous sectores poderían reforzarse mutuamente [136]. O feito de que xa exista un mercado para as macroalgas nos principais países produtores de coello significa que o seu uso en alimentación animal como ingredientes localmente producidos e alternativos aos antibióticos podería ser empregado como unha estratexia de mercado para aumentar o consumo de coello por parte de persoas concienciadas sobre a sustentabilidade medio ambiental.

A maiores, algunhas algas como a leituga de mar (*Ulva* spp) crecen de forma incontrolable nas costas e producen certos impactos ambientais negativos, conducindo a unha degradación da costa e problemas para a industria pesqueira e o turismo. Este tipo de algas son retiradas regularmente das costas, e por tanto xeran toneladas de residuos cada ano [58,62]. Por outra banda, as industrias produtoras de macroalgas xeran durante o proceso de transformación grandes cantidades de descartes, ata 40.000 kg ao ano, os cales non poden ser comercializados por diferentes motivos pero están en perfectas condicións para outros usos. Estes descartes poderían ser revalorizados se foran empregados para outros usos, como puidera ser a súa incorporación en alimentación animal, o que proporcionaría beneficios tanto sobre a saúde dos animais como sobre a viabilidade económica destas industrias. Este enfoque crearía un modelo de economía circular que sería beneficioso a nivel medioambiental, social, económico e en termos de benestar animal [58,136].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 1.2.6. Percepción das persoas consumidoras

A inclusión de macroalgas mariñas nas dietas animais darían lugar a produtos diferenciados no mercado, ben por posuír características diferentes e beneficiosas para as persoas consumidoras ou ben por teren sido alimentados cun novo ingrediente que aporta certos beneficios á sociedade en conxunto, xa que podería mellorar a saúde dos animais e por tanto a viabilidade das explotacións, reduciría o uso de antibióticos e tería un impacto positivo sobre o medio ambiente e sobre a rendibilidade das industrias produtoras de algas. Sen embargo, estes produtos serían unha novidade no mercado e por tanto sería preciso coñecer a súa aceptación por parte das persoas consumidoras [27]. Ata onde coñecemos, ningún estudo previo abordou a percepción e aceptabilidade por parte das persoas consumidoras dunha carne de coello alimentada con algas, ou a súa vontade de escoller este tipo de produtos [27]. En xeral as persoas consumidoras están sensibilizadas co benestar animal e os sistemas de produción gandeira sustentables, e tamén demandan alimentos funcionais con propiedades nutricionais adecuadas [27], polo que se agarda que acepten este tipo de produtos. Non obstante, o consumo de carne de coello depende máis dalgúns factores sociais que o consumo doutros tipos de carne, o que de feito supón unha das principais causas do descenso do seu consumo [1]. Isto dificulta a predición da resposta das consumidoras a diferentes estratexias.

No caso da carne de coello, sería preciso asegurar que a inclusión deste ingrediente na dieta non ten un efecto negativo sobre as características da carne, xa que isto podería producir un rexeitamento do produto. Ademais, as vantaxes sociais, económicas e medioambientais que as macroalgas proporcionarían de seren incluídas nas dietas animais serían unha ferramenta para incrementar o consumo deste produto. É dicir, que isto podería ser empregado como unha estratexia de mercado para ofrecer un produto diferenciado que fora atractivo para as persoas consumidoras, sobre todo para aquelas preocupadas por este tipo de cuestións. Para elo, sería necesario comunicar adecuadamente cal é a razón desta estratexia dietética e explicar os seus potenciais beneficios, de forma que as persoas consumidoras teñan a información suficiente para elixir de forma consciente este produto. Sería necesario para elo estudar se existe este nicho de mercado e se habería unha boa aceptación do produto, xa que de non ser así non sería unha estratexia adecuada a seguir e por tanto non sería recomendable explotar esta imaxe de produto diferenciado.

Galicia é un lugar idóneo para abordar esta cuestión, xa que esta rexión é unha das máis importantes produtoras de macroalgas mariñas e unha das principais rexións produtoras de carne de coello de España (3ª posición). Aínda que a dieta atlántica é moi consumida en Galicia -sendo o porco e o vacún os principais tipos de carne que se consumen- os coellos foron tradicionalmente criados polas familias labregas como fonte complementaria de carne e esterco [141]. Aínda que a cría de coellos foi paulatinamente industrializándose e profesionalizándose, a produción desta carne para o consumo doméstico segue sendo moi importante en Galicia [141,142]. Esta condición social e histórica, xunto coas tradicións alimentarias da zona, debe ser tida en conta para comprender os hábitos de consumo e a vontade da poboación de consumir novos produtos [1,143].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 2. OBXECTIVOS

O obxectivo principal deste estudo foi avaliar o emprego de macroalgas mariñas nas dietas dos coellos durante o período post-desteta, co fin último de mellorar a súa saúde intestinal e servir de alternativa ao uso de antibióticos.

Para elo, os obxectivos específicos deste estudo foron os seguintes:

**CAPÍTULO I:** Caracterizar *in vitro* as propiedades de sete especies de macroalgas mariñas e os seus extractos.

**O1.** Determinar a composición química, a dixestibilidade e fermentación cecal *in vitro*, a produción de ácidos graxos volátiles *in vitro*, e as concentracións mínimas inhibitorias dos principais axentes patóxenos de interese nas especies de macroalgas estudadas.

**O2**. Avaliar os potenciais beneficios sobre a saúde dos coellos e seleccionar os produtos de macroalgas máis prometedores para unha posterior avaliación *in vivo*.

**CAPÍTULO II:** Determinar o perfil mineral das sete especies de macroalgas e os seus extractos.

**O3.** Determinar o contido de macro e micro minerais e de elementos traza potencialmente tóxicos nas especies de macroalgas estudadas.

**O4**. Analizar a contido das diferentes especies de arsénico nas macroalgas e o seu potencial risco tóxico.

**O5.** Comparar a composición mineral destas especies coa dos ingredientes maioritarios empregados en nutrición animal, para determinar os potenciais aportes minerais das macroalgas con este propósito.

**O6.** Establecer os límites máximos de inclusión de cada produto nas diferentes especies animais produtivas.

**CAPÍTULO III**: Avaliar *in vivo* os potenciais efectos de tres produtos de macroalgas sobre a saúde intestinal dos coellos.

**O7.** Analizar os efectos das macroalgas sobre os parámetros produtivos dos animais e comparalos co grupo control.

**O8.** Estudar os efectos das macroalgas sobre a saúde intestinal dos coellos, a través de diversos parámetros: estudo do microbioma, illamento de *Escherichia coli* e *Clostridium,* reconto de coccidios en feces, determinación do contido ileal de mucinas, estudo histolóxico do xexuno e análise da expresión de xenes relacionados coa inmunidade e coas proteínas de unión dos enterocitos.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Paralelamente, establecéronse os seguintes obxectivos secundarios:

**CAPÍTULO IV:** Avaliar *in vivo* os efectos de tres macroalgas mariñas sobre a calidade da carne.

**O9.** Comparar a composición da carne dos coellos alimentados con macroalgas coa do grupo control, mediante a determinación das propiedades físico-químicas e antioxidantes, o perfil de ácidos graxos e as propiedades sensoriais.

**O10.** Comprobar que a carne dos coellos alimentados con macroalgas non posúe ningunha característica negativa que puidera ser rexeitada polas persoas consumidoras.

**CAPÍTULO V:** Estudar *in vivo* a deposición de minerais na carne e nas vísceras dos coellos alimentados con tres especies de macroalgas.

**O11.** Analizar o perfil mineral (macro e micro minerais e elementos potencialmente tóxicos) do músculo, fígado, ril e soro dos coellos alimentados con macroalgas mariñas e comparalo co do grupo control.

**O12**. Avaliar a transferencia de macro e micro minerais das macroalgas mariñas aos distintos órganos do coello, especialmente de iodo, como estratexia para enriquecer a carne de coello en determinados minerais esenciais para alimentación humana.

**O13.** Determinar a transferencia de elementos potencialmente tóxicos como o arsénico aos distintos órganos e carne do coello e avaliar o seu potencial risco para as persoas consumidoras.

**CAPÍTULO VI:** Estudar a aceptabilidade por parte da poboación enquisada a consumir carne de coello alimentado con macroalgas.

**O14.** Estudar os hábitos de consumo de carne de coello e macroalgas no concello de Lugo e a percepción da sociedade sobre estes produtos.

**O15.** Determinar a predisposición e aceptabilidade das persoas consumidoras a consumir unha carne de coello que fora alimentado con macroalgas mariñas.

**O16.** Avaliar se esta estratexia de alimentación dos coellos podería ser empregada como unha ferramenta de comercialización para incrementar o consumo de carne de coello entre persoas concienciadas coa protección do medio ambiente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 3. METODOLOXÍA

## 3.1. ESPECIES DE ALGAS MARIÑAS ESTUDADAS E PRODUTOS EMPREGADOS

Neste traballo estudáronse e caracterizáronse 7 especies de algas mariñas polo seu interese para ser incluídas en alimentación animal (Táboa 3.1). Todas elas foron proporcionadas pola empresa galega Portomuíños S.L. (Cerceda, A Coruña), con grande interese en aproveitar a gran cantidade de descartes obtidos durante o procesamento destas algas destinadas a alimentación humana.

As especies estudadas foron elixidas en base a diferentes criterios (Táboa 3.1), principalmente tendo en conta a súa dispoñibilidade, de forma que a súa potencial inclusión en nutrición animal puidera ter futuro a longo prazo. Neste senso, un dos criterios empregados foi a posibilidade de cultivo de cada alga, xa que este feito garantiría a súa produción a longo prazo sen ter que depender das poboacións naturais, as cales son colleitadas de forma limitada para garantir o seu aproveitamento sostible. Actualmente, a maior parte da produción de macroalgas en Galicia e en Europa ven da colleita racional de poboacións salvaxes, se ben no caso do Kombu de azucre (*S. latissima*), moi apreciado na gastronomía, a súa recolección no medio está prohibida en Galicia e por tanto toda a súa produción provén do seu cultivo en mar ou en tanques en terra. Outras macroalgas son actualmente colleitadas mais é permitido cultivalas, aínda que a tecnoloxía e metodoloxía para facelo aínda está en desenvolvemento. Todas estas especies teñen un interese para a gastronomía e por tanto o seu procesamento produce toneladas anuais de descartes que serían totalmente válidos para o seu emprego en nutrición animal ou outros usos, fomentando a economía circular. Outras macroalgas son en cambio pouco coñecidas e explotadas, a pesares de ser moi abundantes, e por tanto teñen un escaso valor comercial actualmente. Este feito é tamén de interese xa que o seu aproveitamento para alimentación animal faría incrementar este valor comercial e quizais o seu interese para outros usos. Algunhas destas especies demostraron ter certos beneficios sobre a saúde, tanto humana como animal, polo que resultou de interese estudalas para a súa inclusión na alimentación dos coellos de produción.

**Táboa 3.1: Especies de macroalgas estudadas e criterios de selección.**

| Nomes científico e común | | Grupo | Criterios de selección |
|---|---|---|---|
| *Saccharina latissima* | Kombu de azucre | Parda | Cultivada en Galicia. Futuro a longo prazo. Produce descartes. Alto valor comercial. |
| *Fucus vesiculosus* | Fucus | Parda | Colleitada. Abundante e pouco explotada. |
| *Himanthalia elongata* | Espaguete de mar | Parda | Colleitada, potencialmente cultivable. Produce descartes. Beneficios demostrados. |
| *Undaria pinnatifida* | Wakame | Parda | Colleitada, potencialmente cultivable. Futuro a longo prazo. Produce descartes. Alto valor comercial. |
| *Laminaria ochroleuca* | Kombu | Parda | Colleitada. Produce descartes. |
| *Ulva* spp. | Leituga de mar | Verde | Colleitada, potencialmente cultivable. Futuro a longo prazo. Moi abundante, produce descartes. Beneficios demostrados. |
| *Mastocarpus stellatus* | Musgo | Vermella | Colleitada. Moi abundante e pouco explotada. |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A partir destas 7 especies de macroalgas producíronse diferentes tipos de produtos derivados, que foron inicialmente caracterizados *in vitro* para determinar as súas potencialidades para a súa inclusión nas dietas dos coellos. De cada especie producíronse produtos variados en función das súas características e posibilidades a nivel tecnolóxico: macroalgas deshidratadas, macroalgas hidrolizadas enzimaticamente, extractos acuosos e extractos acuosos hidrolizados. As macroalgas son secadas habitualmente para prolongar a súa vida útil, e neste caso as macroalgas deshidratadas obtivéronse secando as mostras a baixa temperatura (<40 ºC) durante 4-5 días antes de moelas nun micro muíño (Komodin K-160 P, Lleal, Granollers, España) para obter as mostras en po. As macroalgas seleccionadas tamén foron sometidas a unha hidrólise enzimática para mellorar tanto a dixestibilidade dos carbohidratos como das proteínas. Para elo, as mostras incubáronse durante 24 h nunha solución acuosa (1:15 macroalgas:auga; en peso) que contiña 200 µl/100 ml de solución (pH 6, 50 ºC) do enzima Pectinex Ultra tropical (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), e 200 µl/100 ml de solución (pH 8, 55ºC) do enzima Alcalase (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania). Os enzimas inactiváronse elevando a temperatura a 90ºC durante 15 minutos. Despois, as macroalgas hidrolizadas foron liofilizadas. Os extractos acuosos preparáronse co obxectivo de obter os compostos de interese (principalmente polisacáridos solubles). Para elo, mesturáronse as mostras con auga (1:30 m:v) e sometéronse a unha autohidrólise nun reactor a presión Parr, o cal foi empregado en modo non isotérmico a 160ºC e 110 psi. O sobrenadante foi entón recollido e secado cun secador por pulverización (Büchi B-290, Flawil, Suíza) equipado cun ciclón estándar (boquilla de 1,5 mm). Os axustes de funcionamento foron 115ºC de temperatura de entrada, 4 ml/min (bomba ao 15%) de caudal da solución de alimentación e 1050 L/h de caudal de aire de atomización e 4,1 bar de presión. Finalmente, obtívose o extracto acuoso das macroalgas hidrolizadas enzimáticamente, xa que esta hidrólise enzimática rompe as paredes celulares e libera os compostos de interese. As mostras mesturáronse con auga (proporción 1:10) que contiña o enzima Celluclast (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) ao 4%, e a mestura foi incubada a 50 ºC durante 6 h. O enzima inactivouse elevando a temperatura a 90 ºC durante 15 minutos. A continuación, o sobrenadante secouse e moeuse como se describiu anteriormente. Obtivéronse diferentes produtos para cada especie de macroalgas, en función das súas características e interese comercial. Deste conxunto de produtos, determináronse aqueles con maior potencial para mellorar a saúde intestinal dos coellos, os cales foron empregados para as probas *in vivo*, tanto en granxa experimental como en granxa comercial.

## 3.2. DESEÑO EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Caracterización das macroalgas e potenciais efectos *in vitro* sobre a saúde intestinal dos coellos

En primeiro lugar, os diferentes produtos derivados destas macroalgas foron caracterizados *in vitro* para determinar os seus potenciais beneficios sobre a saúde intestinal dos coellos. Para elo, determinouse a súa composición química, a dixestibilidade *in vitro* da materia seca e da

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proteína, a fermentabilidade cecal e produción de ácidos graxos volátiles *in vitro* e as concentracións mínimas inhibitorias contra os principais patóxenos de interese (Capítulo I). As macroalgas con mellores resultados nas probas *in vitro* foron seleccionadas para o seu estudo en granxas experimentais e comerciais. Ademais, determinouse a composición mineral das macroalgas (Capítulo II), en formato deshidratado e como extracto acuoso, mediante a dixestión ácida e a extracción alcalina das mostras, que foron analizadas mediante ICP-MS (espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente).

### 3.2.2. Probas experimentais *in vivo*

Todos os procedementos experimentais adecuáronse ás directrices españolas para o coidado e utilización de animais en investigación (Real Decreto 1386/2018). Os procedementos foron aprobados polo Comité de Bioética da Universidade Politécnica de Madrid, España (código de protocolo 2021-002, aprobado o 24 de febreiro de 2021) (Anexo I).

#### 3.2.2.1. Probas en granxa experimental

Inicialmente, realizáronse dúas probas (en xuño e en decembro de 2022) na granxa experimental cunícola da Universidade Politécnica de Madrid (UPM), onde se incluíron 4 dietas experimentais e unha de control. Nestes pensos incluíronse 4 produtos de macroalgas ao 1.025% (*S. latissima* en forma deshidratada e como extracto acuoso hidrolizado, *H. elongata* como extracto acuoso e *Ulva* spp. como extracto acuoso hidrolizado). Nestas probas, o obxectivo inicial era estudar os efectos das macroalgas sobre os parámetros produtivos e a saúde intestinal dos coellos. Sen embargo, en ambas probas os cazapos sufriron brotes moi significativos de enteropatía epizoótica que provocaron moi elevadas mortalidades. Por tanto, os resultados derivados destas probas non foron concluíntes, aínda que aportaron información relevante en termos de dixestibilidade fecal e produción de AGV [144]. A pesares destas dificultades, estas probas foron aproveitadas para obter resultados acerca dos efectos das macroalgas sobre a calidade da carne, perfil antioxidante e estudo sensorial (Capítulo IV) e sobre o perfil mineral da carne e das vísceras (Capítulo V).

#### 3.2.2.2. Proba en granxa comercial

A partires das conclusións obtidas destas dúas probas experimentais, deseñouse a proba realizada na granxa comercial (Granxa Dobaro) situada en Sta. María del Páramo (León), en abril de 2023. Nesta proba incluíronse un control e 3 tratamentos experimentais, os cales consistiron en *S. latissima* deshidratada (0,25%), *Ulva* spp. deshidratada (1%) e extracto de *Ulva* spp. (0,04%). Os animais foron alimentados con cada dieta desde a desteta (33 días de idade) ata o sacrificio (61 días de idade). Durante este tempo, recolléronse os datos produtivos dos animais, e aos 14 días post-desteta, tomáronse as mostras necesarias para determinar os efectos destas macroalgas sobre a saúde intestinal dos coellos (Capítulo III).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

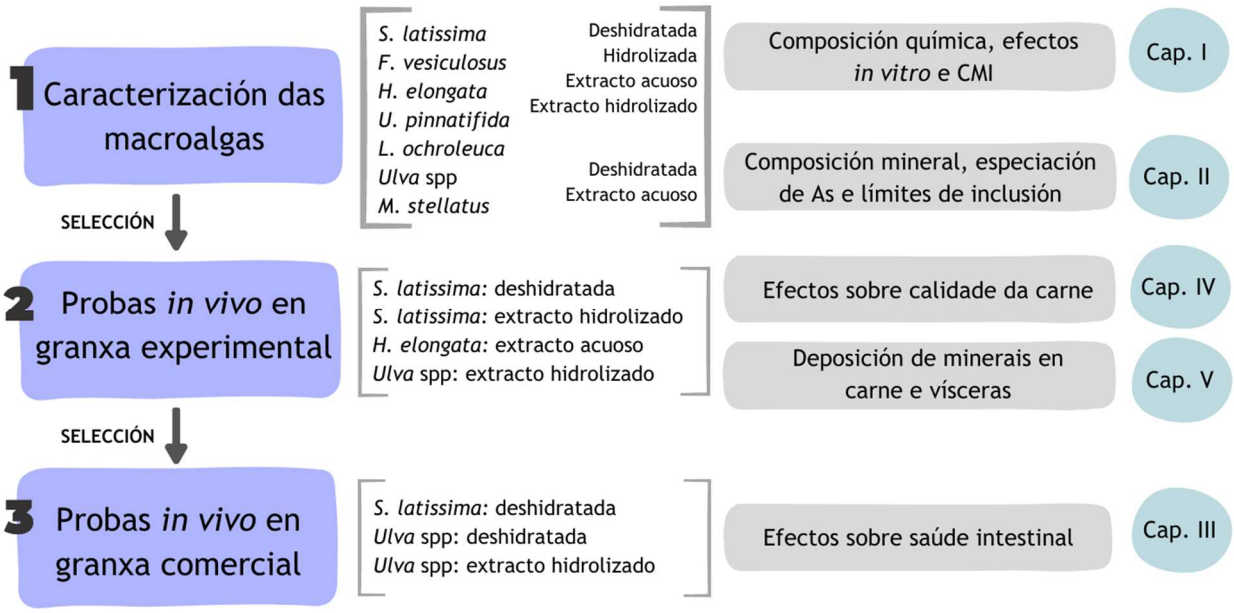



**Figura 3.1. Resumo esquemático do deseño experimental realizado e os correspondentes capítulos onde se expoñen os resultados obtidos.**

## 3.3. MÉTODOS EMPREGADOS

### 3.3.1. Capítulo I: Estudo *in vitro*: dixestibilidade, fermentabilidade cecal e actividade inhibidora microbiana de sete especies de macroalgas de Galicia.

Neste capítulo estudáronse as sete especies de macroalgas seleccionadas en diversos formatos en función de cada especie, tal e como se mostra na Táboa 3.2.

**Táboa 3.2. Especies de macroalgas empregadas e tipo de mostra probada de cada unha delas.**

| Especie macroalga | Tipo de mostra probada |
|---|---|
| *Saccharina latissima* | -Deshidratada<br>-Hidrolizada<br>-Extracto acuoso<br>-Extracto acuoso hidrolizado |
| *Fucus vesiculosus* | -Deshidratada<br>-Hidrolizada<br>-Extracto acuoso hidrolizado |
| *Himanthalia elongata* | -Deshidratada<br>-Hidrolizada<br>-Extracto acuoso |
| *Undaria pinnatifida* | -Deshidratada<br>-Hidrolizada<br>-Extracto acuoso |
| *Laminaria ochroleuca* | -Hidrolizada<br>-Extracto acuoso hidrolizado |
| *Ulva* spp. | -Deshidratada<br>- Hidrolizada<br>-Extracto acuoso hidrolizado |
| *Mastocarpus stellatus* | -Extracto acuoso hidrolizado |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

#### 3.3.1.1. Dixestibilidade *in vitro*

A dixestibilidade ileal e fecal *in vitro* da materia seca (MS) e a dixestibilidade fecal da proteína bruta (PB) determináronse en todas as mostras seguindo os protocolos descritos para alimentos de coellos [145,146], utilizando o método adaptado de bolsas Ankom [147]. Brevemente, pesáronse 0,5 g de cada mostra e colocáronse nunha bolsa de filtro Ankom® (Ankom Technology, Fairport, NY, EEUU). As bolsas introducíronse nun frasco da incubadora *Daisy* $^{II}$ e incubáronse primeiro cunha solución de HCl + pepsina (0,25 g de pepsina/g de mostra, pepsina da mucosa gástrica porcina P7000-100G, Sigma, Darmstadt, Alemania) durante 2 h (paso 1: estómago), despois cunha solución de pancreatina (1 g de pancreatina/g de mostra, pancreatina de páncreas porcino P7545-100G, Sigma, Darmstadt, Alemania) durante 3 h 30 min (paso 2: intestino delgado), e finalmente con Viscozyme durante 16 h (paso 3: cego). O peso dos residuos obtidos nos pasos 2 e 3 utilizouse para determinar a dixestibilidade *in vitro* ileal (IDMSiv) e fecal (CDMSiv) da materia seca, respectivamente. A dixestibilidade fecal *in vitro* da proteina bruta (CDPBiv) determinouse analizando o contido de nitróxeno (N) no residuo final obtido despois do paso 3. Como mostras de referencia seleccionáronse a polpa de remolacha azucreira e a palla de cereal sen tratar como fontes de fibra altamente e pouco fermentables, respectivamente, e ambas foron sometidas aos procedementos *in vitro* descritos anteriormente.

#### 3.3.1.2. Estimación do valor nutricional

O valor nutricional das mostras estimouse a partir da composición química e da CDMSiv, tal e como se describe para os pensos para coellos [148]. As ecuacións correspondentes úsanse xeralmente para a dieta completa e non para os ingredientes individuais, polo que as estimacións obtidas son só orientativas, aínda que axudaron a clasificar os diferentes produtos de macroalgas. Utilizáronse as seguintes ecuacións [148] para estimar a dixestibilidade fecal aparente da MS (CDMS) e da enerxía bruta (CDE) e o contido enerxético dixerible (ED):

$$CDMS = -0{,}019 + 0{,}98 \times (CDMSiv\ /100)$$

$$CDE = -0{,}003 + 0{,}95 \times (CDMSiv\ /100)$$

$$ED\ (MJ/kg\ MS) = 1{,}63 + 15{,}0 \times (CDMSiv\ /100).$$

#### 3.3.1.3. Fermentación cecal *in vitro* e produción de AGV

A potencial fermentabilidade de todas as mostras no cego avaliouse mediante a medición da produción de gas *in vitro* despois da incubación de mostras con inóculo cecal de coellos, segundo o descrito por Abad-Guamán et al. [149]. Os residuos insolubles obtidos tras o paso 2 do procedemento de dixestibilidade da MS *in vitro* dos produtos de macroalgas tamén se incubaron *in vitro* nas mostras nas que o CDMSiv estaba por debaixo do 93%, xa que non había residuos suficientes para mostras que tiñan valores de CDMSiv superiores. As mostras (200 mg MS) pesáronse en frascos de fermentación de 60 ml.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un total de catro coellos híbridos cruzados sen sexar (Blanco de Nova Zelanda × California, liña V × R da UPV, Valencia, España), destetados aos 30 días de idade e alimentados cunha dieta estándar (16,1% PC, 42,1% fibra dietética total (FDT), 32,6% fibra neutra deterxente (FND), 9,51% fibra soluble (FS)), foron sacrificados por concusión cerebral aos 67 días de idade e 2,3±0,03 kg de peso corporal, que é o peso habitual no mercado en España. En consecuencia, houbo 4 réplicas, igual que nun estudo anterior [149]. Os cegos dos 4 coellos separáronse inmediatamente, pesáronse coidadosamente 8 g de dixesta cecal de cada coello e mesturáronse por separado con 800 ml de solución tampón de Goering e Van Soest [150], e as mesturas foron homoxeneizadas durante 1 min cunha batidora doméstica. Engadíronse inmediatamente 20 mL da mestura a cada vial coa axuda dunha bomba peristáltica (Watson-Marlow 520UIP31; Watson-Marlow Fluid Technology Group, Cornwall, Reino Unido). Os frascos seláronse con tapóns de goma e incubáronse a 39 °C. A produción de gas foi medida cun transdutor de presión (Wide Range Pressure Meter; Sper Scientific LTD, Scottsdale, AZ, EEUU) e unha xiringa de plástico ás 3, 8, 12, 24. , 30, 36, 48, 58, 75, 103 e 119 horas. Despois de cada medición, o gas producido foi liberado.

Despois de 24 h de incubación, recolleuse 1 mL do contido de cada vial mediante unha xiringa de insulina e mesturouse con 80 µL de $H_2SO_4$ ao 10 % para deter a fermentación. Esta mostra utilizouse para analizar a produción de AGV, naquelas mostras que ás 48 h de incubación produciron unha cantidade de gas significativamente maior que a palla de cereal sen tratar utilizada como referencia (produción de gas > 45 ml/g MS). As mostras foron procesadas segundo o descrito por Ocasio-Vega et al. [151] e a concentración de AGV foi medida por cromatografía de gases [152] empregando un cromatógrafo de gases Pelkin Elmer Autosystem XL (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, EEUU) equipado cun inxector automático, un detector de ionización de chama e unha columna semi-capilar (TR-FFAP 30 m× 0,53 mm × 1 µ m; Supelco, Barcelona, España).

Cada mostra (19 produtos de macroalgas + 12 residuos insolubles da dixestibilidade *in vitro* de dous pasos + 2 ingredientes de referencia) foi incubada con cada un dos 4 inóculos cecais para obter 4 réplicas por mostra, facendo un total de 132 viais con substrato. Ademais, incubáronse 8 viais sen substrato (brancos; 2/inóculo) para corrixir a cantidade de gas e AGV para a produción endóxena en cada momento de medición.

3.3.1.4. Concentracións mínimas inhibitorias (CMI)

O potencial antimicrobiano das 19 mostras de produtos de macroalgas foi testado con 6 cepas de bacterias patóxenas aeróbicas (cepas adquiridas do CECT (Colección Española de Cultura Tipo, Universidade de Valencia): *Escherichia coli* (CECT 727 e CETC 434), *Salmonella typhimurium* (CECT 4594), *Salmonella enteritidis* (CECT 4300), *Listeria monocytogenes* (CECT 4032) e *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 108). Tamén se testou con 6 cepas de bacterias patóxenas anaerobias (proporcionadas pola CECT): *Clostridium perfringens* (CECT 376, CECT 486 e CECT 563) e *Clostridium difficile* (CECT 531, CECT 9136 e CECT 9137). Ademais, testáronse 2 bacterias patóxenas aeróbicas obtidas de coellos destetados:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*Escherichia coli* R1 e R2 (proporcionadas polo Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC, Universidade de Santiago de Compostela, España).

As cepas de bacterias liofilizadas reconstituíronse seguindo as directrices do CECT. Confirmouse a viabilidade, a capacidade de multiplicación e a identificación en medios de cultivo selectivos/diferenciais e en condicións de temperatura, tempo e osíxeno adecuadas para cada xénero: ágar VRBL-Violet Red Bile Glucose para *E. coli*, ágar cromoxénico SM2-chromID para *Salmonella*, ágar cromoxénico ALOA para *Listeria* spp., ágar CFC para *Pseudomonas* spp., e ágar reforzado para *Clostridium*. A continuación, as cepas conxeláronse en tubos con criobolas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (-20 °C) ata o seu uso.

A maior concentración de produtos de macroalgas probadas neste estudo (8,2 mg/ml) foi seleccionada para reproducir as condicións *in vivo* cando se usan macroalgas na alimentación animal, con niveis de ata o 2,5% de macroalgas na dieta [56,59,62]. Asumiuse un factor de dilución duns 3,28 debido ao consumo de auga, xa que nos coellos pode ser duns 1,5 g de auga/g de penso, aínda que este pode ser maior dependendo do tipo de fibra dietética. Os potenciais efectos beneficiosos das macroalgas na nutrición dos animais/coellos observáronse ao redor do 1-2% da dieta [56,59,62].

*3.3.1.4.1. Microorganismos aeróbicos: método de dilución en caldo*

O método utilizado para avaliar o potencial antimicrobiano dos produtos de macroalgas coas cepas aeróbicas foi a microdilución serial en microplacas de poliestireno, seguindo as recomendacións do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [153].

Pesáronse alícuotas de cada mostra (65 mg) e disolvéronse en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) ao 1%, para acadar unha concentración inicial de 32,5 mg/mL de DMSO. Para eliminar as impurezas presentes, as mostras diluídas filtráronse a través dun filtro de 0,22 µm en tubos estériles. A partir deste extracto inicial, realizáronse dilucións seriais dobres en medio de cultivo (caldo Mueller-Hinton), que é ideal para o crecemento destas bacterias en microplacas. Polo tanto, as concentracións probadas oscilaron entre 0,03 e 8,2 mg/mL (0,03, 0,06, 0,13, 0,26, 0,51, 1,02, 2,05, 4,10 e 8,2 mg/mL).

As 8 cepas de bacterias aeróbicas probadas diluíronse en caldo Mueller-Hinton ata unha concentración de $10^8$ ufc/ml (correspondente ao estándar 0,5 MacFarland). Para o ensaio, utilizouse unha microplaca de 96 pozos para cada mostra de macroalgas. Distribuíronse alícuotas (50 µl) da correspondente dilución do produto de macroalgas e da solución bacteriana en cada pozo individual. Utilizouse o DMSO (1:10) como control negativo e o ácido láctico (40%) como control positivo. Realizáronse as placas por duplicado para cada produto de macroalgas. As microplacas incubáronse a 37ºC durante 24 h antes da interpretación dos resultados. A CMI determinouse como a concentración máis baixa da mostra que inhibiu completamente o crecemento das bacterias nos pozos de microdilución.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*3.3.1.4.2. Microorganismos anaerobios: método de dilución en agar*

Para as cepas bacterianas anaerobias, o método utilizado para avaliar o potencial antimicrobiano das mostras de macroalgas foi o método de dilución en ágar, seguindo as directrices do CLSI [154].

Os produtos de macroalgas probáronse en 2 concentracións diferentes (6 e 8,2 mg/mL). As mostras pesáronse (0,32 e 0,20 g, respectivamente) e disolvéronse en 2 mL de DMSO/EtOH 50%; e despois foron diluídas en 18 ml de ágar reforzado para *Clostridium* a 50 °C. Cada mostra foi completamente mesturada, e despois transferiuse a unha placa de Petri (19 mostras x 2 concentracións) e deixouse solidificar completamente. Inoculáronse alícuotas (2 µl) de cada unha das 6 cepas de *Clostridium* en cada placa, por duplicado ($10^8$ ufc/ml, 0,5 McFarland ABS). Usouse ácido láctico (40%) como control positivo, e como control negativo unha placa idéntica sen produtos de macroalgas coas mesmas cepas de *Clostridium*. As placas incubáronse en caixas de anaerobiose a 37 °C durante 48 h. Preparáronse placas por duplicado para cada produto de macroalgas e testouse cada concentración. Os resultados consideráronse negativos se as bacterias eran capaces de crecer no ágar que contén os produtos de macroalgas e positivos se se inhibía a proliferación bacteriana.

3.3.1.5. Composición química

Utilizáronse os métodos AOAC (2000) para determinar a materia seca (método 934.01), as cinzas (método 942.05), o nitróxeno (N; método 968.06), a fibra dietética total (985.29), a fibra ácido deterxente (FAD) e a lignina ácido deterxente (LAD) nos produtos de macroalgas e nos ingredientes de referencia (973.18, [155]). A fibra neutro deterxente (FND) determinouse mediante o sistema de bolsas de filtro [156] (Ankom Technology, Nova York, EEUU), con amilasa termoestable e sen engadir sulfito sódico. A FND corrixiuse polo contido de cinzas e proteínas, como se indica para a fibra dietética total, mentres que as FAD e LAD só se corrixiron polo contido de cinzas do residuo de LAD. A fibra soluble (FS) calculouse por diferenza, como FDT-FND. A proteína bruta (PB) calculouse como N × 5 [157]. A diferenza 100-cinzas-PB-FDT calculouse para estimar a fibra dietética potencial non retida en FDT (RES), asumindo niveis baixos (<10%) de azucres/oligosacáridos, amidón e extracto de éter nas mostras.

3.3.1.6. Análise estatística

Os valores de produción de gas medidos en cada tempo e os valores de AGV ás 24 h foron corrixidos pola cantidade de gas e AGV, respectivamente, producidos nos brancos correspondentes para descontar a produción endóxena do contido cecal utilizado como inóculo [151]. Os datos de produción de gas foron analizados mediante un modelo mixto para medicións repetidas, incluíndo a mostra, o tempo de medición e a súa interacción como efectos fixos, e o inóculo (coello doador) como efecto aleatorio. O modelo aplicouse mediante o procedemento PROC MIXED no paquete SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EEUU). Axustouse unha estrutura de simetría composta heteroxénea xa que deu o valor máis baixo do criterio Bayesiano de Schwarz [158]. Cando o efecto da mostra ou a súa interacción co tempo de medición foi significativo, utilizouse un test de Dunnett para comparar o valor de cada produto de macroalgas co dos ingredientes de referencia (palla de cereal sen tratar e polpa de remolacha). Probáronse as relacións entre a produción de gas ás 24 h e a composición química das mostras mediante

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

análises de correlación lineal e cuadrática utilizando os procedementos CORR e GLM no paquete SAS. A produción de AGV analizouse ás 24 h cun modelo mixto incluíndo a mostra como efecto fixo e a do inóculo (coello doador) como efecto aleatorio. Utilizouse o test de Dunnett para comparar o valor de cada produto de macroalgas co dos ingredientes de referencia (palla e polpa de remolacha).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 3.3.2. Capítulo II: Avaliación de macroalgas e extractos de macroalgas como fonte de minerais en múltiples sistemas de produción gandeira.

#### 3.3.2.1. Preparación das mostras e análise de macro e microelementos

A determinación de macro e microelementos realizouse para todas as mostras de macroalgas deshidratadas e os seus extractos secos, das sete especies de macroalgas seleccionadas. Cada mostra foi analizada por triplicado e realizouse un control de calidade analítica ao longo do proceso.

##### *3.3.2.1.1. Dixestión ácida*

O proceso de dixestión das mostras realizouse mesturando 0,3 g de cada mostra con 3 mL de ácido nítrico concentrado ao 69% (TMA, Hiperpure, PanReac, Barcelona, España) e 1 mL de auga ultrapura. Estas preparacións foron dixeridas nun sistema de dixestión asistida por microondas (Ethos Plus, Milestone, Sorisole, Italia) a 260 °C e 40 bar durante 1 h [159,160]. Cada mostra dixerida foi transferida a un tubo de polipropileno e diluída ata 50 ml con auga ultrapura.

##### *3.3.2.1.2. Extracción alcalina*

Para analizar o contido de iodo seguíronse as directrices da Norma Europea para espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente ou ICP-MS (EN 15111:2007). Para elo, mesturouse 0,1 g de mostra con 5 ml de auga ultrapura e 1 ml de solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemaña). As mostras colocáronse nun forno prequentado a 90 °C durante 3 h. Despois arrefriáronse todas as mostras a temperatura ambiente, axustouse o volume ata 25 ml con auga ultrapura e centrifugáronse (4.000 rpm, 15 min). Os sobrenadantes filtráronse (0,45 µm) e determinouse o iodo mediante ICP-MS durante ese mesmo día.

##### *3.3.2.1.3. ICP-MS*

As concentracións de macrominerais (Ca, Mg, P, K, Na e S), de microminerais (Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se e Zn) e de elementos potencialmente tóxicos (Cd, Hg, Pb e As) determináronse mediante ICP-MS 7900 (Agilent, EEUU) seguindo as condicións de análise descritas por de Oliveira Filho *et al.* [160].

Os resultados do control de calidade analítica deste estudo resúmense na Táboa 3.3. En todos os lotes de mostras engadíronse varias mostras en branco, e os límites de detección (LD) calculáronse como tres veces o SD dos brancos. As mostras de referencia certificadas analizáronse seguindo os mesmos procedementos, e as recuperacións das mostras de referencia foron coincidiron cos niveis certificados dos 2 materiais de referencia certificados empregados ("Apple leaves" (NIST-1515) subministrado polo "National Institute of Standards & Technology", Gaithersburg, EEUU; e "Seaweed" (ERM-CD200) subministrado polo "Institute for Reference Materials and Measurements", Geel, Bélxica). Para os minerais que non estiveron certificados por estes CRM (Na e I), empregáronse mostras enriquecidas a concentracións que

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

producen valores de intensidade de ata 10 veces os valores esperados, obtendo recuperacións do 86-93%.

**Táboa 3.2. Límites de detección (LD) (µg/kg) de cada elemento, niveis certificados (mg/kg) e % de recuperación dos materiais de referencia certificados.**

| | | NIST 1515 | | ERM-CD200 | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Mineral** | **LD** | **Niveis certificados** | **Recuperación (%)** | **Niveis certificados** | **Recuperación (%)** |
| Ca | 9,56 | 15250 | 109 | - | - |
| Mg | 0,31 | 2710 | 94 | - | - |
| P | 7,72 | 1593 | 113 | - | - |
| K | 7,37 | 16080 | 106 | - | - |
| S | 6,13 | 1800 | 125 | - | - |
| Co | 0,005 | 0,09 | 99 | - | - |
| Cr | 0,03 | 0,3 | 87 | - | - |
| Cu | 0,013 | 5,69 | 93 | 1,71 | 111 |
| Fe | 0,19 | 82,7 | 91 | - | - |
| Mn | 0,02 | 54,1 | 88 | - | - |
| Mo | 0,006 | 0,095 | 95 | - | - |
| Ni | 0,014 | 0,936 | 92 | - | - |
| Se | 0,005 | - | - | 0,088 | 124 |
| Zn | 0,18 | 12,45 | 88 | 25,3 | 123 |
| Cd | 0,005 | 0,0132 | 96 | 0,95 | 96 |
| Hg | 0,013 | 0,0432 | 102 | 0,0186 | 69 |
| Pb | 0,002 | 0,470 | 75 | 0,51 | 73 |
| As | 0,006 | - | - | 55 | 104 |

3.3.2.2. Especiación de arsénico

Para a especiación de As, as mostras foron dixeridas mediante o método de bloque en quente asistido por microondas [161]. Para elo, mesturáronse 0,5 g de mostra con 10 mL de $HNO_3$ ao 1% dentro de tubos TFM (Milestone, Sorisole, Italia) que despois foron tapados e colocados nun sistema de bloques de dixestión precalentado (95 °C, 90 min). Despois deste proceso, as mostras foron arrefriadas a temperatura ambiente, centrifugadas (3.500 rpm, 10 min) e os sobrenadantes foron filtrados (0,45 µm). Diluíuse 1 g dos sobrenadantes filtrados cunha fase móbil (fosfato amónico 10 mM, pH 8,25), obtendo pHs que oscilaron entre 6 e 8,5. Despois colocáronse as solucións en frascos de polipropileno. O método de especiación de As realizouse en base ao método descrito por Juskelis *et al*. [162] empregando un sistema de cromatografía líquida de alto rendemento-espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS). As mostras foron analizadas mediante un equipo Agilent

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7900 (EEUU) conectado a un HPLC (Agilent 1260, EEUU) cunha columna de intercambio aniónico (Hamilton PRPX100).

As diferentes fraccións de arsénico foron determinadas tras calibrar o equipo coas solucións patrón para cada especie de arsénico [162]. O As inorgánico total (iAs) calculouse como a suma de As (III) e As (V), e o As orgánico determinouse como a suma de ácido dimetilarsínico (DMA), ácido monometilarsónico (MMA), arseno-azucres e arsenobetaína (AsB). Debido á ausencia de patróns de calibración, os arsenosucres cuantificáronse aplicando un método de calibración independente segundo as curvas de calibración das especies patrón de elución máis próximas [163,164]. As outras especies de As foron validadas mediante a inclusión de solucións en branco para a determinación dos límites de detección, así como varias réplicas do material de referencia "Rice Flour" (SRM 1568b), proporcionado polo "National Institute of Standards & Technology" (Gaithersburg, EEUU). Os resultados deste control de calidade para a especiación de As recóllense na Táboa 3.4.

**Táboa 3.4. Límites de detección (µg/L) de cada elemento, niveis certificados (mg/kg) e % de recuperación do material de referencia certificado para a especiación de arsénico.**

| | Fariña de arroz (SRM 1568b) | | |
|---|---|---|---|
| | LD | Niveis certificados | Recuperación (%) |
| DMA | 0,196 | 0,180 | 118 |
| MMA | 0,0262 | 0,0116 | 108 |
| iAs | 0,3823 | 0,092 | 101 |

LD: límites de detección; DMA: ácido dimetilarsínico; MMA: ácido monometilarsónico; iAs: As (III) + As (V).

3.3.2.3. Cálculo do nivel máximo de inclusión de macroalgas deshidratadas e extractos en alimentación animal

O nivel máximo de inclusión das macroalgas deshidratadas e os seus extractos foi calculado para os elementos traza esenciais e potencialmente tóxicos analizados, en porcos, pitas poñedoras, polos de engorde, ruminantes, vacún de leite, coellos e peixes. Estes cálculos baseáronse na concentración total permitida pola lexislación vixente da UE en pensos completos (os Regulamentos CE 1334/2003 e UE 1039/2018 empregáronse no caso de Co, Cu, Fe, Mn, Se e Zn; o Regulamento CE 1459/2005 empregouse para o I; e a Directiva CE 32/2002 e o Regulamento CE 1275/2013 para As, Cd, Hg, Pb); e na concentración basal de minerais das dietas estándar de diferentes especies gandeiras, sen suplementos minerais adicionais [165]. Dado que non existe unha lexislación que estableza os niveis máximos de macrominerais en alimentación animal, empregáronse os niveis máximos tolerables de minerais para cada especie [103] Os cálculos realizáronse tal como se describe na seguinte ecuación:

$$[M]\text{dieta} \times (100 - I\ \text{algas}) + [M]\text{algas} \times I\ \text{algas} = [M]\text{total} \times 100$$

[M]dieta: concentración basal do mineral na dieta estándar (expresada en mg/kg MS).

[M]algas: concentración do mineral da macroalga (expresada en mg/kg MS).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[M]total: concentración máxima permitida do mineral na lexislación vixente (expresada en mg/kg MS; adaptada do penso completo considerando o 88% MS).

I algas: Nivel máximo de inclusión de macroalga na dieta (expresado en %).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 3.3.3. Capítulo III: Inclusión de tres produtos de macroalgas nas dietas dos coellos: efectos sobre os rendementos produtivos e a saúde intestinal

#### 3.3.3.1. Ensaio experimental

Os produtos de macroalgas foron seleccionados segundo os resultados obtidos da súa caracterización *in vitro* (Capítulo I) e os resultados observados nas granxas experimentais [144]. Con estes criterios, probáronse dúas macroalgas: *Saccharina latissima* (kombu de azucre, dieta SL) e *Ulva* spp (leituga de mar), ambas en formato deshidratado, e no caso de *Ulva* spp tamén como extracto acuoso hidrolizado (dietas U e EU). As mostras deshidratadas foron preparadas segundo o descrito na sección 3.1. No caso do extracto acuoso hidrolizado, a mostra de *Ulva* spp foi mesturada con auga (proporción 1:10) que contiña o encima Celluclast (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) ao 4%. A mestura incubouse a 50ºC durante 6 h e despois o encima foi inactivado elevando a temperatura a 90 ºC durante 15 min. Os ulvanos precipitáronse con etanol (proporción 1:4) e filtrouse a solución. O sobrenadante descartouse e a fracción sólida foi secada e moída.

Neste ensaio probáronse catro dietas experimentais con tres produtos de macroalgas. A dieta control formulouse considerando os estándares nutricionais para coellos en crecemento [166] (ver Táboa 3.5). As macroalgas engadíronse adicionalmente á dieta control (Táboa 3.5) nas seguintes doses: SL ao 0,25%, U ao 1% e EU ao 0,04%. A composición química de cada dieta experimental móstrase na Táboa 3.6. As doses de inclusión dos produtos de macroalgas foron baixas e diferentes segundo as especies, e no caso de *S. latissima* axustáronse para evitar superar o límite máximo de iodo permitido na lexislación para pensos completos (Regulamento CE 1459/2005). O extracto de *Ulva* spp (EU) empregouse en menor dose que a macroalga deshidratada (U), xa que o extracto presentou unha maior concentración dos polisacáridos de interese (ulvanos).

Un total de 96 camadas (8 coellos/camada) de coellos destetados de sexo mixto (New Zealand White X Californian) foron asignadas aleatoriamente a cada grupo experimental. Cada grupo estivo composto por 192 coellos (24 camadas/tratamento), que foron alimentados *ad libitum* con estas dietas desde a desteta (33 días de idade, 905 ± 15,7 g) ata o sacrificio (61 días de idade, 2016 ± 20,8 g). Os coellos aloxáronse de forma colectiva (8 coellos por gaiola) e tiveron acceso *ad libitum* á auga.

Dez días despois da desteta produciuse un brote dunha enfermidade dixestiva de etioloxía non identificada, e ao ser unha granxa comercial, os coellos tiveron que ser tratados con estreptomicina durante 4 días.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 3.5. Formulación da dieta control (%).**

| Ingrediente | % |
|---|---|
| Fariña de alfalfa | 15 |
| Salvado de trigo | 10 |
| Polpa de remolacha | 15 |
| Fariña de xirasol | 19 |
| Trigo | 17 |
| Fariña de palmiste | 4 |
| Cascarilla de avea | 5 |
| Palla | 10 |
| Melaza de remolacha | 4 |
| DDGS de millo | 1 |
| Aceite de soia | 0,5 |
| Cloruro de sodio | 0,3 |
| Premestura de vitaminas e minerais 1 | 0,3 |
| Diclazuril 0,5% | 1 ppm |
| Sulfato de L-lisina | 0,21 |
| L-treonina | 0,084 |

[1] A premestura de vitaminas e minerais proporcionou as seguintes substancias por kg de dieta: Vit A: 10.000 UI; Vit D3: 1.000 UI; Vit E: 40 mg; Vit K3: 2 mg; Vit B1: 2 mg; Vit B2: 6 mg; Vit B6: 3,9 mg; Vit B12: 15 µg; niacina: 40 mg; biotina: 100 µg; ácido fólico: 1 mg; Mn: 10 mg; I: 1 mg; Fe: 50 mg; Cu: 8 mg; Zn: 50 mg; Co: 0,2 mg; Se: 0,2 mg.

**Táboa 3.6. Composición química das dietas experimentais (% peso fresco)**

| Composición química | Control | *Saccharina latissima* | *Ulva* spp | Extracto de *Ulva* spp |
|---|---|---|---|---|
| Humidade | 10,7 | 10,6 | 11,0 | 10,4 |
| Cinza | 6,93 | 6,85 | 6,98 | 7,08 |
| Proteína bruta 1 | 13,9 | 13,8 | 13,9 | 14,1 |
| Fibra neutro deterxente | 32,9 | 33,0 | 34,1 | 34,6 |
| Fibra ácido deterxente | 20,2 | 19,9 | 20,0 | 19,9 |
| Iodine (mg/kg) | 1,12 | 7,41 | 1,20 | 1,14 |

[1] A dieta control estivo composta polos seguintes aminoácidos (datos calculados): 0,64 lys, 0,48 met + cys, 0,58 Thr, 0,17 Trp, 0,66 Val, 0,52 Ile, 0,89 Leu e 0,87 Arg.

#### 3.3.3.2. Rendementos produtivos

Aos 33, 54 e 61 días de idade controlouse o peso da camada, o consumo de penso e a mortalidade en todos os grupos experimentais (n=24 o 12), para determinar a ganancia media diaria (GMD), a consumo medio diario de alimento (CMDA) e o índice de conversión (IC). O consumo de penso non se rexistrou a día 61 debido a circunstancias da explotación. O consumo de alimento e o índice de conversión calculáronse para cada dúas gaiolas xa que os coellos compartiron o comedeiro (n=12).

#### 3.3.3.3. Toma de mostras

Aos 47 días de idade (14 días despois da desteta), 8 coellos de cada grupo foron seleccionados aleatoriamente e sacrificados por conmoción cerebral e posterior sangrado. O sacrificio tivo lugar entre as 18 e as 20h. De cada animal recolléronse varias mostras para as diferentes análises realizadas.

Para evitar calquera contaminación, en primeiro lugar recolléronse mostras para o illamento *de Escherichia coli.* Con dous hisopos de microbioloxía, tomáronse mostras de dixesta en dous lugares: colon e válvula ileocecal. Os hisopos gardáronse nun medio de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

conservación e refrixeráronse. Para o reconto de coccidios, recolléronse as feces do recto e refrixeráronse ata o seu procesado. Para a determinación do microbioma e das poboacións de *Clostridium*, recolléronse mostras da dixesta a nivel de colon e conxeláronse ata procesalas. Para a determinación das mucinas, recolléronse e conxeláronse mostras intactas de 20 cm de dixesta do íleo distal. Para a análise da expresión xénica, recolléronse segmentos de 2 cm da parte distal do apéndice cecal, limpáronse con solución salina (ClNa 0,9%) sen tocar a mucosa e cortáronse lonxitudinalmente. Despois raspáronse as mostras para obter aproximadamente 50 mg de mucosa, que se introduciu en viais con 1 mL de solución conservadora de ARN, e conxeláronse a -80ºC [167]. Para o estudo morfométrico, recolléronse mostras de 3 cm de lonxitude de xexuno e válvula ileocecal e fixáronse en formol ao 10% durante 24 horas.

3.3.3.4. Estudo histopatolóxico e medidas morfométricas

As mostras fixadas en formalina de xexuno e válvula ileocecal foron cortadas transversalmente en anacos de 0,5 cm, os cales foron procesados de forma rutineira e incluídos en parafina en casetes individuais. De cada mostra, cortáronse seccións histolóxicas de 3 µm de espesor, as cales foron desparafinadas, hidratadas e tinguidas con hematoxilina-eosina e/ou ácido periódico-Schiff (tinción PAS). As mostras foron observadas nun microscopio óptico (Olympus BX51) e obtivéronse as imaxes para o estudo histopatolóxico cunha cámara acoplada ao microscopio (Olympus EP50). As medidas morfométricas realizáronse no software ImageJ (versión 1.54d). A lonxitude das vilosidades e a profundidade das criptas medíronse en 15 vilosidades intactas do xexuno de cada animal [168].

3.3.3.5. Reconto de coccidios

O reconto de coccidios (*Eimeria* spp) en feces realizouse mediante a técnica de flotación con solución salina saturada [169]. Para elo, pesáronse mostras de 3 g de feces nun bote de plástico e engadíronse 42 mL de auga. Engadíronse perlas de vidro co fin de desagregar as feces, axitándoas ata homoxeneizar. A continuación, filtrouse o contido do frasco, primeiro a través dunha malla de 4 mm de diámetro e despois a través dunha malla de 150 µm de diámetro. Co filtrado enchéronse dous tubos de ensaio, e centrifugáronse a 2000 rpm durante 10 minutos, de forma que todos os ooquistes de *Eimeria* spp quedaron depositados no fondo do tubo de ensaio. O sobrenadante foi eliminado coidadosamente e a continuación o sedimento foi homoxeneizado con solución salina saturada ata completar o volume do tubo de ensaio (15 ml). Cunha pipeta Pasteur, enchéronse as dúas células da cámara de conteo McMaster coa mestura, deixándoa repousar durante 2-3 minutos para que todos os ooquistes flotasen. Despois contáronse os ooquistes nun microscopio óptico a 10X, en ambas as células. A cuantificación dos ooquistes por gramo de feces (opg) calculouse seguindo a seguinte ecuación:

$$\text{opg} = \left(\frac{\text{nº oocysts} \times 45\ \text{mL}}{0.3\ \text{mL}}\right)/3\text{g}$$

3.3.3.6. Illamento de *Escherichia coli*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Ambos hisopos (colon e válvula ileocecal) sembráronse en agar lactosa MacConkey (LMAC, Oxoid) e incubáronse a 37ºC durante 18-24 horas. O seu crecemento confluente foi

sometido á reacción en cadea da polimerasa (PCR) para detectar a presenza dos principais virotipos enteropatóxenos *de Escherichia coli*: ETEC, STEC e EPEC; utilizando dianas xenéticas específicas que codifican toxinas (LT, Sta, STb, STx2e), intimina (Eae) e fimbrias (F4, F5, F6, F18 e F41). A partir dos confluentes positivos para PCR, seleccionáronse diferentes colonias similares a *E. coli* (ata 10) e sembráronse en agar triptona soja (TSA, Oxoid), que á súa vez foron analizadas individualmente mediante PCR. En cada mostra, todas as colonias *de E. coli* con diferentes perfís xenéticos de virulencia almacenáronse a temperatura ambiente en caldo nutritivo (Difco) con agar nutritivo ao 0,75%, para unha posterior caracterización.

3.3.3.7. Determinación de *Clostridium perfringens* e *Clostridioides difficile* mediante qPCR

A presenza de *Clostridium perfringens* e *Clostridioides difficile* nas mostras de feces determinouse mediante qPCR. Os cebadores utilizados para a determinación de *C. difficile* foron 5´ CGTCATTAGCATCTTCAGCAGTTG 3´ (avance) e 5´GATGATTTAGCAAAAGTAGTTGTTGCA 3´ (inverso) desenvolvidos por Li et al. [170]; e para *C. perfringens* foron os ClostP 5´ TCTTACACGATGTATCAGAGGGT 3´ (avance) e ClostP 5´ ACATGTAGTCATCTGTTCCAGCA 3´ (inverso) desenvolvidos neste estudo e dirixidos ao xene *plc*. Utilizouse ADN puro illado de *C. perfringens* CECT 376T e de *C. difficile* CECT 531T para o desenvolvemento do método qPCR. Utilizáronse dilucións en serie de ADN puro para realizar unha curva de cuantificación. As reaccións de qPCR estiveron compostas por 5 µL de Power SYBR® Green PCR Mix (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific), 800 nM de cada cebador e 2 µL de mostra de ADN, e enrasáronse con auga ata un volume total de 10 µL. A reacción realizouse nun sistema de PCR en tempo real QuantStudio™ 12k Flex (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific). O ciclo de qPCR levouse a cabo mediante a desnaturalización durante 10 min a 95ºC, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95ºC durante 15 segundos e recocido, e extensión a 60ºC durante 1 min. A continuación realizouse unha análise da curva de fusión, a cal se realizou a 60ºC durante 1 min, seguida dun aumento da temperatura de 0,05ºC/s ata alcanzar os 95ºC.

3.3.3.8. Análise do microbioma

O ADN bacteriano da dixesta do colon extraeuse mediante o DNA Realpure Spin Food-Stool Kit® (Real, Durviz SL, Valencia, España) seguindo as instrucións proporcionadas polo fabricante para as mostras fecais. O ADN obtido cuantificouse mediante un fluorómetro Qubit™4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) e o kit de ensaio de DNA HS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA) e almacenouse a -20°C ata a análise.

Para a secuenciación de amplicones do ARNr 16S utilizáronse 2 µl de ADN extraído de cada mostra para construír as xenotecas. Con este fin, amplificáronse as rexións hipervariables 16S con dous conxuntos de cebadores, v2-4-8 e v3-6,7-9, e as xenotecas preparáronse mediante o Ion 16S™ Metagenomics e o Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kits (Life Technologies). Preparáronse xenotecas con cantidades iguais de produtos de PCR combinados cun código de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

barras utilizando o Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit (Life Technologies). Despois, estas xenotecas foron cuantificadas mediante o Ion Universal Library Quantitation Kit (Life Technologies). A continuación, 10 pM de cada xenoteca foron agrupados e cargados no Ion OneTouch™ 2 System (Life Technologies), que realiza automaticamente a preparación dos modelos. As partículas positivas da esfera iónica enriquecéronse con perlas magnéticas Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) mediante un instrumento Ion One Touch ES. Finalmente, as mostras cargáronse nun chip Ion 520™ (Life Technologies) mediante un secuenciador Ion GeneStudio™ S5 System utilizando os reactivos de carga Ion 520™ e Ion 530™ que se proporcionan no OT2-Kit (Life Technologies).

3.3.3.9. Determinación de mucina ileal

Utilizouse o método de precipitación de etanol para a determinación de mucina, segundo o descrito por Leterme et al. [171] e Romero et al. [172], e usando pectinasa (Sigma P2401) para eliminar a fibra soluble, como foi descrito por Abad et al. [147]. Para o procedemento empregouse un gramo de dixesta ileal de cada coello.

3.3.3.10. Análise PCR cuantitativa da expresión xénica

As mostras de mucosa do apéndice cecal homoxeneizáronse en 1 ml de reactivo NZYol (Nzytech, Lisboa, Portugal) utilizando un homoxeneizador TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemaña) con dúas perlas de circonio de 3 mm por mostra, durante dous ciclos de 1 min a 30 Hz, e 1 min de descanso entre eles. Despois da extracción total do ARN utilizando o reactivo NZYol (Nzytech, Lisboa, Portugal) realizouse un tratamento con DNasa para eliminar o ADN xenómico. A integridade e a cantidade de ARN avaliáronse nun Bioanalizador (Bonsai Technologies, Madrid, España) e nun espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop® Technologies Inc., Wilmington, EUA), respectivamente. O ARN xerado almacenouse a -80 ºC para o seu posterior estudo.

A PCR cuantitativa (Q-PCR) foi realizada para estimar a expresión xénica de xenes relacionados coa inmunidade intestinal (IL-6, IL-10, TNF-α) e as proteínas das unións estreitas (CLDN-1, OCLN, JAM-2, ZO-1), usando a gliceraldehído-3-fosfato deshidroxenasa (*gapdh*) como xene "housekeeping". O ARN total transcribiuse inversamente a ADNc usando o kit de síntese HiScript II 1st stand cDNA (NeoBiotech, Seúl, República de Corea), e realizouse a qPCR nun MX3005P Stratagene usando AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix (NeoBiotech, Seúl, República de Corea). Todos os xenes e os seus cebadores están listados na Táboa 3.7. Todas as reaccións foron realizadas por triplicado. A expresión relativa dos niveis de ARNm dos xenes analizouse mediante o método 2^-Ct, utilizando o xene GAPDH para normalizar a expresión dos xenes e o grupo control como grupo calibrador.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 3.7: Lista de xenes, números de acceso, secuencias de cebadores e tamaños de produtos.**

| Xene | Número de adhesión | Secuencias de cebadores (5¤→3¤) | Tamaño (bp) | Referencia |
|---|---|---|---|---|
| GAPDH | NM_001082253.1 | F: GCCGTGGGGGAATCATACT<br>R: GCCGTGGGGGAATCATACT | 165 | [170] |
| IL-6 | DQ680161 | F: GAGCATCCTGGAGACCATCAA<br>R: CCAGTGCCTCCTTTCTGTTTCA | 83 | [41] |
| IL-10 | D84217 | F: GAGAACCACAGTCCAGCCAT<br>R: CATGGCTTTGTAGACGCTT | 179 | [41] |
| TNF-α | NM_001082263.1 | F: CTCAGGAGGAAGAGTCCCCAA<br>R: GCTACTACGTGGGCTAGAGG | 115 | [170] |
| CLDN-1 | NM_001089316.1 | F: CGTGCCTTGATGGTGATTGG<br>R: TCCGCATCTTTTGCTCCTCA | 112 | [170] |
| OCLN | XM_017344772.1 | F: TCCGACTTCGTGGGAGAGAGT<br>R: AAGCTCATGAACCACCTCGG | 126 | [170] |
| JAM-2 | XM_017346699.1 | F: GGGAGCGGATACCTTTCCTG<br>R: GTATTGCCCACCTTCCCACCA | 128 | [173] |
| ZO-1 | XM_017348360.1 | F: AGAGGATTTGTCAGCCCAGC<br>R: TTTCTCTGGCAACATCGGCT | 125 | [170] |

GAPDH: gliceraldehido-3 fosfato (xene “housekeeping”); IL-6: interleuquina-6; IL-10: interleuquina-10; TNF- α: factor de necrose tumoral-alfa; CLDN-1: claudina-1; OCLN: ocludina; JAM-2: molécula de adhesión da unión-2; ZO-1: zonula occludens-1

#### 3.3.3.11. Análise estatística

O efecto da inclusión dos produtos de macroalgas sobre os parámetros de crecemento, altura das vilosidades, profundidade das criptas, concentración de mucina ileal e expresión xénica foi analizado mediante un ANOVA unidireccional coa dieta como efecto principal. O peso medio inicial da camada incluíuse como covariable para os parámetros de crecemento. A mortalidade analizouse mediante un modelo loxístico (considerando unha distribución binomial) coa dieta como principal efecto, e os resultados transformáronse a partir da escala logarítmica.

Tanto o reconto de coccidios como de *E. coli* analizáronse mediante un modelo loxístico (considerando unha distribución de Poisson) coa dieta como principal efecto, e os resultados transformáronse a partir da escala logarítmica. Tamén se realizou un contraste entre o grupo control e a media dos demais tratamentos, e cando o ANOVA foi significativo, realizouse unha proba post-hoc de Tukey. Estableceuse un nivel de significación de $\alpha=0,05$ e considerouse como unha tendencia cando $0,05 \leq \alpha \leq 0,15$.

No caso do microbioma, para a análise da secuenciación de amplicóns de ARNr 16S as lecturas de secuenciación en bruto obtivéronse do software Torrent Suite (v.5.12.2.) como fastq. Os ficheiros fastq procesáronse co software QIIME 2 v. 2022.11 [174]. Para producir as variantes da secuencia de amplicóns (ASVs), utilizouse o método DADA2 para a filtración de calidade (puntuación Q > 30), o recorte, a eliminación de ruído e a desreplicación. Utilizouse o software STAMP (v 2.1.3) para a "Análise estatística dos perfís taxonómicos e funcionais" [175] para determinar as diferenzas estatísticas nos ASV obtidos, realizando a proba de Kruskal–Wallis H e a proba post -hoc de Tukey–Kramer.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 3.3.4. Capítulo IV: Inclusión de catro produtos de macroalgas nas dietas dos coellos: efectos sobre a calidade da carne.

#### 3.3.4.1. Deseño experimental

Neste ensaio probáronse varias dietas experimentais, cada unha incluíndo un dos catro produtos de macroalgas empregados, comparándoas cunha dieta control sen macroalgas. A dieta control formulouse considerando os estándares nutricionais para coellos en crecemento [166] (ver Táboa 3.8). Preparáronse dous tipos de produtos de *Saccharina latissima* (kombu de azucre): a macroalga deshidratada (dieta DSL) e un extracto acuoso da macroalga hidrolizada (dieta ESL); *Himanthalia elongata* (espaguete de mar) foi probada como extracto acuoso (dieta EHE) e *Ulva* spp. (leituga de mar) foi probada en forma de extracto acuoso da macroalga hidrolizada (dieta EU). A dieta basal complementouse cos produtos de macroalgas nunha dose de 1,025% (p/ w) (Táboa 3.8). Non se engadiron antibióticos a ningunha das dietas durante todo o ensaio. Determinouse a composición química e a dixestibilidade fecal *in vitro* dos catro produtos de macroalgas (Táboa 3.9) e as dietas experimentais (Táboa 3.10) tal e como se describiu anteriormente. O perfil de ácidos graxos de todas as dietas experimentais determinouse como se describe na sección 2.4 e móstrase na táboa 3.11.

**Táboa 3.8. Formulación e composición química da dieta control. En cada dieta experimental (DSL, ESL, EHE, EU), o produto de macroalgas correspondente foi engadido adicionalmente sobre a dieta control a unha dose do 1,025%.**

| **Ingrediente** | **%** | **Ingrediente** | **%** |
|---|---|---|---|
| Alfalfa | 20,00 | Premestura de vitaminas e minerais [1] | 0,30 |
| Salvado de trigo 15% PB | 19,98 | Diclazuril 0,5% | 0,20 |
| Polpa de laranxa | 15,00 | Sulfato de L-lisina | 0,16 |
| Fariña de xirasol integral | 11,82 | L-treonina | 0,09 |
| Cascarilla de avea | 10,00 | **Composición de aminoácidos** | **%** |
| Gluten feed de millo | 8,00 | Lisina | 0,65 |
| Cebada | 4,54 | Metionina | 0,23 |
| Melaza de remolacha | 3,00 | Met + Cys | 0,47 |
| Fariña de soia 47% PB | 2,81 | Treonina | 0,59 |
| Cascarilla de arroz | 2,17 | Arginina | 0,83 |
| DDGS de millo | 1,04 | **Valor nutricional [2]** | |
| Aceite de soia | 0,50 | Enerxía dixestible, kcal/kg | 2237 |
| Cloruro de sodio | 0,39 | Proteína dixerible, % | 10,3 |

[1] A premestura de vitaminas e minerais proporcionou os seguintes elementos, por kg de penso completo: Vit A: 10.000 UI; Vit $D_3$ : 1.000 UI; Vit E: 40 mg; Vit $K_3$: 2 mg; Vit $B_1$: 2 mg; Vit $B_2$: 6 mg; Vit $B_6$: 3,9 mg; Vit $B_{12}$: 15 µg; pantotenato de calcio: 16,30 mg; niacina: 40 mg; biotina: 100 µg; ácido fólico: 1 mg; clorhidrato de betaína: 131,6 mg; Mn: 10 mg; I: 1 mg; Fe: 50 mg; Cu: 8 mg; Zn: 50 mg; Co: 0,2 mg; Se: 0,2 mg. [2] Valores obtidos por Alfonzo et al. [144].

Un total de 40 coellos destetados (New Zealand White X Californian) foron asignados aleatoriamente aos distintos grupos: 4 dietas experimentais e dieta control sen macroalgas nin antibióticos. Cada grupo estivo composto por 8 coellos, que foron alimentados *ad libitum* coas dietas correspondentes entre a desteta (30 días de idade, peso medio 701 ± 80 g) e o sacrificio (63 días de idade; peso medio 2154 ± 162 g). Os coellos foron aloxados individualmente en gaiolas e proporcionouse auga *ad libitum*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 3.9. Composición química dos produtos de macroalgas (% MS).**

| | Deshidratada | Extractos acuosos | | |
|---|---|---|---|---|
| **Composición química** | *S. latissima* (DSL) | *S. latissima* (ESL) | *H. elongata* (EHE) | *Ulva* spp. (EU) |
| Humidade | 6,60 | 4,91 | 7,68 | 19,6 |
| **Por DM** | | | | |
| Cinza | 37,8 | 54,9 | 50,3 | 38,6 |
| Fibra dietética total (FDT) | 33,2 | 4,02 | 20,5 | 37,4 |
| Fibra neutra deterxente (FND) | 11,8 | 0,00 | 1,58 | 0,00 |
| Fibra ácido deterxente (FAD) | 9,07 | 0,00 | 2,74 | 0,00 |
| Lignina ácido deterxente (LAD) | 0,64 | 0,00 | 1,34 | 0,00 |
| Fibra soluble (FS) | 21,4 | 4,02 | 18,9 | 37,4 |
| Proteína bruta (PB) | 19,9 | 15,9 | 6,31 | 6,33 |
| PB-FDT | 5,15 | nd | 2,54 | 1,46 |
| PB-FND | 5,79 | 0 | nd | 0 |
| Extracto etéreo | 3,81 | 3,64 | 3,80 | 10,8 |
| **Dixestibilidade fecal *in vitro*, %** | | | | |
| DMSiv | 68,4 | 99,9 | 98,4 | 100 |
| DMOiv | 59,1 | 99,8 | 97,3 | 99,7 |
| DPBiv | 67,0 | 100 | 94,2 | 100 |

DMSiv: dixestibilidade da materia seca *in vitro*; DMOiv: dixestibilidade da materia orgánica *in vitro*; DPBiv: dixestibilidade da proteína bruta *in vitro*.

**Táboa 3.10. Composición química das dietas experimentais (% MS)**

| **Composición química** | **Control** | **DSL** | **ESL** | **EHE** | **EU** |
|---|---|---|---|---|---|
| Cinza | 8,38 | 8,53 | 8,64 | 8,81 | 8,79 |
| Proteína bruta | 17,0 | 16,9 | 17,0 | 16,4 | 16,6 |
| Extracto etéreo | 3,74 | 3,31 | 3,46 | 3,48 | 3,10 |
| Fibra neutro deterxente | 44,5 | 43,4 | 42,6 | 45,2 | 45,2 |
| Fibra ácido deterxente | 20,1 | 20,0 | 19,7 | 20,5 | 20,4 |
| Lignina ácido deterxente | 3,63 | 3,73 | 3,80 | 4,10 | 4,39 |
| **Dixestibilidade fecal *in vitro* , %** | | | | | |
| DMSiv | 65,0 | 65,9 | 66,2 | 65,5 | 66,5 |
| DPBiv | 89,1 | 88,6 | 89,2 | 91,0 | 91,0 |

DSL: *S. latissima* deshidratada; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva* spp.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 3.11. Composición de ácidos graxos das dietas experimentais (mg/100 g de penso).**

| Ácidos graxos | Dietas experimentais | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Control | DSL | ESL | EHE | EU |
| C6:0 | 1,35 | 1,40 | 1,24 | 1,31 | 1,38 |
| C8:0 | 1,48 | 1,41 | 1,38 | 1,52 | 1,45 |
| C10:0 | 0,664 | 0,651 | 0,673 | 0,669 | 0,659 |
| C11:0 | 0,244 | 0,252 | 0,235 | 0,249 | 0, 238 |
| C12:0 | 1,84 | 1,93 | 1,71 | 1,88 | 1,97 |
| C14:0 | 5,08 | 5,58 | 5,12 | 5,46 | 4,86 |
| C15:0 | 2,02 | 2,22 | 1,85 | 2,16 | 2,97 |
| C16:0 | 368 | 353 | 387 | 374 | 361 |
| C16:1*n* -7 | 4,48 | 4,98 | 4,03 | 4,25 | 4,67 |
| C17:0 | 1,80 | 1,68 | 1,87 | 1,74 | 1,91 |
| C18:0 | 48,3 | 45,6 | 47,1 | 50,3 | 46,9 |
| 9t-C18:1 | 0,667 | 0,663 | 0,672 | 0,661 | 0,670 |
| 11t-C18:1 | 2,41 | 2,48 | 2,35 | 2,44 | 2,39 |
| C18:1*n* -9 | 446 | 432 | 454 | 441 | 460 |
| C18:1*n* -7 | 26,9 | 27,3 | 25,1 | 26,3 | 25,8 |
| C18:2*n* -6 | 994 | 962 | 984 | 979 | 998 |
| C18:3*n* -3 | 110 | 119 | 103 | 105 | 116 |
| 9c,11t-C18:2 (CLA) | 0,625 | 1,09 | 0,640 | 0,795 | 0,629 |
| C20:0 | 9,67 | 9,51 | 9,79 | 9,83 | 9,37 |
| C20:1*n* -9 | 10,4 | 10,9 | 11,2 | 9,76 | 10,1 |
| C20:2*n* -6 | 1,94 | 1,85 | 1,98 | 1,79 | 1,87 |
| C21:0 | 1,22 | 1,15 | 1,24 | 1,31 | 1,29 |
| C20:3*n* -6 | 1,35 | 1,31 | 1,43 | 1,29 | 1,37 |
| C20:4*n* -6 | 0,293 | 0,741 | 0,315 | 0,678 | 0,292 |
| C20:3*n* -3 | 0,417 | 0,436 | 0,393 | 0,427 | 0,432 |
| C20:5*n* -3 (EPA) | 1,21 | 1,51 | 1,11 | 1,39 | 1,29 |
| C22:0 | 9,51 | 9,92 | 9,31 | 8,84 | 9,72 |
| C22:1*n* -9 | 4,56 | 4,22 | 4,31 | 4,72 | 4,87 |
| C22:5*n* -3 (DPA) | 18,2 | 19,6 | 17,4 | 18,8 | 19,3 |
| C23:0 | 3,41 | 3,32 | 3,58 | 3,14 | 3,47 |
| C24:0 | 16,7 | 15,2 | 17,6 | 16,1 | 15,9 |
| C24:1*n* -9 | 2,83 | 2,96 | 2,64 | 3,02 | 2,76 |
| SFA | 472 | 452 | 489 | 478 | 463 |
| MUFA | 498 | 485 | 504 | 492 | 511 |
| PUFA | 1128 | 1110 | 1113 | 1112 | 1141 |
| *n* -3 | 130,2 | 140 | 122 | 126 | 137 |
| *n* -6 | 998 | 965 | 987 | 982 | 1001 |
| Total | 2099 | 2045 | 2104 | 2079 | 2113 |

DSL: *S. latissima* deshidratada; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva* spp.

### 3.3.4.2. Recollida de mostras

Cando os animais acadaron os 63 días de idade, 8 coellos de cada grupo foron sacrificados por conmoción cerebral e posterior desangrado. A canal completa de cada animal foi recollida despois de eliminar a pel, as partes distais das extremidades e a cola, o tracto gastrointestinal e o tracto urogenital, tal e como recomenda a "World Rabbit Science Association" [176]. As canais foron inmediatamente refrixeradas a 4ºC e mantivéronse en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

refrixeración durante 24 horas antes da análise. Para os procedementos analíticos empregáronse mostras do músculo *longissimus lumborum* (LL) de cada animal.

3.3.4.3. Composición química e análise fisicoquímica e antioxidante da carne

A composición química do músculo LL (contido de humidade, proteína, cinzas e graxa) e os parámetros fisicoquímicos (pH e *L**luminosidade, *a**vermello, *b**amarelo) determináronse seguindo os procedementos descritos por Lorenzo et al. [177].

A capacidade antioxidante da carne (LL) foi determinada pola actividade de eliminación de radicais 2,2-difenil-1-picrilhihidrazil (DPPH), como mg trolox/g de mostra [178]; e a oxidación lipídica foi avaliada mediante o ensaio de substancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (como mg de MDA/kg de mostra) [179].

3.3.4.4. Perfil de ácidos graxos da carne

Para a análise de ácidos graxos no músculo LL e nas dietas experimentais, realizouse a extracción de graxa e a transesterificación dos ácidos graxos segundo o protocolo descrito por [180]. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAMEs) separáronse e cuantificáronse mediante cromatografía de gases FID (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) [180]. Os resultados foron expresados como mg/100 g de músculo/penso.

3.3.4.5. Análise sensorial da carne

A calidade sensorial da carne foi avaliada no laboratorio de análise sensorial do Centro Tecnolóxico da Carne de Galicia (Ourense, España), que está dotado de cabinas individuais baixo luz branca, segundo a normativa UNE-EN ISO 8589:2010 (“International Organization of Standardization”, 2014). Realizouse unha análise cuantitativa-descritiva (QDA) para determinar o perfil sensorial dos cinco tratamentos avaliados [181], seguindo a normativa ISO 13299:2017 (“International Organization for Standardisation”, 2017). O panel de avaliación estivo composto por 7 avaliadores seleccionados do persoal do Centro Tecnolóxico da Carne de Galicia, que foi previamente formado seguindo a metodoloxía UNE-EN ISO 8586:2014 (“International Organization of Standardization”, 2014) cos atributos e a escala utilizadas, durante tres sesións.

Cortáronse filetes de 2 cm de grosor do músculo LL e cociñáronse nun forno de convección a 180ºC ata alcanzar unha temperatura interna de 80ºC. Os catadores recibiron auga e pan sen sal ao comezo da sesión e entre as mostras, para limpar o seu padal e eliminar os sabores residuais. As mostras foron etiquetadas individualmente cun número aleatorio de 3 díxitos e servidas xuntas en pratos brancos. A orde de degustación foi deseñada e indicada aos panelistas para evitar alteracións dos resultados por efectos de primeira mostra ou de arrastre [182]. Os catadores avaliaron cinco atributos (olor, sabor, tenrura, zumarencia e fibrosidade) nunha escala estruturada entre 0 (ausencia ou intensidade mínima do atributo) e 10 (presenza ou intensidade máxima). As puntuacións obtidas na análise descritiva empregáronse para determinar o perfil sensorial de cada tratamento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

#### 3.3.4.6. Análise estatística

O efecto dos tratamentos con macroalgas sobre a composición química, os parámetros fisicoquímicos, as propiedades antioxidantes e os perfís de ácidos graxos avaliouse mediante unha proba ANOVA unidireccional e unha proba post-hoc de Tukey. O efecto sobre as propiedades sensoriais foi examinado por un ANOVA bidireccional, incluíndo aos panelistas como factor fixo e a sesión como factor aleatorio, e considerando a interacción entre panelistas × tratamento. O nivel de significación estableceuse en $\alpha$=0,05. Utilizouse o software estatístico IBM SPSS (versión 27.0) para todas as probas estatísticas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 3.3.5. Capítulo V: Elementos esenciais e tóxicos na carne e vísceras de coellos alimentados con macroalgas.

#### 3.3.5.1. Deseño experimental

Os datos recollidos para este capítulo corresponden ao mesmo deseño experimental descrito na sección 3.3.4.1. A composición mineral das macroalgas incluídas nas dietas e a composición mineral final de cada dieta móstrase na Táboa 3.12, e determinouse como se describe na Sección 3.3.5.4.

**Táboa 3.12. Composición mineral analizada dos produtos de macroalgas estudados e do penso completo. Para as dietas experimentais (SL, ESL, EHE, EU), engadiuse adicionalmente un 1,025% de cada produto de macroalgas sobre a dieta control. SL: *S. latissima* deshidratada; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva* spp.**

| | Macroalgas | | | | Penso completo | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | SL | ESL | EHE | EU | control | SL | | ESL | | EHE | | EU | |
| **Macrominerais (g/kg)** | | | | | | | | | | | | | |
| Ca | 20,8 | 8,13 | 10,5 | 9,35 | 11,7 | 11,4 | (-2,6)* | 11,6 | (-0,9) | 11,4 | (-2,6) | 11,6 | (-0,9) |
| P | 2,8 | 4,17 | 1,67 | 2,25 | 7,18 | 6,99 | (-2,6) | 6,81 | (-5,3) | 6,69 | (-6,8) | 7,23 | (0,7) |
| Mg | 6,79 | 7,98 | 9,37 | 43,5 | 2,98 | 3,05 | (2,3) | 2,87 | (-3,7) | 3,07 | (3,0) | 3,69 | (23,8) |
| K | 144 | 45,2 | 231 | 13,6 | 13,2 | 14,9 | (12,9) | 13,6 | (3,0) | 15,5 | (17,4) | 14,5 | (9,8) |
| Na | 54 | 30,6 | 99,9 | 26,9 | 3,49 | 4,29 | (22,9) | 3,69 | (5,7) | 4,49 | (28,7) | 3,82 | (9,5) |
| S | 10,8 | 13,2 | 25,6 | 117 | 4,39 | 4,69 | (6,8) | 4,57 | (4,1) | 4,84 | (10,3) | 5,54 | (26,2) |
| **Microminerais (mg/kg)** | | | | | | | | | | | | | |
| Co | 0,12 | 0,07 | 0,86 | 0,14 | 0,583 | 0,621 | (6,5) | 0,574 | (-1,5) | 0,571 | (-2,1) | 0,59 | (1,2) |
| Cr | 3,32 | 1,33 | 2,67 | 0,84 | 5,69 | 5,46 | (-4,0) | 5,77 | (1,4) | 5,66 | (-0,5) | 5,64 | (-0,9) |
| Cu | 0,85 | 0,38 | 0,87 | 0,62 | 24,1 | 23,6 | (-2,1) | 25,3 | (5,0) | 24,7 | (2,5) | 23,4 | (-2,9) |
| Fe | 281 | 85,6 | 33,1 | 31,9 | 469 | 460 | (-1,9) | 447 | (-4,7) | 438 | (-6,6) | 423 | (-9,8) |
| I | 4446 | 6627 | 220 | 36 | 0,861 | 45,2 | (5149) | 70,6 | (8099) | 2,99 | (247) | 1,25 | (45,2) |
| Mn | 8,18 | 5,29 | 49,4 | 17,2 | 67,9 | 65,9 | (-2,9) | 69,1 | (1,8) | 71,1 | (4,7) | 70 | (3,1) |
| Mo | 0,34 | 0,29 | 0,17 | 0,18 | 1,35 | 1,25 | (-7,4) | 1,27 | (-5,9) | 1,42 | (5,2) | 1,38 | (2,2) |
| Ni | 0,82 | 1,18 | 5,88 | 2,27 | 3,15 | 3,22 | (2,2) | 3,33 | (5,7) | 3,08 | (-2,2) | 3,19 | (1,3) |
| Se | 0,14 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,478 | 0,455 | (-4,8) | 0,474 | (-0,8) | 0,464 | (-2,9) | 0,46 | (-4,2) |
| Zn | 25,9 | 49,2 | 9,67 | 6,08 | 115 | 115 | (0,0) | 120 | (4,3) | 107 | (-7,0) | 115 | (0,0) |
| **Elementos tóxicos (mg/kg)** | | | | | | | | | | | | | |
| As | 89,4 | 133 | 51,9 | 2,25 | 0,245 | 1,151 | (369,8) | 1,613 | (558,4) | 0,772 | (215,1) | 0,26 | (7,8) |
| Cd | 0,34 | 0,15 | 0,53 | 0,04 | 0,114 | 0,119 | (4,4) | 0,108 | (-5,3) | 0,121 | (6,1) | 0,12 | (3,5) |
| Hg | 0,019 | 0,009 | 0,003 | 0,001 | 0,016 | 0,016 | (1,9) | 0,017 | (7,5) | 0,016 | (4,4) | 0,02 | (3,1) |
| Pb | 0,49 | 0,82 | 0,39 | 0,07 | 0,201 | 0,217 | (8,0) | 0,202 | (0,5) | 0,211 | (5,0) | 0,21 | (6,5) |

* entre parénteses porcentaxe de variación respecto da dieta control

#### 3.3.5.2. Recollida de mostras

Aos 63 días de idade, os animais foron sacrificados por conmoción cerebral. Antes da hemorraxia, recolleuse unha mostra de 10 ml de sangue fresco mediante punción cardíaca, que despois foi centrifugada para obter unha mostra de soro. Unha vez sacrificado o animal, recolleuse o fígado, os riles e un dos muslos, e foron empaquetados en bolsas de plástico e

trasladados inmediatamente ao laboratorio. Eliminouse a graxa visible, o tecido conxuntivo e os principais vasos sanguíneos dos órganos, e homoxeneizáronse antes de ser almacenados a -18 ℃ ata a súa análise.

3.3.5.3. Preparación da mostra

Para a determinación do iodo mediante espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), seguiuse a directriz da Norma Europea (EN 15111:2007). De forma breve, colocouse 1 ml de soro ou 0,2 g de tecido (fígado, ril ou músculo) nun tubo Falcon de 15 ml, e engadíronse 0,4 ml de solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemaña) e 2 ml de auga ultrapura. A mestura foi ben homoxeneizada e incubada a 90ºC durante 3 horas nun forno de secado prequentado. Unha vez arrefriadas, engadiuse auga ultrapura ata 5 ml e centrifugáronse a 4000 rpm durante 15 minutos para eliminar as partículas grosas. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado a través dun filtro de 0,45 µm nun tubo de 15 ml. As mostras preparadas foron medidas no mesmo día.

Para o resto de elementos as mostras foron sometidas a unha dixestión ácida. No caso das mostras de soro, mesturouse 1 ml de cada mostra con 0,6 ml de ácido nítrico concentrado (69%) (TMA, Hiperpure, PanReac, Barcelona, España) e 0,4 ml de $H_2O_2$ (PanReac, Barcelona, España). Despois de 24 horas de dixestión nun forno de secado prequentado a 60ºC, engadiuse auga ultrapura ata 5 ml e centrifugouse a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido a outro tubo para a súa análise. No caso do músculo, ril e fígado, a mineralización realizouse nun sistema de dixestión asistida por microondas (240ºC, 40 bar; Ethos Plus, Milestone, Sorisole, Italia). Para elo, mesturouse 1 g de mostra con 3 ml de ácido nítrico concentrado (69%) e 1 ml de auga ultrapura. Unha vez dixeridas, as mostras foron transferidas a tubos de polipropileno e engadiuse auga ultrapura ata 50 ml.

3.3.5.4. Análise de minerais

A concentración dos macrominerais (Ca, P, Mg, Na, K e S), os elementos traza esenciais (Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se e Zn) e os elementos potencialmente tóxicos (As, Cd, Hg e Pb) foi determinada en todas as mostras dixeridas mediante ICP-MS (Agilent 7900×ICP-MS; Agilent Technologies, Tokio, Xapón). As mostras foron analizadas por triplicado e realizouse un control de calidade analítico durante todo o proceso. Incluíronse brancos en cada lote e medíronse entre as mostras. Os límites de detección (LD) calculáronse como tres veces a desviación estándar dos brancos e foron suficientes para determinar o contido de minerais presente nestas mostras. Analizáronse varias réplicas de dous materiais de referencia certificados (músculo de peixe (ERM-BB422) e fígado de bovino (BCR-185R), “Institute for Reference Materials and Measurements”, Geel, Bélxica) seguindo o mesmo procedemento que as mostras experimentais, co fin de avaliar o precisión do método analítico (Táboa 3.13). No caso dos minerais non certificados por estes CRM (Cr, Co, P, Ni, Mo e S) empregáronse mostras enriquecidas a concentracións que producen valores de absorbancia de ata 10 veces os niveis habituais no músculo. As recuperacións analíticas destes elementos oscilaron entre o 96 e o 108%. Os resultados obtidos para os materiais de referencia e as mostras enriquecidas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mostraron recuperacións satisfactorias entre os valores medidos e certificados (considérase admisible unha recuperación entre o 75 e o 125%), polo que a precisión das determinacións foi adecuada.

**Táboa 3.13. Límites de detección (µg/L) de cada elemento, niveis certificados (mg/kg) e % de recuperación do CRM, e % de recuperación das mostras enriquecidas.**

| | LD | Músculo de peixe ERM-BB422 | | Fígado bovino BCR-185R | | Mostras enriquecidas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Niveis certificados | % de recuperación | Niveis certificados | % de recuperación | % de recuperación |
| Ca | 0,30 | 410 | 119 | - | - | 103 |
| P | 0,008 | - | - | - | - | 96 |
| Mg | 0,31 | 1566 | 114 | - | - | 94 |
| Na | 1,25 | 3507 | 125 | - | - | 93 |
| K | 7,37 | 26835 | 120 | - | - | 91 |
| S | 0,61 | - | - | - | - | 105 |
| Co | 0,005 | - | - | - | - | 101 |
| Cr | 0,03 | - | - | - | - | 108 |
| Cu | 0,013 | 1,670 | 105 | 277 | 92 | 107 |
| Fe | 0,19 | 9,40 | 107 | - | | 107 |
| I | 0,165 | 1,4 | 117 | - | - | 103 |
| Mn | 0,02 | 0,368 | 105 | 11,07 | 105 | 114 |
| Mo | 0,006 | - | - | - | - | 106 |
| Ni | 0,014 | - | - | - | - | 104 |
| Se | 0,005 | 1,33 | 99 | 1,68 | 91 | 114 |
| Zn | 0,18 | 16,00 | 110 | 138,6 | 109 | 107 |
| As | 0,006 | 12,7 | 114 | 0,033 | 100 | 102 |
| Cd | 0,008 | 0,0075 | 99 | 0,544 | 91 | 100 |
| Hg | 0,063 | 0,601 | 96 | - | - | 94 |
| Pb | 0,002 | - | - | 0,172 | 95 | 96 |

#### 3.3.5.5. Análise estatística

Construíronse diferentes matrices $X_{40x20}$ para os tecidos de coello (soro, ril, fígado e músculo), con mostras dos 4 tratamentos máis o control, con 20 elementos por fila. O efecto dos tratamentos con macroalgas sobre a composición mineral de cada tipo de mostra foi avaliado mediante un ANOVA unidireccional seguido dunha proba post hoc de Tukey, cun nivel de significación establecido en $\alpha$=0,05. Empregáronse tamén técnicas quimiométricas multivariantes, incluíndo análise de compoñentes principais [183] e análise factorial [184], para descubrir as posibles relacións entre mostras e variables. Para estas análises empregouse o software Statgraphics Centurion 18.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 3.3.6. Capítulo VI: Percepción das persoas consumidoras sobre suplementar as dietas dos coellos con algas mariñas para reducir o uso de antibióticos na produción cunícola en España.

#### 3.3.6.1. Deseño da enquisa

Este estudo adoptou un método cuantitativo. Os datos foron recollidos mediante un cuestionario semiestruturado deseñado especificamente para o estudo (Táboa 3.14). O cuestionario dividiuse nos seguintes apartados: 1) características sociodemográficas; 2) hábitos xerais de consumo; 3) hábitos de consumo de carne de coello; 4) hábitos de consumo de algas; e 5) vontade de mercar carne de coello alimentada con algas.

**Táboa 3.14. Preguntas incluídas na enquisa.**

| Seccións | Preguntas | Tipo de pregunta |
|---|---|---|
| Características socio-demográficas | -Vive en Lugo? | -Pechada-Si/Non |
| | -Con que xénero se identifica? | -Pechada-Varias opcións |
| | -En que franxa de idade se atopa? | -Pechada-Varias opcións |
| | -Con quen vive? | -Pechada-Varias opcións |
| | -Indique o seu nivel educativo | -Pechada-Varias opcións |
| | -Indique o seu rango de ingresos mensuais | -Pechada-Varias opcións |
| Hábitos xerais de consumo | -Escolle o tipo de establecemento onde mercas habitualmente (máis frecuente) | -Pechada-Varias opcións |
| | -Escolle o tipo de establecemento onde mercas habitualmente (segundo máis frecuente) | -Pechada-Varias opcións |
| | -Cales son os factores que máis lle inflúen á hora de adquirir un produto? | -Pechada-Varias opcións (pode escoller 3) |
| | -Como describiría a súa dieta? | -Pechada-Varias opcións |
| | -Con que frecuencia consume carne? | -Pechada-Varias opcións |
| Hábitos de consumo de carne de coello | -Con que frecuencia consume carne de coello? | -Pechada-Varias opcións |
| | -Onde adoita mercar carne de coello? | -Pechada-Varias opcións |
| | -Que propiedades positivas destacaría da carne de coello? | -Pechada-Varias opcións (resposta múltiple) |
| | -Que propiedades negativas destacaría da carne de coello? | -Pechada-Varias opcións (resposta múltiple) |
| Hábitos de consumo de algas | -Con que frecuencia consome algas? | -Pechada-Varias opcións |
| | -Se nunca probou algas, estaría disposto a probalas? | -Pechada-Si/Non |
| | -Onde adoita consumir algas? | -Pechada-Varias opcións |
| | -Que propiedades positivas destaca das algas? | -Pechada-Varias opcións (resposta múltiple) |
| | -Que propiedades negativas destaca das algas? | -Pechada-Varias opcións (resposta múltiple) |
| Predisposición para mercar carne de coello alimentada con algas | -Lea a seguinte afirmación: os coellos alimentáronse con pensos que contiñan algas, co obxectivo de reducir a necesidade de utilizar antibióticos na súa produción. Tendo en conta este factor, elixiría esta carne fronte a outros produtos de carne de coello de características similares pero que non fosen alimentados deste xeito? | -Pechada-Si/Non/Non influiría |
| | -Por que non? | -Aberta (só para a resposta "Non" na pregunta anterior) |
| | -Saber que estes coellos recibiron esta dieta farían consumir máis carne de coello? | -Pechada-Si/Non/Non sei |
| | -Por que non? | -Aberta (só para a resposta |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

| | |
|---|---|
| | "Non" na pregunta anterior) |
| -Dende o seu punto de vista, que beneficios tería alimentar ós coellos con pensos que conteñan algas? | -Aberta |
| -Indique ata que punto está de acordo coas seguintes afirmacións: "A inclusión de algas nas dietas dos coellos suporía...":<br>I. "...mellorar a calidade da carne".<br>II. "…proporcionar beneficios ambientais".<br>III. "...mellorar a súa saúde". | -Pechada-De acordo/Non sei que dicir/En desacordo |

3.3.6.2. Localización da investigación e selección da mostra

O estudo realizouse no concello de Lugo (noroeste de España), que é un concello de tamaño medio de 97.211 habitantes. É un territorio organizado arredor dunha zona urbana -a cidade de Lugo- rodeada de pequenos asentamentos rurais, que tamén limita con outros concellos rurais. O cuestionario administrouse a habitantes maiores de 18 anos, seleccionados mediante mostraxe de cotas non probabilísticas en función do xénero e da idade para acadar unha distribución representativa da poboación (Táboa 3.15). O tamaño da mostra calculouse aplicando un erro esperado do 5% e un nivel de confianza do 95%, asumindo que p=q=0,5. Isto deu un tamaño da mostra de n= 383.

**Táboa 3.15. Mostraxe por cota en función do xénero e da idade.**

| | Xénero | | Total |
|---|---|---|---|
| **Idade (anos)** | **Muller** | **Home** | |
| **18-30** | 29 | 24 | 53 (13,7%) |
| **31-64** | 123 | 102 | 226 (58,9%) |
| **65 ou máis** | 57 | 48 | 105 (27,4%) |
| **Total** | 209 (54,6%) | 174 (45,4%) | 383 |

3.3.6.3. Recollida de datos

En total, 383 persoas completaron o cuestionario, que se administrou mediante dous métodos: a) entrevistas en liña e b) entrevistas presenciais. Inicialmente, a metodoloxía foi deseñada para administrar o cuestionario só en liña. Non obstante, a dificultade para obter respostas dos habitantes maiores de 65 anos (debido á fenda dixital) levounos a realizar entrevistas presenciais. Os cuestionarios administráronse entre marzo e xuño de 2023.

3.3.6.4. Análise estatística

Os datos foron analizados mediante Jamovi (versión 2.3.21.0). Ao longo da análise tomáronse diferentes decisións metodolóxicas. Co obxectivo de facilitar a análise dos datos, creáronse tres categorías segundo a frecuencia de consumo de carne de coello e algas: a) non consumidor (nunca consume ningunha); b) consumidor esporádico (consúmeos "esporádicamente" ou "varias veces ao ano"); e c) consumidor habitual (consúmeos "polo menos unha vez á semana", "unha vez cada quince días" ou "polo menos unha vez ao mes"). Os datos foron analizados mediante técnicas estatísticas univariadas e bivariadas. Utilizouse a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proba de chi-cadrado para investigar as relacións dependentes entre as variables, e o nivel de significación estatística estableceuse en $p$ <0,05.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# 4. RESULTADOS E DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

## 4.1. CAPÍTULO I: ESTUDO *IN VITRO*: DIXESTIBILIDADE, FERMENTABILIDADE CECAL E ACTIVIDADE INHIBIDORA MICROBIANA DE SETE ESPECIES DE MACROALGAS DE GALICIA.

### 4.1.1.Composición química

A composición química das macroalgas deshidratadas variou moito (Táboa 4.1.2). Os coeficientes de variación oscilaron entre o 21% para FDT e o 66% para o residuo (RES=100-cinza-PB-FDT). A composición química de *H. elongata* deshidratada resultou bastante similar á das mostras recollidas anteriormente en Galicia, mentres que *S. latissima* e *U. pinnatifida* deshidratadas mostraron unha composición diferente (Táboa 4.1.3). Como xa se indicou, a composición química das macroalgas varía dependendo da localización xeográfica, estación, factores ambientais e estresores [56,63,159,185,186]. A composición química de ambos os tipos de extractos tamén foi moi variable, con coeficientes de variación de 8 para FND e 106% para FS.

**Táboa 4.1.2. Composición química (g/100 g; sobre materia seca) dos produtos de macroalgas e ingredientes de referencia (palla de cereal sen tratar e polpa de remolacha azucreira) [1]. Adaptado de Al-Soufi et al.** [187]**, baixo licenza Creative Common.**

| | Cinza | PB | FDT | FND | FS | FAD | LAD | RES | RES+FS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Macroalgas deshidratadas** | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 23,1 | 10,6 | 52,7 | 31,3 | 21,4 | 30,7 | 14,2 | 13,6 | 35,0 |
| *Himanthalia elongata* | 41,4 | 9,51 | 41,7 | 19,4 | 22,3 | 17,8 | 13,3 | 7,39 | 29,7 |
| *Saccharina latissima* | 20,8 | 7,10 | 43,1 | 22,6 | 20,5 | 10,1 | 3,63 | 29,0 | 49,5 |
| *Ulva* spp. | 27,7 | 16,4 | 44,1 | 21,6 | 22,5 | 14,7 | 7,87 | 11,8 | 34,3 |
| *Undaria pinnatifida* | 50,1 | 14,8 | 28,6 | 17,1 | 11,5 | 11,6 | 7,10 | 6,5 | 18,0 |
| **Macroalgas hidrolizadas** | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 28,9 | 10,6 | 53,2 | 30,2 | 23,0 | 21,3 | 15,9 | 7,3 | 30,3 |
| *Himanthalia elongata* | 45,5 | 8,92 | 40,9 | 15,3 | 25,6 | 16,4 | 12,5 | 4,7 | 30,3 |
| *Laminaria ochroleuca* | 43,4 | 8,36 | 33,0 | 11,2 | 21,8 | 11,4 | 3,85 | 15,2 | 37,0 |
| *Ulva* spp. | 39,1 | 13,0 | 34,1 | 5,63 | 28,5 | 6,07 | 4,19 | 13,8 | 42,3 |
| *Undaria pinnatifida* | 58,2 | 14,2 | 21,3 | 5,80 | 15,5 | 5,68 | 4,66 | 6,3 | 21,8 |
| **Extractos acuosos** | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 28,7 | 8,23 | 10,4 | 4,83 | 5,60 | 4,72 | 4,32 | 52,7 | 58,3 |
| *Himanthalia elongata* | 55,1 | 3,74 | 29,9 | 0,00 | 29,9 | 0,14 | 0,17 | 11,3 | 41,2 |
| *Saccharina latissima* | 13,6 | 3,49 | 64,7 | 0,00 | 64,7 | 0,00 | 0,00 | 18,2 | 82,9 |
| *Undaria pinnatifida* | 68,7 | 8,91 | 18,6 | 0,26 | 18,3 | 0,17 | 0,16 | 3,8 | 22,1 |
| **Extractos hidrolizados** | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 32,0 | 9,22 | 29,5 | 1,61 | 27,9 | 1,51 | 1,29 | 29,3 | 57,2 |
| *Laminaria ochroleuca* | 44,4 | 2,37 | 2,70 | 0,54 | 2,16 | 0,82 | 0,77 | 50,5 | 53,1 |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Saccharina latissima* | 19,3 | 4,09 | 2,94 | 0,00 | 2,94 | 0,24 | 0,18 | 73,7 | 76,6 |
| *Ulva* spp. | 34,1 | 4,88 | 30,2 | 0,00 | 30,2 | 0,09 | 0,06 | 30,8 | 61,0 |
| *Mastocarpus stellatus* | 31,8 | 10,4 | 43,4 | 2,09 | 41,3 | 0,14 | 0,14 | 14,4 | 55,7 |
| **Ingredientes de referencia** | | | | | | | | | |
| Palla de cereal | 8,80 | 2,90 | 78,1 | 74,3 | 3,79 | 43,8 | 4,20 | 10,2 | 13,9 |
| Polpa de remolacha | 4,70 | 7,99 | 71,7 | 36,5 | 35,2 | 23,6 | 1,91 | 15,6 | 50,8 |

[1] **Proteína bruta** : [Nitróxeno] x 5,0. **FDT** : fibra dietética total **. FND** : fibra neutro-deterxente. **FS:** fibra soluble (FDT – FND). **FAD** : fibra ácido-deterxente. **ADL** : lignina ácido-deterxente. **RES:** 100 - (cinza + PB + FDT).

Os contidos de cinzas das macroalgas deshidratadas foron moi elevados (20,8-50,1% MS), o que concorda cos resultados reportados por outros autores para estas especies de macroalgas (Táboa 4.1.3), indicando un contido en minerais moito maior que as plantas terrestres [63]. Neste sentido, é importante ter en conta o contido en minerais de cada macroalga para a súa incorporación ás dietas, debido principalmente ao contido en iodo e metais pesados [159]. A PB das macroalgas deshidratadas oscilou entre o 7,10 e o 16,4% MS, o que coincide cos estudos anteriores (5-15% para as pardas e 10-25% para as verdes [62]), e cos valores obtidos anteriormente para estas macroalgas en Galicia (Táboa 3). *Ulva* spp. (16,4%) e *U. pinnatifida* (14,8%) presentaron case o dobre de proteína que a polpa de remolacha (7,99%), e ademais foi observado que a súa proteína contén proporcións relevantes de leucina e valina [188,189]. Non obstante, o contido de PB en todas as macroalgas probadas foi menor que outros alimentos proteicos usados habitualmente na alimentación do gando, como a fariña de xirasol ou a fariña de soia.

No presente estudo, o contido de FDT variou dependendo da especie de macroalgas e do tipo de extracto. As macroalgas deshidratadas presentaron grandes cantidades de FDT (28,6-52,7%), aínda que non tan altas como a palla de cereal (78,1%) ou a polpa de remolacha (71,7%). Non obstante, a diferenza da palla, a FDT das macroalgas presentou aproximadamente partes iguais de FND e FS (FND: de 17,1 a 31,3% para macroalgas e 74,3% para palla; FS: de 11,6 a 22,5% para macroalgas e 3,79% para palla), sendo os valores das macroalgas máis próximos aos da polpa de remolacha (36,5% FND e 35,2% de FS). A diferenza da polpa de remolacha, algunhas macroalgas deshidratadas presentaron cantidades notables de LAD (3,63-14,2% para as macroalgas; 1,91% para polpa de remolacha), que poderían estar asociados con compostos polifenólicos distintos da lignina (como os florotaninos), xa que a lignina só se atopa nas macroalgas vermellas [190]. Os resultados para a FDT, aínda que foron moi variables, concordan en xeral cos resultados observados en mostras recollidas en Galicia (Táboa 4.1.3). Os resultados obtidos para a FS e outros compoñentes da FDT non son fáciles de comparar cos datos publicados anteriormente debido á variación nos métodos empregados para a determinación dos compoñentes da fibra de macroalgas en diferentes estudos [62,63,185].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.1.3. Revisión bibliográfica sobre a composición química (g/100 g; sobre materia seca) das macroalgas testadas neste estudo. Adaptado de Al-Soufi et al.** [187]**, baixo licenza Creative Common.**

| Localización e referencia | Macroalgas | Cinza | PB | FDT |
|---|---|---|---|---|
| Galicia, España [63] | *Himanthalia elongata* | 36,4 | 14,1 | 37,1 |
| | *Saccharina latissima* | 34,8 | 25,7 | 30,2 |
| | *Mastocarpus stellatus* | 25,0 | 21,3 | 31,7 |
| Galicia, España [191] | *Himanthalia elongata* | 31,0 | 6,80 | 39,0 |
| | *Laminaria ochroleuca* | 33,0 | 8,5 | 45,0 |
| | *Undaria pinnatifida* | 35,0 | 20,5 | 39,0 |
| Galicia, España [132] | *Himanthalia elongata* | 33,2 | 7,50 | 36,0 |

O tratamento enzimático das macroalgas non modificou substancialmente a súa composición química, especialmente en *F. vesiculosus* e *H. elongata*. Tanto o contido de cinzas (28,9-58,2%) como de PB (8,36-14,2%) foron similares aos das mostras deshidratadas. Nalgúns casos, houbo unha lixeira redución no contido de FDT debido a unha FND máis baixa (5,63-30,2%) pero un nivel de FS máis elevado (15,5-28,5%), como se observou para *Ulva* spp. e *U. pinnatifida*.

Como era de esperar, ambos tipos de extraccións influíron na composición do extracto obtido, aínda que de forma lixeiramente diferente para cada macroalga. Non hai información dispoñible na literatura sobre a composición dos mesmos extractos para realizar comparacións precisas. O contido en cinzas dos extractos variou entre o 13,6 e o 68,7% MS, e foi numericamente maior que o das correspondentes macroalgas deshidratadas na maioría das mostras. Pola contra, o contido de PB da maioría dos extractos foi moito menor que nas macroalgas deshidratadas. Para *H. elongata* e *S. latissima*, este foi arredor da metade no extracto acuoso que nas macroalgas deshidratadas (diminuíron de 9,51% a 3,74% e de 7,10% a 3,49%, respectivamente); sendo a redución moi marcada no caso de *Ulva* spp., descendendo de 16,4% nas mostras deshidratadas a 4,88% no extracto hidrolizado. Pola contra, tanto os extractos acuosos como os hidrolizados de *F. vesiculosus* presentaron cantidades só lixeiramente inferiores de PB (8,23 e 9,22%, respectivamente) que as macroalgas deshidratadas (10,6%), mentres que as reducións de PB no extracto acuoso de *U. pinnatifida* foron intermedias (8,91 e 14,8% para o extracto e as macroalgas deshidratadas, respectivamente). Estes resultados suxiren unha alta variabilidade entre macroalgas na eficiencia de extracción de PB, mesmo usando o mesmo procedemento de extracción para todas as mostras. Para analizar a fibra dietética nos diferentes extractos é importante ter en conta a fracción RES (calculada como RES=100 - (cinza + PB + FDT)), que foi moi elevada nalgúns extractos. Tendo en conta os baixos contidos de graxa e azucre que adoitan presentar as macroalgas [186,192–194], a fracción RES probablemente contén principalmente hidratos de carbono solubles, que non se puideron identificar, aínda que nalgúns casos representaban unha alta proporción das macroalgas. A fracción RES incluiría a FS que non é precipitada polo etanol ou outros compostos solubles [195]. Nas macroalgas pardas, como *S. latissima*, esta fracción pode

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

corresponder á laminarina (1,3-β-D-glucanos), que é soluble en auga, e ao alxinato (ácido 1,4-D-manurónico combinado con 1,4 ácido -α-L-glucurónico), que é soluble a pH entre 6 e 9, e/ou manitol [63,196]. Estes resultados indican que as técnicas estándar utilizadas para caracterizar as fraccións de fibras en plantas terrestres non permiten a cuantificación precisa da composición dos produtos de macroalgas [63,159,186]. O RES foi notable en *S. latissima* (29,0% para macroalgas deshidratadas e 73,7% para extracto hidrolizado), *F. vesiculosus* (52,7 e 29,3% para extractos acuosos e hidrolizados, respectivamente) e extractos hidrolizados de *Ulva* spp. (30,8%) e *L. ochroleuca* (50,5%). Polo tanto, se o RES se considera parte da FDT, e se calcula a suma das fraccións FS e RES (Táboa 4.1.2), tanto os extractos acuosos como os hidrolizados caracterizáronse por ter altas concentracións de polisacáridos solubles (22,1-82,9 %) e contidos de FND moi baixos (0-4,83%). Estes resultados eran esperables, xa que o obxectivo destes procesos de extracción era recuperar os polisacáridos de interese polas súas propiedades e potencial prebiótico. Agás para *U. pinnatifida*, a suma (RES + FS) foi similar ou incluso superior á da polpa de remolacha, o que é prometedor debido ao potencial de fermentación destas macroalgas [59,197,198]. De todas as macroalgas consideradas, *S. latissima* merece unha atención especial polos altos valores da fracción RES + FS observados tanto no extracto acuoso (82,9%) como no hidrolizado (76,6%), probablemente polo seu alto contido en laminarina.

### 4.1.2. Dixestibilidade *in vitro* e contido enerxético estimado

Os valores de IDMSiv das macroalgas deshidratadas oscilaron entre o 38,4 e o 73,2%, sendo todos superiores aos da polpa de remolacha (43,3%, excepto en *F. vesiculosus*. Táboa 4.1.4). Cando as macroalgas foron hidrolizadas, a IDMSiv aumentou un 25% de media. Na maioría das macroalgas deshidratadas, os valores de CDMSiv foron similares (42,2-75,0%) aos da polpa de remolacha (76,8%). As excepcións foron *F. vesiculosus* e *H. elongata*, ambos con contidos en sulfato relativamente elevados (4-7%: datos non publicados) e cun alto contido de fucosa no segundo caso (31,5%: datos no publicados), probablemente asociado aos fucoidanos. Non obstante, os valores de CDMSiv foron maiores en todas as macroalgas que na palla de cereal (19,8%). Pola contra, a dixestibilidade da PB (CDPBiv) foi menor en todas as macroalgas que na polpa de remolacha (22,6-59,0% para as macroalgas deshidratadas e 68,1% para polpa de remolacha), presentando algunhas macroalgas (*F. vesiculosus* e *H. elongata)* valores próximos ao da palla de cereal (17,7%). Tanto a dixestibilidade da MS como da PB aumentaron cando se hidrolizaron as macroalgas (un 20% CDMSiv e un 80% CDPBiv, de media, excepto en *F. vesiculosus*). A baixa dixestibilidade da PB *in vitro* coincide coa baixa dixestibilidade de CP *in vivo* que se observou para *S. latissima* e *Ulva* spp. en ratas [199], a pesar de que no noso estudo estas mostras mostraron os valores mais altos *in vitro*. Os valores de CDMSiv e CDPBiv das macroalgas deshidratadas correlacionáronse negativamente co contido de FAD ($r = -0,97$; $p = 0,005$; $n = 5$) e a proteína asociada con FDT ($r = -0,96$; $p = 0,011$; $n = 5$), respectivamente, pero non se correlacionaron nin coa FS nin coa suma das fraccións RES+FS ($p \geq 0,35$). A correlación negativa entre CDMSiv e FAD xa se observara para pensos compostos para coellos baseados en ingredientes vexetais terrestres [148].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.1.4. Dixestibilidade ileal *in vitro* (IDMSiv) e fecal da DM (CDMSiv), dixestibilidade fecal *in vitro* da proteina (CDPBiv) e valor nutricional estimado dos produtos de macroalgas [1]. Adaptado de Al-Soufi et al. [187], baixo licenza Creative Common.**

| | Dixestibilidade *in vitro* (%) | | | Valor nutritivo estimado | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | IDMSiv | CDMSiv | CDPBiv | CDMS (%) | CDE (%) | ED (MJ/kg MS) |
| **Macroalgas deshidratadas** | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 38,4 | 42,2 | 22,6 | 39,5 | 39,8 | 7,96 |
| *Himanthalia elongata* | 57,6 | 63,3 | 25,1 | 60,1 | 59,8 | 11,1 |
| *Saccharina latissima* | 66,0 | 74,3 | 55,6 | 70,9 | 70,3 | 12,8 |
| *Ulva* spp. | 65,2 | 75,0 | 59,0 | 71,9 | 71,2 | 12,9 |
| *Undaria pinnatifida* | 73,2 | 74,6 | 49,8 | 71,2 | 70,6 | 12,8 |
| **Macroalgas hidrolizadas** | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 43,2 | 42,7 | 14,1 | 39,9 | 40,3 | 8,0 |
| *H imanthalia elongata* | 73,0 | 73,3 | 43,2 | 69,9 | 69,3 | 12,6 |
| *Laminaria ochroleuca* | 73,5 | 74,0 | 64,8 | 70,6 | 70,0 | 12,7 |
| *Ulva* spp. | 86,9 | 91,5 | 100 | 87,8 | 86,6 | 15,3 |
| *Undaria pinnatifida* | 93,0 | 92,1 | 100 | 88,4 | 87,2 | 15,4 |
| **Extractos acuosos** | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 99,6 | 98,8 | 100 | 94,9 | 93,6 | 16,4 |
| *Himanthalia elongata* | 99,7 | 99,4 | 100 | 95,5 | 94,1 | 16,5 |
| *Saccharina latissima* | 98,0 | 99,6 | 100 | 95,7 | 94,3 | 16,6 |
| *Undaria pinnatifida* | 99,7 | 99,7 | 100 | 95,8 | 94,4 | 16,6 |
| **Extractos hidrolizados** | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 93,5 | 97,9 | 100 | 94,0 | 92,7 | 16,3 |
| *Laminaria ochroleuca* | 99,5 | 98,7 | 100 | 94,8 | 93,5 | 16,4 |
| *Saccharina latissima* | 99,7 | 99,2 | 100 | 95,3 | 93,9 | 16,5 |
| *Ulva* spp. | 99,8 | 99,0 | 100 | 95,1 | 93,8 | 16,5 |
| *Mastocarpus stellatus* | 78,6 | 99,1 | 100 | 95,2 | 93,8 | 16,5 |
| **Ingredientes de referencia** | | | | | | |
| Palla de cereal | 19,7 | 19,8 | 17,7 | 17,5 | 18,5 | 4,60 |
| Polpa de remolacha | 43,3 | 76,8 | 68,1 | 73,4 | 72,7 | 13,1 |

[1] **CDMS**: dixestibilidade fecal aparente da materia seca (%). **CDE**: dixestibilidade fecal aparente da anerxía bruta (%). **ED:** enerxía dixerible (MJ/kg de materia seca). Todos os valores foron estimados a partir das ecuacións de Villamide et al. (2009).

Como era de esperar, os diferentes extractos obtidos foron case completamente dixeridos *in vitro* (78,6-99,8% IDMSiv; 97,9-99,7% CDMSiv; 100,0% CDPBiv) debido á súa natureza soluble. Non obstante, os polisacáridos cuantificados tanto na fracción FDT como na RES (posiblemente laminarina, alxinato, fucoidanos, ulvanos) non poden ser hidrolizados polos

USC DE COMPOSTELA

enzimas endóxenos e só poden ser fermentados pola microbiota intestinal. A dixestibilidade *in vivo* das proteínas destes extractos podería ser maior que nas macroalgas deshidratadas aínda que non se esperaría que fose alta [72]. A extracción específica de proteínas en *Ulva* spp. demostrou aumentar a proteólise *in vitro* [200], o que concorda co aumento de CDPBiv observado no noso estudo para *Ulva* spp. hidrolizada e *U. pinnatifida* en comparación coas macroalgas deshidratadas, aínda que estes resultados deberían confirmarse *in vivo*. Ningún dos valores de dixestibilidade *in vitro* medidos nos extractos se correlacionou con ningunha fracción fibrosa analizada ($p \geq 0,30$; n = 9). Ao considerar todos os 19 produtos de macroalgas xuntos, os valores de CDMSiv e CDPBiv correlacionáronse negativamente coa FND (r = -0,96; $p < 0,001$; n = 19) e coa proteína ligada ao contido de FND (r = -0,82; $p < 0,001$; n = 19), respectivamente.

As macroalgas deshidratadas mostraron valores similares de enerxía dixerible (7,96-12,9 MJ/kg MS) que a polpa de remolacha (13,1 MJ/kg MS), e superiores aos da palla (4,60 MJ/kg MS), coa excepción de *F. vesiculosus* (Táboa 4.1.4). A hidrólise das macroalgas mellorou lixeiramente o seu contido enerxético, excepto para *F. vesiculosus*. En ambos os tipos de extractos os valores de ED foron superiores (16,5 MJ/kg MS, de media) que os da polpa de remolacha, o que concorda coa elevada dixestibilidade da MS dos extractos, aínda que o valor real dependerá da súa fermentabilidade.

### 4.1.3. Produción *in vitro* de gas e AGV

Os valores dos produtos de macroalgas e materiais de referencia móstranse na Táboa 4.1.5, mentres que os dos residuos insolubles da IDMSiv móstranse na Táboa 4.1.6.

A diferente cinética de produción de gas observada nas mostras impediu que os datos fosen axustados cun único modelo matemático, polo que foi imposible a comparación entre mostras. En consecuencia, só se mostran os datos das 12, 24 e 48 h de incubación para a comparación das mostras, xa que estes resultados estiveron máis estreitamente correlacionados coa fermentación real *in vivo* e a dixestibilidade da fibra no coello (resultados non publicados). Ás 48 h, 14 das 33 mostras (produtos de macroalgas + ingredientes de referencia + residuos insolubles da dixestibilidade *in vitro* en dous pasos) alcanzaron toda a produción potencial de gas. Cando os datos se analizaron como medidas repetidas, a produción de gas *in vitro* viuse influenciada pola mostra incubada, o tempo de medición e a súa interacción ($p < 0,001$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.1.5. Produción de gas tras 12, 24 e 48 h de incubación *in vitro* dos produtos de macroalgas e os ingredientes de referencia, utilizando dixesta cecal de coello como inóculo (n=4) [1]. Adaptado de Al-Soufi et al.** [187]**, baixo licenza Creative Common.**

| | Produción de gas (ml/g de materia seca) | | |
|---|---|---|---|
| **Mostra** | 12 h | 24 h | 48 h |
| **Macroalgas deshidratadas** | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 6,40 $^{a}$ | 8,25 $^{a}$ | 8,25 $^{a}$ |
| *Himanthalia elongata* | 5,98 $^{a}$ | 10,3 $^{a}$ | 25,6 $^{a}$ |
| *Saccharina latissima* | 7,23 $^{a}$ | 55,8 $^{c}$ | 95,6 $^{c}$ |
| *Ulva* spp. | 12,7 $^{b}$ | 16,6 $^{a}$ | 20,7 $^{a}$ |
| *Undaria pinnatifida* | 3,70 $^{a}$ | 3,75 $^{a}$ | 19,4 $^{a}$ |
| **Macroalgas hidrolizadas** | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 2,58 $^{a}$ | 2,58 $^{a}$ | 6,43 $^{a}$ |
| *Himanthalia elongata* | 2,63 $^{a}$ | 2,63 $^{a}$ | 14,3 $^{a}$ |
| *Laminaria ochroleuca* | 12,9 $^{b}$ | 23,3 $^{a}$ | 30,3 $^{a}$ |
| *Ulva* spp. | 11,4 $^{ab}$ | 11,4 $^{a}$ | 17,9 $^{a}$ |
| *Undaria pinnatifida* | 3,18 $^{a}$ | 3,18 $^{a}$ | 11,0 $^{a}$ |
| **Extracto acuoso** | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 6,78 $^{a}$ | 8,20 $^{a}$ | 20,7 $^{a}$ |
| *Himanthalia elongata* | 5,68 $^{a}$ | 22,2 $^{a}$ | 45,0 $^{b}$ |
| *Saccharina latissima* | 8,00 $^{ab}$ | 90,2 $^{c}$ | 145 $^{d}$ |
| *Undaria pinnatifida* | 6,15 $^{a}$ | 6,15 $^{a}$ | 22,8 $^{a}$ |
| **Extracto hidrolizado** | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 10,0 $^{ab}$ | 29,6 $^{a}$ | 49,6 $^{b}$ |
| *Laminaria ochroleuca* | 7,15 $^{a}$ | 73,5 $^{c}$ | 103 $^{d}$ |
| *Saccharina latissima* | 10,7 $^{ab}$ | 112 $^{d}$ | 167 $^{e}$ |
| *Ulva* spp . | 8,60 $^{a}$ | 30,0 $^{b}$ | 46,3 $^{b}$ |
| *Mastocarpus stellatus* | 5,70 $^{a}$ | 11,4 $^{a}$ | 23,9 $^{a}$ |
| **Ingredientes de referencia** | | | |
| Palla de cereal | 5,08 $^{a}$ | 5,08 $^{a}$ | 8,35 $^{a}$ |
| Polpa de remolacha | 15,0 $^{b}$ | 67,7 $^{c}$ | 125 $^{d}$ |

[1] Os efectos da mostra, o tempo de medición (horas) e a súa interacción foron todos significativos ($p$ < 0,001). Os erros estándar agrupados das medias ás 12, 24 e 48 h foron 1,53, 5,35 e 5,46, respectivamente. Para cada tempo de medición, os superíndices diferentes (dentro de cada columna) indican se cada media é diferente ($p$ < 0,05) dos ingredientes de referencia (palla de cereal e polpa de remolacha).

Sorprendentemente, as dúas mostras que mostraron a produción de gas máis próxima ($p$>0,05) á polpa de remolacha tras 12 h foron *Ulva* spp. deshidratada e as mostras hidrolizadas *de L. ochroleuca* (Táboa 4.1.5), mentres que as de *Ulva* spp. hidrolizadas, ambos extractos de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*S. latissima* e o extracto hidrolizado de *F. vesiculosus* mostraron valores intermedios entre a polpa de remolacha e a palla. Ás 24 h, a produción de gas en *S. latissima* deshidratada, o extracto acuoso de *S. latissima* e o extracto hidrolizado de *L. ochroleuca* foi similar á da polpa de remolacha, mentres que a produción de gas no extracto hidrolizado de *S. latissima* foi maior que na polpa de remolacha ($p < 0,05$). Ás 48 h obtivéronse resultados similares. Os resultados indicaron unha elevada fermentabilidade dos diferentes produtos *de S. latissima*, o que probablemente estea relacionado co alto contido en laminarina e alxinato descrito anteriormente [201], especialmente cando estes polisacáridos están concentrados, o que podería acontecer nos extractos. A laminarina é un polisacárido non sulfatado de almacenamento, soluble en auga e composto por 1,3-β-D-glucanos con ramificacións β1,6; e o alxinato está composto por ácido 1,4-β-D-manurónico e 1,4-β- ácido L-gulurónico e é soluble en auga a pH 6-9; sen embargo, ningún deles pode ser hidrolizado por enzimas endóxenos e só poden ser utilizados pola microbiota intestinal [202]. *S. latissima* mostrou niveis relativamente elevados de produción *in vitro* de gas ruminal, inferior ao da polpa de remolacha pero superior ao da fariña de alfalfa [186]. Pola contra, a produción de gas foi menor nas macroalgas que contiñan niveis relativamente altos de polisacáridos sulfatados (ulvanos e fucoidanos), como é o caso de *F. vesiculosus* e *Ulva* spp., que tamén foron menos fermentables noutros estudos [86,87].

Os outros produtos de macroalgas mostraron unha produción de gas similar á producida pola palla, o que suxire unha baixa fermentabilidade; mentres que os extractos de *H. elongata* (acuoso), *F. vesiculosus* (hidrolizado) e *Ulva* spp. (hidrolizado) mostraron valores intermedios entre a polpa de remolacha e a palla ás 48 h.

A diferente fermentabilidade das mostras ás 12 h fai pensar na necesidade de adaptación da microbiota, sobre todo aos extractos máis purificados, nos que a composición química é máis homoxénea e diferente á dos substratos normalmente fermentados pola microbiota intestinal do coello. Os inóculos cecais obtivéronse de coellos que non foron alimentados con macroalgas, e a adaptación requirida estaría atrasando o inicio do proceso de fermentación. Esta necesidade de adaptación do substrato por parte da microbiota intestinal do coello xa foi observada cando se emprega un substrato moi específico (como a celobiosa) [50].

A maioría dos residuos insolubles da IDMSiv mostraron unha produción de gas similar á da palla de cereal (Táboa 4.1.6), independentemente do tempo de fermentación, o que encaixa coa maior fermentabilidade da fibra soluble en comparación coa fibra insoluble nos coellos [203]. Só os residuos insolubles de *S. latissima* e a polpa de remolacha produciron máis gas que a palla de cereais.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.1.6. Produción de gas tras 12, 24 e 48 h de incubación *in vitro*, dos residuos insolubles da dixestibilidade *in vitro* de dous pasos das macroalgas (deshidratadas e hidrolizadas enzimáticamente) e dos ingredientes de referencia, utilizando dixesta cecal de coello como inóculo (n = 4) [1]. Adaptado de Al-Soufi et al.** [187]**, baixo licenza Creative Common.**

| | Produción de gas (ml/g de materia seca) | | |
|---|---|---|---|
| **Mostra** | 12 h | 24 h | 48 h |
| **Residuo insoluble de algas deshidratadas** | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 5,05 [a] | 5,15 [a] | 6,20 [a] |
| *Himanthalia elongata* | 4,98 [a] | 5,43 [a] | 18,3 [a] |
| *Saccharina latissima* | 4,10 [a] | 5,60 [a] | 34,6 [b] |
| *Ulva* spp. | 1,68 [a] | 1,63 [a] | 12,2 [a] |
| *Undaria pinnatifida* | 3,85 [a] | 4,63 [a] | 10,3 [a] |
| **Residuo insoluble de algas hidrolizadas** | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 3,00 [a] | 3,00 [a] | 3,83 [a] |
| *Himanthalia elongata* | 3,65 [a] | 3,65 [a] | 10,5 [a] |
| *Laminaria ochroleuca* | 3,23 [a] | 3,23 [a] | 4,33 [a] |
| *Ulva* spp. | 4,15 [a] | 4,95 [a] | 7,80 [a] |
| *Undaria pinnatifida* | 4,20 [a] | 4,20 [a] | 4,80 [a] |
| **Residuo insoluble dos ingredientes de referencia** | | | |
| Palla de cereal | 2,90 [a] | 2,90 [a] | 2,90 [a] |
| Polpa de remolacha | 3,70 [a] | 7,90 [a] | 38,6 [b] |
| **Ingredientes de referencia** | | | |
| Palla de cereal | 5,08 [a] | 5,08 [a] | 8,35 [a] |
| Polpa de remolacha | 15,0 [b] | 67,7 [b] | 125 [c] |

[1] Os efectos da mostra, o tempo de medición (h) e a súa interacción foron todos significativos ($p < 0,001$). Os erros estándar agrupados das medias ás 12, 24 e 48 h foron 1,53, 5,35 e 5,46, respectivamente. Para cada tempo de medición, os superíndices diferentes (dentro de cada columna) indican se cada media é diferente ($p < 0,05$) aos ingredientes de referencia (palla de cereal e polpa de remolacha). A fermentabilidade do residuo insoluble da dixestibilidade *in vitro* de dous pasos avaliouse só para mostras cunha dixestibilidade ileal de materia seca *in vitro* inferior ao 93%.

Aínda que se observou unha correlación positiva entre a produción de gas ás 24 h e a fracción RES para as macroalgas deshidratadas (r = 0,96; $p$ = 0,011; n = 5), non se atopou ningunha correlación coa FS nin cos valores de IDMSiv, CDMSiv e CDPBiv ($p \geq 0,54$). A produción de gas ás 24 h dos 9 extractos (acuosos e hidrolizados) correlacionouse positivamente coa suma de RES+FS (r = 0,72; $p$ = 0,028; n = 9), pero non se correlacionou coa FS ou os valores de IDMSiv, CDMSiv e CDPBiv ($p \geq 0,34$). Cando se analizaron as relacións entre a produción de gas ás 24 h dos 19 produtos de macroalgas e a súa composición química, volvéronse observar correlacións positivas coa fracción RES (r = 0,71; $p < 0,001$; n = 19) e coa suma (RES+FS), ambos linealmente ($R^2 = 0,62$; $p < 0,001$; n = 19) e cuadráticamente ($R^2 = 0,68$; $p$ = 0,095. Figura 4.1.1).

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

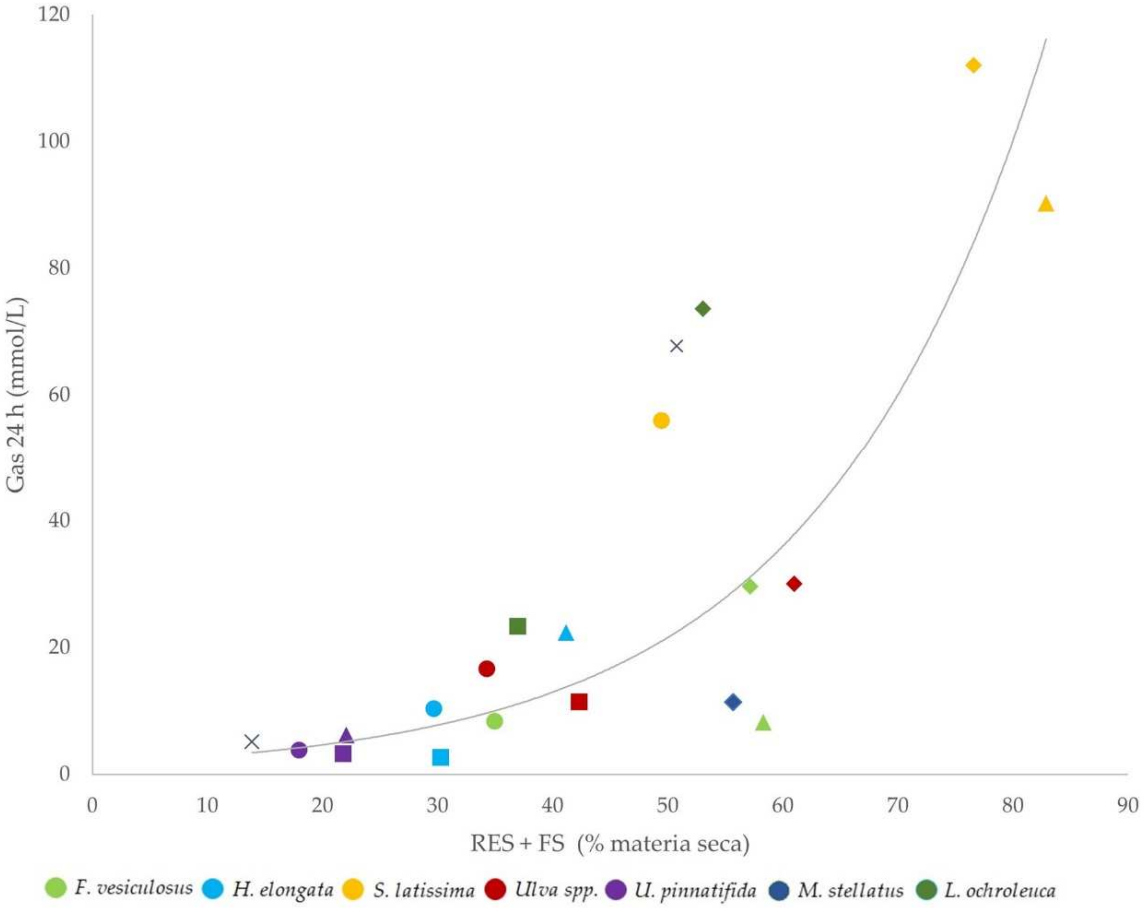



**Figura 4.1.1. Relación entre a produción de gas *in vitro* ás 24 h de incubación (mmol/L) e a suma da fracción RES + FS (% materia seca) nos 19 produtos de macroalgas e 2 ingredientes de referencia (polpa de remolacha e palla). $R^2$ = 0,68; efecto lineal: $p$ < 0,001, efecto cuadrático: $p$ = 0,095; desviación típica residual = 20,1; n = 19. RES = 100-cinzas-PB-FDT. Adaptado de Al-Soufi et al.** [187]**, baixo licenza Creative Common.**

A produción de gas ás 24 h tamén estivo correlacionada negativamente coa PB (r = -0,69; $p$ = 0,001; n = 19) e contido de LAD (r = -0,51; $p$ = 0,025; n = 19), aínda que as correlacións foron menos significativas coa IDMSiv , CDMSiv e CDPBiv (r= 0,37-0,40; $p$ = 0,086-0,12; n = 19), e non se observaron correlacións coa fracción de FS ($p$ = 0,85). Estes resultados indican a complexidade de caracterizar os produtos de macroalgas coas técnicas estándar utilizadas para ingredientes vexetais terrestres. Ademais, a solubilidade non equivale á fermentabilidade nestas mostras, o que podería deberse á presenza de substancias que inhiben a acción enzimática [194,204] ou de compostos altamente fermentables que non se recollen na fracción FDT. A influencia negativa da LAD na produción de gas *in vitro* é similar á observada por Bikker et al. [186] para as macroalgas e ao observado nos ingredientes vexetais terrestres [11], aínda que o significado químico de LAD nas macroalgas podería ser diferente ao das plantas terrestres.

A produción *in vitro* de AGV determinouse só nos produtos de macroalgas máis fermentables e nos 2 materiais de referencia (Táboa 4.1.7). Como era de esperar, a produción

de gas e de AGV totais ás 24 horas estiveron correlacionadas positivamente (r = 0,84; $p$ = 0,018; n = 9). Todos os produtos derivados de *S. latissima* mostraron unha produción total de AGV similar á da polpa de remolacha. Ambos extractos de *S. latissima* aumentaron a produción de AGV en comparación coas macroalgas deshidratadas, probablemente debido á maior concentración de polisacáridos fermentables como a laminarina, como se observou tamén en ruminantes [205,206]. Os outros produtos de macroalgas analizados tiveron unha produción total de AGV inferior ($p$ < 0,05) que os produtos de *S. latissima*.

**Táboa 4.1.7. Produción total *in vitro* de ácidos graxos volátiles (AGV; mmol/L) e proporcións molares de AGV individuais despois de incubar os produtos de macroalgas e os ingredientes de referencia con inóculo cecal de coellos durante 24 h (n = 4) [1]. Adaptado de Al-Soufi et al.** [187]**, baixo licenza Creative Common.**

| | | Proporción molar (mol/100 mol) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **AGV totais** | **Ac** | **Pr** | **But** | **Ibut** | **Val** | **Ival** | **Cap** |
| **Macroalgas deshidratadas** | | | | | | | | |
| *Saccharina latissima* | 37,9 $^{b}$ | 70,1 $^{b}$ | 25,0 | 4,67 $^{a}$ | 0,08 $^{a}$ | 0,12 | 0,03 | 0,00 |
| **Extractos acuosos** | | | | | | | | |
| *Himanthalia elongata* | 14,8 $^{a}$ | 62,1 $^{a}$ | 7,40 | 27,1 $^{b}$ | 2,90 $^{a}$ | 0,47 | 0,00 | 0,00 |
| *Saccharina latissima* | 42,6 $^{b}$ | 67,8 $^{b}$ | 20,7 | 7,60 $^{a}$ | 1,22 $^{a}$ | 1,07 | 0,95 | 0,60 |
| **Extractos hidrolizados** | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 21,1 $^{a}$ | 82,5 $^{b}$ | 10,2 | 4,07 $^{a}$ | 1,62 $^{a}$ | 0,57 | 1,07 | 0,00 |
| *Laminaria ochroleuca* | 18,0 $^{a}$ | 71,2 $^{b}$ | 13,8 | 14,0 $^{b}$ | 0,67 $^{a}$ | 0,35 | 0,00 | 0,00 |
| *Saccharina latissima* | 52,2 $^{b}$ | 74,7 $^{b}$ | 21,2 | 3,77 $^{a}$ | 0,15 $^{a}$ | 0,12 | 0,03 | 0,00 |
| *Ulva* spp. | 20,5 $^{a}$ | 66,2 $^{b}$ | 14,6 | 8,00 $^{a}$ | 10,7 $^{b}$ | 0,37 | 0,05 | 0,00 |
| **Ingredientes de referencia** | | | | | | | | |
| Palla de cereal | 4,20 $^{a}$ | 84,0 $^{b}$ | 10,2 | 5,85 $^{a}$ | 0,00 $^{a}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Polpa de remolacha | 47,4 $^{b}$ | 83,4 $^{b}$ | 14,1 | 2,20 $^{a}$ | 0,17 $^{a}$ | 0,08 | 0,00 | 0,00 |
| EEM (n=4) | 4,73 | 6,51 | 5,57 | 2,94 | 0,75 | 0,33 | 0,37 | 0,20 |

[1] **Ac:** acetato. **Pr:** propionato. **But**: butirato. **Ibut:** isobutirato. **Val:** valerato. **Ival:** isovalerato. **Cap** : caproato. Dentro de cada variable, superíndices diferentes (dentro de cada columna) indican se cada media é diferente ($p$ < 0,05) dos ingredientes de referencia.

Os produtos derivados de *Saccharina latissima* tamén produciron altas proporcións de propionato (25,0, 20,7 e 21,2% para a mostra deshidratada, extracto acuoso e extracto hidrolizado, respectivamente), pero non se diferenciaron do producido pola polpa de remolacha (14,1%) ou a palla (10,2%). A fermentación do extracto acuoso de *H. elongata* e do extracto hidrolizado de *L. ochroleuca* deu lugar a proporcións de butirato máis altas ($p$ < 0,05) que os ingredientes de referencia, o que podería estar asociado co contido de fucoidano [207]. Unha elevada produción de butirato é de interese debido aos seus beneficios para a saúde intestinal, xa que é a principal fonte de enerxía dos colonocitos [208]. En estudos previos en coellos, tras subministrar celobiosa na dieta, a concentración ileal de butirato foi asociada con mellores indicadores de crecemento [167]. O extracto hidrolizado de *Ulva* spp. produciu unha cantidade

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

notable de isobutirato (10,7%), moi superior á polpa de remolacha (0,17%) ou calquera outro produto de macroalgas.

Os polisacáridos das macroalgas, particularmente a laminarina e o fucoidano, demostraron ter un efecto prebiótico en varios estudos *in vitro* e *in vivo* (revisión en [32]), aínda que os seus efectos sobre as proporcións de AGV son variables. Na maioría dos estudos, descubriuse que a laminarina (derivada de macroalgas como *S. latissima* e *L. ochroleuca)* produce altos niveis de gas e aumenta os niveis de acetato [209,210], propionato [209–211] e butirato [211,212]. A fermentación do fucoidano, presente en macroalgas como *F. vesiculosus* e *H. elongata*, entre outras, tamén amosou un aumento das proporcións de acetato e butirato [74], mais unha diminución da de propionato [74,211]. É importante ter en conta que as proporcións de AGV *in vitro* están influenciadas polas macroalgas incubadas pero probablemente tamén pola fonte do inóculo empregado [49].

### 4.1.4. Concentracións mínimas inhibitorias

A maioría dos produtos de macroalgas testados non inhibiron o crecemento bacteriano na concentración máxima probada (8,2 mg/ml. Táboa 4.1.8).

Dúas das macroalgas deshidratadas (*H. elongata* e *U. pinnatifida*) inhibiron o crecemento bacteriano na concentración máxima (8,2 mg/ml, excepto 2,05 mg/ml para *U. pinnatifida* fronte a LM), mais os seus produtos non tiveron o mesmo efecto. Os resultados anteriores indican que estas macroalgas poderían ter algunhas propiedades antimicrobianas [213,214]. Aínda que non se sabe o que causa o efecto antimicrobiano dalgunhas macroalgas, este é principalmente atribuído aos compostos fenólicos [214,215]. No presente estudo, os extractos obtivéronse co obxectivo de aumentar a dixestibilidade e/ou fermentabilidade e concentrar a FS das macroalgas, polo que o efecto antimicrobiano puido desaparecer polo menos parcialmente nestes extractos por mor da ausencia destes compostos.

Dentro dos produtos de macroalgas, *L. ochroleuca* (hidrolizada) e o extracto hidrolizado de *S. latissima* tamén mostraron respostas inhibitorias cando se probaron nas concentracións máximas. Desafortunadamente, a mostra deshidratada de *L. ochroleuca* non estivo dispoñible para analizar, e é posible que tamén puidera mostrar un efecto inhibidor. Pola contra, a mostra deshidratada de *S. latissima* non mostrou ningún efecto inhibidor, o que suxire que o efecto positivo observado no extracto hidrolizado pode estar asociado con outros compostos concentrados neste produto de macroalgas [214]. Sería necesario realizar máis estudos con diferentes disolventes e extractos para permitir chegar a conclusións sólidas sobre os potenciais efectos inhibidores destas macroalgas. Non obstante, os resultados positivos apareceron só na concentración máxima, o que correspondería *in vivo* a unha inclusión das macroalgas nunha proporción do 2,5% na dieta. Ademais, hai que ter en conta que *H. elongata, U. pinnatifida, L. ochroleuca* e *S. latissima* son macroalgas pardas cun alto contido en iodo, o que limita a cantidade que se podería incluír na alimentación dos coellos (Regulamento CE 1334/2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.1.8. Concentracións mínimas inhibitorias (CMI; mg/mL) dos produtos de macroalgas testados contra bacterias aerobias e anaerobias [1]. Adaptado de Al-Soufi et al.** [187]**, baixo licenza Creative Common.**

| | EC434 | EC727 | S.ty | S.ent | EC R1 | EC R2 | LM | Pse | C.per | C.dif |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Macroalgas deshidratadas** | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Himanthalia elongata* | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | - | - |
| *Saccharina latissima* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Ulva* spp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Undaria pinnatifida* | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 2,05 | 8,2 | - | - |
| **Macroalgas hidrolizadas** | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Himanthalia elongata* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Laminaria ochroleuca* | - | - | 8,2 | 8,2 | - | 8,2 | 8,2 | 8,2 | - | - |
| *Ulva* spp. | - | - | - | - | - | - | 8,2 | - | - | - |
| *Undaria pinnatifida* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **Extractos acuosos** | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Himanthalia elongata* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Saccharina latissima* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Undaria pinnatifida* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **Extractos hidrolizados** | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Laminaria ochroleuca* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Saccharina latissima* | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | - | - |
| *Ulva* spp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Mastocarpus stellatus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

[1] **EC 434** : *Escherichia coli* CECT 434. **EC727:** *Escherichia coli* CECT 727. **S. ty:** *Salmonella typhimurium*. **S. ent:** *Salmonella enteritidis*. **EC R1:** *Escherichia coli* R1 (LREC). **EC R2:** *Escherichia coli* R2 (LREC). **LM:** *Listeria monocytogenes*. **Pse:** *Pseudomonas aeruginosa*. **C. per:** *Clostridium perfringens*. **C. dif :** *Clostridium difficile*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 4.2. CAPÍTULO II: AVALIACIÓN DE MACROALGAS E EXTRACTOS DE MACROALGAS COMO FONTE DE MINERAIS EN MÚLTIPLES SISTEMAS DE PRODUCIÓN GANDEIRA.

### 4.2.1. Composición mineral das macroalgas deshidratadas

#### 4.2.1.1. Macrominerais

As concentracións de macrominerais nas macroalgas deshidratadas preséntanse na Táboa 4.2.1. As concentracións de Ca foron altas e bastante similares na maioría das especies de macroalgas (12,3-31,1 g/kg de macroalgas sobre materia seca (MS)), mentres que o P foi o macromineral menos abundante (3,41-13,5 mg/kg MS) en todas as especies de macroalgas. As concentracións de Mg en *Ulva* spp. (54,04 g/kg MS) e o S en *Ulva* spp. e *M. stellatus* foron de 121,8 e 134,0 g/kg MS, respectivamente; e foron notablemente elevadas en comparación co resto de especies analizadas. O K tamén se atopou en niveis moi elevados na maioría das macroalgas pardas (47,32-160,2 g/kg MS) así como o Na (28,6-67,2 g/kg MS), atopándose as concentracións máis altas deste elemento en *H. elongata* (67,2 g/kg MS).

**Táboa 4.2.1. Concentracións de macrominerais (g/kg MS) nas especies de macroalgas seleccionadas [1].**

| Especie | Ca | Mg | P | K | Na | S |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *F. vesiculosus* | 23,6±3,7 | 12,5±4,5 | 13,5±1,58 | 47,3±0,9 | 28,3±7,6 | 49,4±11,7 |
| *H. elongata* | 17,2±2,9 | 11,1±3,9 | 10,5±6,4 | 148,9±3,4 | 67,2±3,4 | 25,6±6,6 |
| *U. pinnatifida* | 17,2±2,0 | 8,89±1,96 | 8,71±3,27 | 126,5±50,5 | 59,8 ± 10,0 | 15,2±2,5 |
| *L. ochroleuca* | 23,7±0,9 | 10,5±2,2 | 5,16±1,81 | 160,2±7,8 | 54,4±21,0 | 21,3±0,3 |
| *S. latissima* | 21,4±8,4 | 7,27±3,29 | 4,39±2,58 | 144,6±3,4 | 54,0±3,4 | 12,6±4,7 |
| *Ulva* spp. | 12,3±3,1 | 54,0 ± 11,0 | 3,41±0,84 | 12,3±2,1 | 16,4±0,5 | 121,8±20,0 |
| *M. stellatus* | 31,1±9,4 | 14,5±0,3 | 3,85±0,47 | 31,1±3,1 | 66,1±20,7 | 134,0±4,1 |

[1] Os valores exprésanse como media ± desviación estándar (n = 3).

A comparación destes resultados coa bibliografía existente só pode realizarse de forma ampla, xa que en moitos casos a literatura refírese a un xénero enteiro (por exemplo, *Laminaria* ou *Fucus*) ou a outras especies similares (por exemplo, *Ulva lactuca*), ademais de ter en conta as diferenzas esperables relacionadas co momento de recollida das mostras ou a localización xeográfica das mesmas [159]. En xeral, os nosos resultados coinciden coa composición macromineral publicada nos estudos que analizan as mesmas macroalgas deshidratadas (ver Táboa 4.2.2). Os macrominerais K, Na, Mg, Ca e S atopáronse xeralmente en niveis moi altos, representando máis do 97% do contido mineral total das macroalgas [61,91,92], mentres que o P tamén foi o macromineral menos abundante. As macroalgas pardas son consideradas as principais contribuíntes de Na e K, mentres que as macroalgas vermellas teñen uns contidos de Ca notablemente altos e as macroalgas verdes son particularmente ricas en Mg [91]. O xofre tamén é un compoñente principal de moitos dos polisacáridos sulfatados, como os fucoidanos (presentes nalgunhas macroalgas pardas), os ulvanos (macroalgas verdes) e os galactanos (macroalgas vermellas) [90], o que explica que aparecera en altas concentracións en *F. vesiculosus* , *Ulva* spp. e *M. stellatus* [91].

USC DE SANTIAGO

**Táboa 4.2.2: Revisión bibliográfica da concentración de macrominerais presentes nas especies de macroalgas analizadas (g/kg MS) [1] .**

| Especie | Ca | Mg | P | K | Na | S | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *F. vesiculosus* | 30,0 | 6,7 | 1,00 | 25,0 | 18,0 | | [98] |
| | 7,0 | 8,0 | | 52,0 | 38,0 | | [91] |
| | 9,38 | 9,94 | | 43,2 | 54,7 | | [90] |
| *H. elongata* | 18,0 | 9,4 | 1,50 | 47,0 | 39,0 | | [98] |
| | 12,0 | 2,0 | | 78,0 | 18,0 | | [91] |
| *U. pinnatifida* | 13,0 | 10,0 | | 63,0 | 52,0 | | [91] |
| | 9,31 | 11,8 | | 86,9 | 70,6 | | [90] |
| *L. ochroleuca* | 12,6 | 6,11 | 2,57 | | | | [92] |
| *L. digitata* | 15,0 | 6,30 | 1,60 | 31,0 | 27,0 | | [98] |
| | 8,67-21,4 | 6,87-7,43 | 2,30-3,15 | 50,2-76,0 | 34,3-38,0 | 13,9-14,2 | [186] |
| | 14-19 | 7,4-12,5 | 1,6-3,9 | | | | [159] |
| | 10,1 | 6,59 | | 115,8 | 38,2 | | [90] |
| *L. hyperborea* | 11-16 | 5,8-8,6 | 1,5-3,7 | | | | [159] |
| *Laminaria* spp. | 10,0 | 4,0 | 2,00 | 52,0 | 13,0 | | [91] |
| *S. latissima* | 17,0 | 7,70 | 2,50 | 100,0 | 24,0 | | [98] |
| | 9,59 | 5,31 | 2,26 | | | | [92] |
| | 9,0 | 5,00 | 2,00 | 39,0 | 30,0 | | [91] |
| | 9,13-10,7 | 7,31-7,72 | 1,35-2,24 | 39,6-51,7 | 32,6-38,3 | 8,16-8,39 | [186] |
| *Ulva* spp. | 3,7 | 19,0 | 2,0 | 16,0 | 16,0 | | [91] |
| | 7,46 | 19,5 | 1,28 | | | | [92] |
| *U. lactuca* | 16,0 | 27,0 | 2,20 | 28,0 | 7,0 | | [98] |
| | 6,52-45,8 | 16,5-17,3 | 0,92-1,51 | 16,7-17,7 | 25,8-40,9 | 30,9-44,2 | [186] |
| *M. stellatus* | 6,7 | 7,90 | 1,40 | 20,0 | 27,0 | | [98] |

[1] Os valores da táboa exprésanse como media ou rango de concentración dependendo da bibliografía.

Se comparamos o contido de macrominerais das macroalgas analizadas con outros ingredientes empregados comunmente en nutrición animal [216], observamos que as concentracións da maioría dos macrominerais foron polo menos unha orde de magnitude máis altas nas macroalgas que na maioría dos cereais e leguminosas. Por exemplo, o Ca atópase en baixas concentracións na maioría dos cereais e leguminosas (0,4-5,5 g/kg MS), mentres que os valores deste macromineral alcanzaron niveis que oscilan entre 12,3 e 31,1 g Ca/kg MS nas macroalgas, os cales son comparables a ingredientes de orixe animal, como a fariña de peixe ou as proteínas animais procesadas (20,9-48,6 g/kg MS). Do mesmo xeito, no caso do P, este elemento atopouse en niveis similares nas macroalgas (3,41-13,5 g/kg MS) e na maioría das proteínas animais procesadas (6,4-44,4 g/kg MS), mentres que superou os niveis reportados na maioría dos cereais e leguminosas (2,4-6,3 g/kg MS). As macroalgas presentaron

concentracións de Mg, K, Na e S moito máis altas que calquera outro ingrediente empregado en alimentación animal, xa que se atopan en niveis moi baixos en todos os cereais (Mg: 1-2; K: 2-5,5; Na: 0,04-0,35; S: 0,5-1,8 g/kg MS), leguminosas (Mg: 1,3-4; K: 8,2-20,2; Na: 0-0,95; S: 1,6-3,6 g/kg MS) e ingredientes de orixe animal (Mg: 0,7). -9,1; K: 1,4-11,9; Na: 0,99-11,7; S: 1,2-18,2 g/kg MS). De feito, as dietas completas elaboradas para o gando adoitan complementarse con suplementos minerais que inclúen os macrominerais esenciais [103] para contrarrestar os baixos niveis da maioría destes elementos [217] nos ingredientes habituais. Por tanto, as macroalgas serían unha excelente fonte destes minerais, e a súa inclusión en baixas doses nas dietas animais axudaría a proporcionar a maioría dos requerimentos de macrominerais do gando de forma sostible. Isto tamén axudaría a superar o desafío económico que enfrontan os sistemas modernos de produción animal debido ao aumento de prezos dos macrominerais.

4.2.1.2. Elementos traza esenciais

As concentracións de elementos traza esenciais foron moi variables (diferenzas de ata o dobre) nas especies de macroalgas estudadas (ver Táboa 4.2.3). *F. vesiculosus* foi notablemente rica na maioría dos elementos, que se atoparon a niveis de unha orde de magnitude superiores aos do resto de macroalgas; sendo os niveis de Cr, Fe e Ni comparables só cos de *M. stellatus*. Todas as macroalgas estudadas presentaron cantidades excepcionalmente altas de iodo, sendo *Ulva* spp. a que mostrou a menor cantidade (92,8 mg/kg MS) e *S. latissima* a maior (4131 mg/kg MS), seguida de *L. ochroleuca* (2780 mg/kg MS).

**Táboa 4.2.3. Concentración de elementos traza esenciais (mg/kg MS) nas especies de macroalgas deshidratadas analizadas [1].**

| Especie | Co | Cr | Cu | Fe | I | Mn | Mo | Ni | Se | Zn |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *F. vesiculosus* | 1,85±1,07 | 15,7±8,4 | 5,83±0,43 | 1233±107 | 396±64 | 597±74 | 1,070±0,281 | 8,45±2,80 | 0,296±0,016 | 92,4±70,7 |
| *H. elongata* | 1,41±0,06 | 2,01±0,47 | 2,06±0,16 | 57±8 | 134±7 | 53,8±12,4 | 0,280±0,010 | 3,25±2,80 | 0,096±0,032 | 53,2±3,0 |
| *U. pinnatifida* | 0,353±0,029 | 1,53±1,32 | 0,84±0,10 | 97±24 | 284±27 | 10,3±2,2 | 0,232±0,026 | 0,957±0,42 | 0,143±0,041 | 23,2±6,61 |
| *L. ochroleuca* | 0,256±0,018 | 1,62±0,78 | 1,43±0,24 | 122±38 | 2780±216 | 10,8±3,8 | 0,224±0,031 | 0,881±0,33 | 0,183±0,021 | 25,0±2,4 |
| *S. latissima* | 0,196±0,064 | 4,12±1,80 | 1,18±0,29 | 446±174 | 4131±202 | 14,1±6,21 | 0,320±0,087 | 1,47±0,342 | 0,149±0,043 | 32,4±8,6 |
| *Ulva* spp. | 0,283±0,042 | 4,29±2,94 | 2,65±0,39 | 460±155 | 92,8±4,42 | 37,7±10,1 | 0,257±0,038 | 5,01±0,17 | 0,144±0,034 | 10,4±0,7 |
| *M. stellatus* | 0,582±0,070 | 12,5±6,23 | 3,86±1,90 | 1403±103 | 204±118 | 45,9±17,9 | 0,567±0,058 | 9,88±2,99 | 0,172±0,038 | 50,9±28,9 |

[1] Os valores exprésanse como media ± desviación estándar (n=3).

En xeral, os nosos resultados son equiparables aos publicados na bibliografía (Táboa 4.2.4), aínda que os niveis de Fe e Mn foron relativamente máis altos no noso caso (*F. vesiculosus, M. stellatus*) e as concentracións de Se foron máis baixas (*S. latissima* ou *Ulva* spp.) en comparación con algúns destes estudos. O contido de I das mostras analizadas atopáronse dentro dos rangos establecidos na bibliografía para estas especies, aínda que nalgunhas especies, como *L. ochroleuca* e *S. latissima*, os niveis de I variaron moito entre os diferentes estudos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A diferenza dos macrominerais, a maioría dos elementos traza esenciais presentes nas macroalgas atopáronse dentro dos mesmos intervalos de concentración que os descritos para os principais ingredientes utilizados en alimentación animal [216], incluídos os cereais (Zn: 15-34; Cu: 3-13; Se: 0,08-0,5; Co: 0,03-0,3; Mo: 0,2-1 mg/kg MS) e as leguminosas (Zn: 29-52; Cu: 3-61; Se: 0,01-0,8; Co: 0,01-0,4; Mo: 0,2-4 mg/kg MS), aínda que nalgúns casos en concentracións máis baixas en comparación cos ingredientes de orixe animal (Zn: 24-138; Cu: 10-40; Se: 0,4-2; Co: 0,1-3; Mo: 0,1-1 mg/kg MS). O iodo foi a excepción máis notable, xa que superou o contido de calquera outro ingrediente (rango 0,01-3 mg I/kg MS) en varias ordes de magnitude (especialmente en *L. ochroleuca* e *S. latissima*). As concentracións de Fe tamén foron moi elevadas en *F. vesiculosus* (1233 mg/kg MS) e *M. stellatus* (1403 mg/kg MS), en comparación coa maioría dos cereais e leguminosas (40-422 mg/kg MS), e foron similares ás concentracións dalgúns ingredientes de orixe animal (59-5131 mg/kg MS). A concentración de Mn tamén foi maior en *F. vesiculosus* (597 mg/kg MS) que na maioría dos ingredientes descritos (8-65 mg/kg MS en cereais e leguminosas, 3-258 mg/kg MS en ingredientes de orixe animal).

Estes achados apoian a idea de que algunhas especies de macroalgas, en particular *F. vesiculosus, M. stellatus, L. ochroleuca* e *S. latissima* poderían ser potencialmente empregadas como fontes sostibles de Fe, Mn e I [93], e poderían incluírse na alimentación do gando para cubrir as súas necesidades de certos minerais [57,92,95], ao tempo que enriquecería os produtos de orixe animal con algúns minerais esenciais [62,91]. De feito, algunhas macroalgas xa se veñen empregando historicamente para previr o bocio, e o seu uso en dietas animais -para producir alimentos ricos en iodo- xa se propuxo como alternativa ás sales iodadas para previr a deficiencia de iodo en moitos países europeos [91,94].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.2.4. Revisión bibliográfica do contido en elementos traza esenciais nas especies de macroalgas estudadas (mg/kg MS) [1].**

| Especie | Co | Cr | Cu | Fe | I | Mn | Mo | Ni | Se | Zn | Ref |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *F. vesiculosus* | | | 3,7 | 290 | 260 | 37 | | | 0,08 | 28 | [98] |
| | | | 17 | 398 | | 238 | | | | 114 | [91] |
| | | | <5 | 42 | | 55 | | | | 37 | [90] |
| *H. elongata* | | | 1,1 | 20 | 59 | 6,1 | | | 0,05 | 23 | [98] |
| | | | 2 | 14 | 117 | 10-47 | | | | 4-40 | [91] |
| | | | | | 36,8 | | | | | | [218] |
| *U. pinnatifida* | 0,1-0,4 | | 1 | 43-46 | 306 | 1-7 | | | 0,5 | 4-22 | [91] |
| | | | | | 305,6 | | | | | | [218] |
| | | | <5 | 75 | | 8,7 | | | | | [90] |
| *L. ochroleuca* | 0,12 | 1,08 | 1,23 | 179 | 883,5 | 8,62 | 0,20 | 0,97 | 0,94 | 24,8 | [92] |
| | | | | | 6138 | | | | | | [218] |
| *L. digitata* | | | 1,3 | 150 | 10000 | 3,1 | | | 0,07 | 81 | [98] |
| | 0,1-0,503 | | <5 | 94-697 | | 15-16 | | 0,8-1,7 | 0,1-0,4 | 14-29 | [186] |
| | | | <5 | 32 | | <5 | | | | 17 | [90] |
| | 0,04-0,09 | 0,25-0,4 | 0,45-1,05 | 49-161 | 4149-11476 | 2,4-4,4 | 0,6-1,1 | 0,5-4 | 0,2-0,6 | 30-72 | [159] |
| *L. hyperborea* | 0,07-0,34 | 0,2-0,7 | 0,36-1,2 | 46-167 | 3479-6259 | 1,8-4,1 | 0,5-1,2 | 0,3-2,2 | 0,2-0,6 | 30-78 | [159] |
| *S. latissima* | | | 1,2 | 160 | 4600 | 5,7 | | | 0,06 | 25 | [98] |
| | 0,39 | 1,72 | 1,17 | 30 | 957,6 | 3,9 | 0,24 | 1,38 | 1,3 | 41,6 | [92] |
| | 0,4 | | 1-38 | 30-1854 | 958 | 4-6 | | | 1,3 | 39-42 | [91] |
| | 0,1 | | <5 | 235-290 | | 5-17,7 | | 1,2-1,4 | <0,1 | 31-32 | [186] |
| *Ulva* spp. | 0,25 | 1,84 | 3,36 | 139 | 23,3 | 12,7 | 0,22 | 6,4 | 1,95 | 16,2 | [92] |
| | 0,1-0,6 | | 2-9 | 190-2830 | 8-66 | 16-91 | | | 0,3 | 4-30 | [91] |
| *U. lactuca* | | | 7,1 | 1800 | 43 | 26 | | | 0,14 | 19 | [98] |
| | 0,1-1,26 | | <5 | 214-3460 | | 11-441 | | 3,7-21 | 0,1-0,64 | 12-54 | [186] |
| *Ulva rigia* | | | | | 65,6 | | | | | | [218] |
| *M. stellatus* | | | 3,7 | 200 | 340 | 7,1 | | | 0,1 | 72 | [98] |

[1] Os valores da táboa exprésanse como media ou rango de concentración dependendo da bibliografía.

#### 4.2.1.3. Elementos traza potencialmente tóxicos

As macroalgas avaliadas neste estudo acumularon niveis baixos de Cd (0,095-1,18 mg/kg MS), Hg (0,004-0,039 mg/kg MS) e Pb (0,267-1,48 mg/kg MS) (ver Táboa 4.2.5). Pola contra, o As atopouse en altas concentracións, principalmente nas macroalgas pardas (46,3-68,9 mg/kg MS), sendo os niveis baixos en *Ulva* spp. (4,10 mg/kg MS) e intermedios en *M. stellatus* (14,1 mg/kg MS).

**Táboa 4.2.5. Elementos traza potencialmente tóxicos (mg/kg MS) nas especies de macroalgas estudadas[1].**

| Especie | Cd | Hg | Pb | As |
|---|---|---|---|---|
| *F. vesiculosus* | 0,693±0,151 | 0,012 ± 0,004 | 1,480±0,628 | 54,6±10,6 |
| *H. elongata* | 0,383±0,017 | 0,004 ± 0,001 | 0,267±0,039 | 46,3±2,69 |
| *U. pinnatifida* | 0,388±0,055 | 0,012 ± 0,007 | 0,541±0,310 | 48,1±4,49 |
| *L. ochroleuca* | 0,225±0,113 | 0,010 ± 0,003 | 0,347±0,087 | 56,0 ± 2,0 |
| *S. latissima* | 0,264±0,095 | 0,019 ± 0,005 | 0,452±0,085 | 68,9±13,0 |
| *Ulva* spp. | 0,095 ± 0,002 | 0,007 ± 0,000 | 0,624±0,059 | 4,10±0,37 |
| *M. stellatus* | 1,184±0,531 | 0,039 ± 0,025 | 0,447±0,116 | 14,1±0,35 |

[1] Os resultados exprésanse como media ± desviación estándar (n = 3).

Estes resultados coinciden coa bibliografía existente para estas especies (Táboa 4.2.6), aínda que non se realizaron moitos estudos con estas mesmas especies. Como xa foi descrito, a absorción de substancias tóxicas por parte das macroalgas depende de moitos factores ambientais, así como da composición de polisacáridos de cada macroalga, que teñen unha afinidade variable por estes compostos [91]. En xeral, o contido en elementos potencialmente tóxicos destas macroalgas é similar ao descrito noutras materias primas de orixe terrestre de rexións pouco contaminadas [219]. Sen embargo, o contido total de As nas macroalgas, especialmente nas algas pardas, é moito máis elevado (ata varias ordes de magnitude) que o da maioría das materias primas terrestres [165].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.2.6. Revisión bibliográfica de elementos traza potencialmente tóxicos nas especies de macroalgas estudadas (mg/kg MS) [1].**

| Especie | Cd | Hg | Pb | As | iAs | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *F. vesiculosus* | 0,5-1 | 0,04 | 0,5-4 | 34-50 | | [91] |
| | 0,55 | 0,036 | 0,51 | 50 | 0,34 | [220] |
| | 0,41 | | 0,89 | 40,4 | 0,29 | [221] |
| *H. elongata* | | | 0,3 | 8 | | [91] |
| | 0,2-0,4 | | 0,1-0,2 | 21-31 | 0,20 | [221] |
| *U. pinnatifida* | 0,1-0,3 | | 1 | 13-26 | | [91] |
| | 0,13-1,9 | 0,01-0,02 | 0,05 | 32-42 | 0,15-0,26 | [220] |
| | 0,2-2,1 | | 0,11-2,4 | 28-46 | 0,2-1,12 | [221] |
| *L. ochroleuca* | 0,30 | 0,03 | 0,13 | 54.1 | | [92] |
| *Laminaria* spp. | 0,1-3,4 | | 0,4-0,5 | 27-49 | | [91] |
| | 0,07-0,91 | | 0,1-0,26 | 39,6-116 | 0,14-1,44 | [221] |
| *L. japonica* | 0,15-0,3 | 0,03 | 0,05 | 47-53 | 0,25-0,29 | [220] |
| *L. digitata* | 0,07-0,15 | 0,01-0,05 | 0,01-0,11 | 136-247 | | [159] |
| *L. hyperborea* | 0,47-1,63 | 0,01-0,03 | 0,01-0,14 | 74-615 | | [159] |
| *S. latissima* | 1,65 | 0,12 | 0,20 | 67,1 | | [92] |
| *Ulva* spp. | 0,65 | 0,07 | 0,89 | 10,8 | | [92] |
| | 0,1 | | 1 | 0,8-3 | | [91] |
| *Ulva rigida* | | | | 3,1 | 0,40 | [96] |
| *M. papillatus* | | | | 18,3 | 0,54 | [96] |

[1] Os valores da táboa exprésanse como media ou rango de concentración dependendo da bibliografía.

Debido aos altos niveis de As observados nalgunhas das especies de macroalgas deste estudo, realizouse a especiación de As -formas inorgánicas e orgánicas- en todas as mostras de macroalgas, como se resume na Táboa 4.2.7. As recuperacións totais foron de entre o 60 e o 90% do As total, de forma similar aos resultados obtidos en outros estudos de especiación de As en macroalgas [14]. O arsénico inorgánico (iAs) apareceu en forma de As (III) e As (V), e a súa concentración en todas as macroalgas foi moi baixa (<1 mg/kg MS), o que coincide cos valores de referencia publicados anteriormente [97,222]. A maioría do As estivo composto por formas orgánicas, sendo os arseno-azucres a fracción máis importante dos estudados. Estes resultados xa se observaron en estudos previos en numerosas especies de macroalgas [96–98]. Sen embargo, aínda non se demostrou definitivamente que os arseno-azucres non sexan tóxicos e, polo tanto, deberían consumirse en doses baixas [223]. Outras fraccións de moi baixa toxicidade -ácido dimetilarsínico (DMA) e ácido monometilarsónico (MMA)- ou sen risco de toxicidade -arsenobetaína (AsB)- atopáronse en concentracións moi baixas. A maioría das especies de macroalgas citadas na bibliografía presentaron patróns similares de especiación de As [222,223], o que indica a capacidade destes organismos de metabolizar as especies tóxicas de iAs (As III e As V) presentes na auga do mar a formas menos tóxicas, como DMA,

MMA e arseno-azucres. Non obstante, outras macroalgas (por exemplo as especies de macroalgas pardas da familia Sargassaceae ou Hijiki) non teñen esta capacidade e, polo tanto, a maior parte do seu As está composto por iAs, o que supón un risco para os consumidores [222]. Os nosos resultados confirman que nestas especies de macroalgas en concreto, as altas cantidades de arsénico non suporían un risco nin para os animais nin para os consumidores dos produtos derivados dos animais que as consuman.

**Táboa 4.2.7. Resultados da especiación de As (mg/kg MS) nas especies de macroalgas estudadas [1].**

| Especie | As III | As V | As-azucres | DMA | MMA | AsB |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *F. vesiculosus* | 0,189±0,167 | 0,089±0,100 | 26,11±11,5 | 0,801±0,158 | 0,538±0,483 | 0,119±0,124 |
| *H. elongata* | 0,337±0,337 | 0,093±0,087 | 16,79±5,11 | 0,577±0,046 | 0,127±0,012 | 0,061±0,004 |
| *U. pinnatifida* | 0,149±0,243 | 0,001±0,001 | 27,58±2,76 | 1,088±0,001 | 0,124±0,095 | 0,077±0,147 |
| *L. ochroleuca* | 0,362±0,296 | 0,126±0,101 | 31,81±6,24 | 0,779±0,054 | 0,158±0,065 | 0,049±0,040 |
| *S. latissima* | 0,193±0,280 | 0,406±0,051 | 49,87±11,66 | 0,938±0,389 | 0,342±0,203 | 0,188±0,067 |
| *Ulva* spp. | 0,004±0,004 | 0,182±0,018 | 1,39±0,17 | 0,478±0,638 | 0,737±0,720 | 0,113±0,052 |
| *M. stellatus* | <LD | 0,150±0,107 | 7,60±0,36 | 0,318±0,186 | 0,349±0,007 | 0,010±0,013 |

[1] Os resultados exprésanse como media ± desviación estándar (n = 3). As abreviaturas dentro da táboa son as seguintes: DMA (ácido dimetilarsónico), MMA (ácido monometilarsónico), AsB (arsenobetaína) e LD (límite de detección).

### 4.2.2. Variación das concentracións de minerais nos extractos de macroalgas

As variacións observadas nos extractos das diferentes especies de macroalgas con respecto aos niveis das súas respectivas macroalgas deshidratadas están representadas na Figura 4.2.1. As concentracións da maioría dos macrominerais (excepto Ca e P) foron máis altas (entre o 6-162%) na maioría dos extractos (excepto *S. latissima* e *M. stellatus*) que nas correspondentes especies de macroalgas deshidratadas. A concentración de K foi moi elevada nos extractos de *U. pinnatifida* (331,9 g/kg MS) e *L. ochroleuca* (313,4 g/kg MS), mentres que o extracto de *Ulva* spp. presentou niveis máis altos de case todos os macrominerais en comparación cos da alga deshidratada. Este é un resultado positivo xa que *Ulva* spp. xeralmente presentou cantidades máis baixas de todos os macrominerais que as demais algas. As concentracións de elementos traza esenciais foron en xeral máis baixas nos extractos (un 20-98%), con poucas excepcións (só Cr en *H. elongata*). A concentración de I mantívose ou aumentou considerablemente nos extractos da maioría das especies, especialmente no caso de *L. ochroleuca* e *M. stellatus,* que tiveron incrementos do 110 e do 197%, respectivamente. Pola contra, o proceso de extracción tivo un efecto positivo sobre o contido de elementos potencialmente tóxicos, xa que os niveis da maioría destes elementos reducíronse considerablemente (nun 20-97%), aínda que o As foi o único elemento potencialmente tóxico que se atopou en cantidades lixeiramente inferiores (20-25%) ou nalgúns casos superiores (7-40%) en comparación coas descritas nas macroalgas deshidratadas. En cambio, o iAs atopouse en cantidades significativamente menores (ata o 100%) nos extractos da maioría das especies de macroalgas, ou lixeiramente maiores en *H. elongata* e *M. stellatus*; mentres que o extracto

USC DE SANTIAGO

de *Ulva* spp. presentou niveis de iAs superiores (200%) aos da mostra deshidratada. Sen embargo, o iAs atopouse en concentracións moi baixas (por debaixo de 0,6 mg/kg de MS) en todos os extractos estudados.

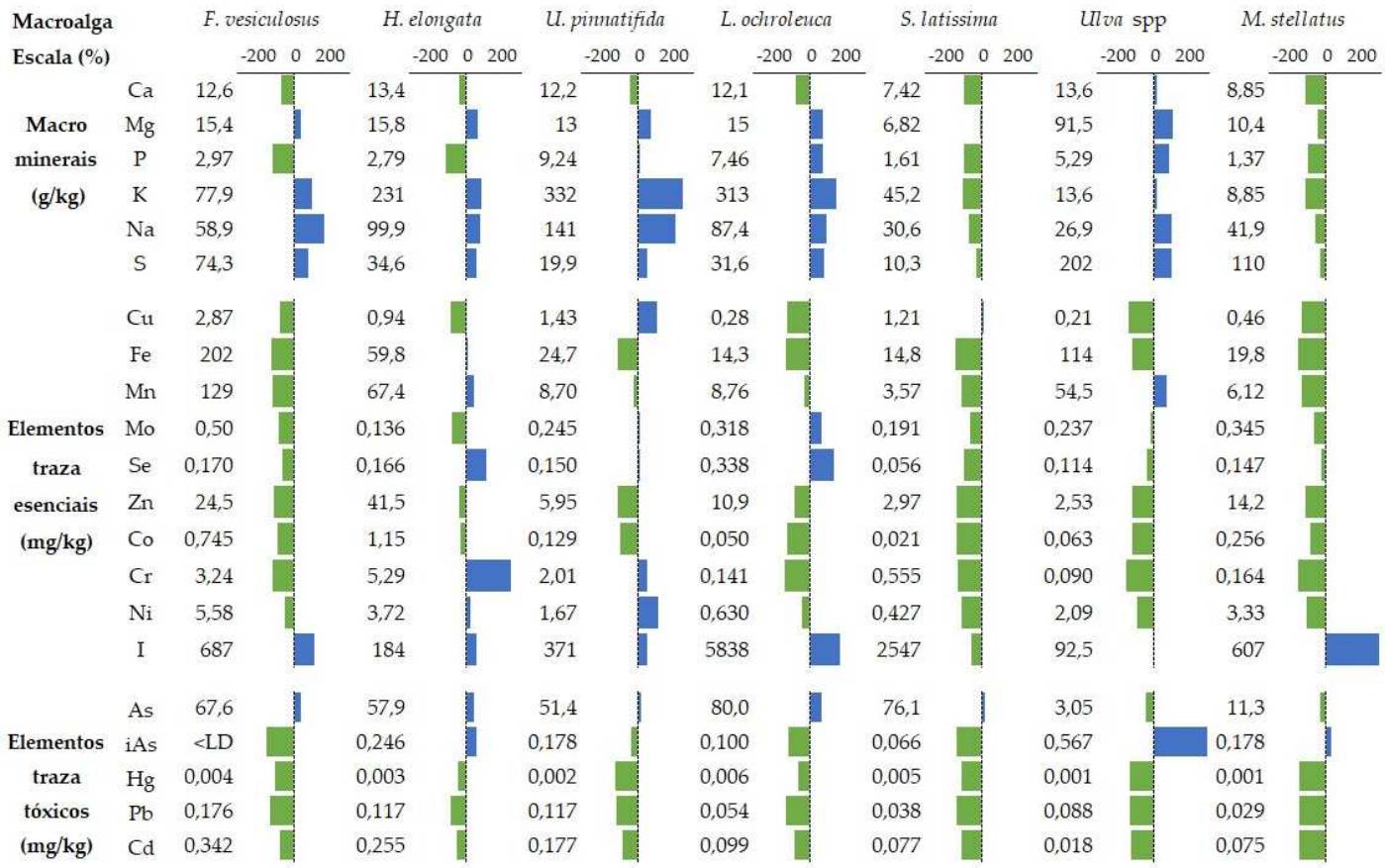



**Figura 4.2.1. Variación nas concentracións de minerais nos extractos de macroalgas, representadas como porcentaxe de aumento (azul) ou diminución (verde) con respecto ás macroalgas deshidratadas (escala nun rango de 200%).**

Nos últimos anos, os extractos de macroalgas veñen sendo incorporados a baixas doses en alimentación animal, polo seu contido en prebióticos ou polas súas potenciais propiedades inmunomoduladoras. Os nosos resultados indican que estes extractos de macroalgas proporcionarían cantidades valiosas dalgúns macrominerais, especialmente do I, que ao mesmo tempo poderían constituír unha limitación para o seu uso en alimentación animal. Cabe destacar que os resultados deste estudo refírense a extractos xerados mediante unha tecnoloxía de procesamento específica. Sen embargo, as variacións na tecnoloxía de extracción utilizada (tecnoloxías convencionais fronte a innovadoras) e mesmo as condicións de procesamento empregadas coa mesma tecnoloxía (temperatura, solventes, pH) inflúen significativamente na composición química dos extractos obtidos a partir da biomasa inicial [89] e, por tanto, as concentracións de minerais nos distintos extractos poderían variar enormemente. Nun futuro será necesario realizar máis estudos para explorar o efecto destas tecnoloxías e outras condicións de procesamento das macroalgas sobre as concentracións de minerais dos produtos resultantes.

### 4.2.3. Límites de inclusión de macroalgas deshidratadas e os seus extractos en alimentación animal

Co fin de garantir a seguridade dos animais, dos consumidores e do medio ambiente, a UE estableceu os niveis máximos permitidos de elementos traza esenciais e potencialmente tóxicos nos pensos completos dos animais de produción. Ao comparar as concentracións de minerais das especies de macroalgas avaliadas no noso estudo con estes límites regulamentarios, observamos que o iodo foi o elemento máis limitante, sendo as concentracións máximas de I permitidas en alimentación animal (5-20 mg/kg de penso completo cun contido de humidade do 12%) superadas en todas as especies de macroalgas estudadas (ata o dobre). O nivel máximo de inclusión para os diferentes produtos de macroalgas, tanto deshidratadas como extractos, debe ser por tanto axustado de forma precisa.

Os límites de inclusión calculados para as macroalgas deshidratadas e os extractos preséntanse na Táboa 4.2.8, considerando a cantidade de I xa proporcionada polas materias primas nas dietas estándar (sen suplementación de minerais; datos tomados de Paemel *et al*. [165]) e a concentración máxima de I permitida no penso completo (Regulamento CE 1459/2005). Os niveis de inclusión variaron entre as distintas especies produtivas, xa que a concentración máxima permitida de I no penso pola lexislación varía desde os 5 mg/kg de penso completo en pitas poñedoras e vacún de leite, ata os 20 mg/kg de penso completo permitidos nos casos de pensos para peixes, aínda que o iodo basal nas dietas estándar é relativamente baixo e similar entre todas as especies gandeiras (excepto no caso das dietas para peixes).

*L. ochroleuca* e *S. latissima* merecen unha atención especial debido aos seus niveis extremadamente altos de I. Por tanto, estas macroalgas só poden ser incluídas en moi pequenas cantidades nas dietas dos animais. *L. ochroleuca* podería engadirse entre un 0,16 e 0,66% cando se utiliza como macroalga deshidratada, e entre un 0,076-0,32% cando se emprega como extracto. No caso de *S. latissima*, a macroalga deshidratada podería engadirse entre o 0,11 e o 0,45%, mentres que a cantidade permitida como extracto estaría limitada a un 0,18-0,72%. O resto das especies de macroalgas pódense incluír nos pensos animais a niveis que oscilan entre o 1 e o 2% (*F. vesiculosus, U. pinnatifida* e *M. stellatus*) e o 5 % (*Ulva* spp.) cando se usan en forma deshidratada en pitas poñedoras e en vacún de leite; mentres que estes niveis de inclusión aumentan aproximadamente x4 nas dietas de peixes e x2 na dieta do resto das especies. Estes rangos de inclusión, aínda que son baixos, atópanse en xeral dentro dos niveis de inclusión nos que se soen empregar actualmente as macroalgas deshidratadas en estudos en animais (< 2%), xa que os seus efectos beneficiosos obsérvanse a baixas doses [59]. Os límites de inclusión dos extractos son máis baixos (agás para *Ulva* spp.) que os das deshidratadas, pero xeralmente son o suficientemente elevados como para permitir o seu uso en nutrición animal, xa que en xeral son empregados a concentracións de menos do 1%.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.2.8. Niveis máximos de inclusión na dieta (expresados en %) das macroalgas deshidratdas e extractos das especies de macroalgas estudadas en múltiples especies gandeiras.**

| Especies gandeiras | | Porcino | Polos de engorde | Pitas poñedoras | Ruminantes | Vacún de leite | Coellos | Peixes |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentración basal de I en dieta estándar (mg/kg) | | 0,177 | 0,103 | 0,073 | 0,491 | 0,538 | 0,252 | 1,61 |
| Límites máximos I (mg/kg) [1] | | 10 | 10 | 5 | 10 | 5 | 10 | 20 |
| *F. vesiculosus* | Deshidr. | 2,48 | 2,50 | 1,25 | 2,41 | 1,13 | 2,47 | 4,67 |
| | Extracto | 1,43 | 1,44 | 0,72 | 1,39 | 0,65 | 1,42 | 2,69 |
| *H. elongata* | Deshidr. | 7,32 | 7,37 | 3,67 | 7,10 | 3,33 | 7,27 | 13,9 |
| | Extracto | 5,35 | 5,39 | 2,68 | 5,19 | 2,44 | 5,31 | 10,1 |
| *U. pinnatifida* | Deshidr. | 3,46 | 3,48 | 1,73 | 3,35 | 1,57 | 3,43 | 6,51 |
| | Extracto | 2,65 | 2,67 | 1,33 | 2,57 | 1,21 | 2,63 | 4,98 |
| *L. ochroleuca* | Deshidr. | 0,35 | 0,36 | 0,18 | 0,34 | 0,16 | 0,35 | 0,66 |
| | Extracto | 0,17 | 0,17 | 0,084 | 0,16 | 0,076 | 0,17 | 0,32 |
| *S. latissima* | Deshidr. | 0,24 | 0,24 | 0,12 | 0,23 | 0,11 | 0,24 | 0,45 |
| | Extracto | 0,39 | 0,39 | 0,19 | 0,37 | 0,18 | 0,38 | 0,72 |
| *Ulva* spp.[2] | Deshidr. | 10,6 | 10,7 | 5,31 | 10,3 | 4,84 | 10,5 | 20,2 |
| | Extracto | 10,6 | 10,7 | 5,33 | 10,3 | 4,85 | 10,6 | 20,2 |
| *M. stellatus*[2] | Deshidr. | 4,83 | 4,87 | 2,42 | 4,68 | 2,19 | 4,80 | 9,11 |
| | Extracto | 1,62 | 1,63 | 0,81 | 1,57 | 0,74 | 1,61 | 3,04 |

[1] Regulamento CE 1459/2005. [2] Para *Ulva* spp. e *M. stellatus* deben empregarse os niveis máximos de inclusión recomendados segundo o contido en S.

Aparte do iodo, as macroalgas presentaron concentracións da maioría dos elementos traza esenciais unha orde de magnitude por debaixo dos límites establecidos pola lexislación (Táboa 4.2.9) para as diferentes especies gandeiras. Porén, algunhas macroalgas superaron estes límites, no caso do Fe (450-750 mg/kg, *F. vesiculosus* e *M. stellatus* deshidratadas), Mn (100-150 mg/kg, *F. vesiculosus* deshidratada) e Co (1 mg/kg, *F. vesiculosus* deshidratada, e extracto de *H. elongata*). Aínda así, para todos estes produtos de macroalgas, o contido en iodo restrinxiu en maior medida a cantidade de macroalgas que se podería incluír, polo que os límites de inclusión dos demais elementos traza esenciais (> 20 %; datos non mostrados) sempre se cumprirían coas cantidades máis baixas limitadas polo iodo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.2.9. Nivel máximo permitido no penso completo (mg/kg de penso completo, humidade: 12%) para oligoelementos esenciais [1] .**

| Nivel máximo | Porcino | Avicultura | Bovino | Ovino | Caprino | Coellos | Peixes |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Co | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Cu | 25 (100-150) [2] | 25 | 30 (15) [3] | 15 | 35 | 25 | 25 |
| Fe | 750 | 450 | 450 | 500 | 750 | 750 | 750 |
| Mn | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 100 |
| Se | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Zn | 150 | 120 | 120 | 120 | 120 | 150 | 150 |

[1] Regulamento CE 1334/2003 e UE 1039/2018. [2] En porcos adultos: 25 mg/kg; en leitóns lactantes e destetados ata 8 semanas despois do destete: 150 mg/kg; entre 5-8 semanas despois do destete: 100 mg/kg. [3] Especies bovinas antes do inicio da ruminación: 15 mg/kg; outros bovinos: 30 mg/kg.

Ao considerar as concentracións de elementos potencialmente tóxicos nas macroalgas avaliadas no noso estudo, o Cd, Pb e Hg atopáronse en todos os casos por debaixo dos niveis máximos permitidos para as materias primas (1, 5 e 0,1 mg/kg de penso cun contido de humidade do 12%; Directiva CE 32/2002 e Regulamento CE 1275/2013) (Táboa 4.2.10). Pola contra, as concentracións totais de As foron superiores á concentración máxima permitida para a fariña de algas e as materias primas derivadas de macroalgas mariñas (40 mg/kg en relación a un penso cun contido de humidade do 12%, equivalente a 45,5 mg/kg MS) en todas as macroalgas pardas, aínda que o contido de iAs foi en todos os casos menor de 2 mg/kg de penso. En calquera caso, os niveis máximos de inclusión destas macroalgas en pensos completos calculados polo As (concentración máxima de As total: 10 mg/kg de penso) foron en todos os casos superiores (>12%) aos estimados para I.

**Táboa 4.2.10. Niveis máximos permitidos no penso completo (mg/kg de penso completo, humidade: 12%) para oligoelementos potencialmente tóxicos [1] .**

| Mineral | Cd | Hg | Pb | As |
|---|---|---|---|---|
| Materias primas derivadas de macroalgas | 1 | 0,1 | 10 | 40 [2] |
| Penso completo | 0,5 | 0,1 | 5 | 10 |

[1] Directiva CE 32/2002 e Regulamento CE 1275/2013. [2] Baixo solicitude das autoridades competentes, o responsable deberá realizar unha análise para demostrar que o contido de arsénico inorgánico é inferior a 2 mg/kg. Esta análise é de especial importancia para a especie *Hizikia fusiforme* .

En canto aos macrominerais, ao non contar con límites legais establecidos na UE para a súa inclusión en nutrición animal, empregáronse os niveis máximos tolerables (Táboa 4.2.11) establecidos polo "National Research Council" [103] para estimar os niveis máximos de macroalgas recomendados nas dietas animais. Os animais de produción toleran en xeral concentracións de macrominerais na dieta superiores ás observadas neste estudo. Só se detectaron dúas excepcións, o caso de Mg para *Ulva* spp., e o de S para *Ulva* spp. e *M. stellatus*. O magnesio foi maioritariamente limitante no caso das dietas porcinas, e o S foi máis limitante nos ruminantes, debido ás interaccións con outros elementos, como o Cu e o Mo, a nivel ruminal [224]. Polo tanto, nestas especies os niveis de ambas macroalgas deberían ser axustados adecuadamente. Destes dous

minerais, o S foi o máis limitante para ambas especies de macroalgas, xa que reduciu moito a cantidade que se debería incluír nas dietas animais: un 1,67% para *Ulva* spp. deshidratada e un 1% para o seu extracto; e un 1,5% para *M. stellatus* deshidratada e 1,84% para o seu extracto (tendo en conta a cantidade de S xa aportada na dieta dos ruminantes). Estas taxas de inclusión serían similares noutras especies gandeiras, para as que o máximo recomendado de S é lixeiramente superior (4 g/kg en porcino e avicultura). Ao igual que nos outros casos, aínda que estes límites de inclusión son baixos, permitirían a adición destas macroalgas na concentración habitual empregada na nutrición animal (1-2%).

**Táboa 4.2.11. Niveis máximos tolerables (% en penso completo) para macrominerais en diferentes especies gandeiras (NRC, 2005).**

| Nivel máximo (%) | Porcino | Polos de engorde | Pitas poñedoras | Ruminantes | Coellos | Peixes |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ca | 1 | 1,5 | 5 | 1,5 | 2 | 0,9 |
| Mg | 0,3 | 0,5 | 0,75 | 0,6 | - | - |
| P | 1,5 | 1 | 0,8 | 1 | 1 | - |
| K | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Na | 0,1 | 0,15 | - | 3 | - | - |
| S | 0,4 | 0,4 | - | 0,3 | - | - |

É importante ter en conta que todos estes niveis de inclusión foron calculados a partir dos valores obtidos para as macroalgas estudadas, que, como xa foi comentado, varían moito en función de numerosos factores. Polo tanto, estes valores só aportan unha idea do rango de inclusión dalgunhas especies e destacan a importancia de analizar as concentracións de minerais das macroalgas antes de incluílas nas dietas dos animais.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 4.3. CAPÍTULO III: INCLUSIÓN DE TRES PRODUTOS DE MACROALGAS NAS DIETAS DOS COELLOS: EFECTOS SOBRE OS RENDEMENTOS PRODUTIVOS E A SAÚDE INTESTINAL

### RESULTADOS

### 4.3.1. Rendementos produtivos

Os coellos alimentados coas dietas de macroalgas mostraron un crecemento similar ao do grupo control, e non se observaron diferenzas significativas cando se compararon as variables entre os grupos (Táboa 4.3.1). Non obstante, o contraste entre o grupo control e a media dos tratamentos con macroalgas deu lugar a algunhas diferenzas. Entre os 33-54 días de idade, o IC medio dos coellos alimentados con todas as dietas de macroalgas tendeu a mellorar en comparación co grupo control (2,62 *vs* 2,49, $p = 0,065$). Entre os 54-61 días de idade, a GMD reduciuse na media dos tres grupos experimentais en comparación co control (47,3 *vs* 44,2, $p = 0,038$). Non obstante, o peso final aos 61 días de idade foi moi similar entre os grupos. Non se observaron diferenzas significativas en canto á mortalidade entre os grupos.

**Táboa 4.3.1. Rendementos produtivos e mortalidade dos distintos grupos experimentais.**

| | Control | SL | U | EU | EEM | *p*-cov | *p*-trat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **33-54 días de idade** | | | | | | | |
| Peso medio 33 d (g) | 925 | 900 | 909 | 886 | 15,7 | --- | 0,37 |
| GMD (g) | 37,1 | 38,6 | 38,4 | 37,7 | 0,98 | 0,27 | 0,69 |
| CMDA (g) | 96,9 | 95,9 | 94,6 | 95,6 | 1,92 | 0,29 | 0,87 |
| IC (g/g) | 2,62 | 2,48 | 2,46 | 2,55 | 0,056 | 0,89 | 0,17 |
| Mortalidade (%) | 9,24 | 7,07 | 7,07 | 7,61 | --- | --- | 0,85 |
| **54-61 días de idade** | | | | | | | |
| Peso medio 54 d (g) | 1684 | 1715 | 1712 | 1696 | 20,4 | <0,001 | 0,69 |
| GMD (g) | 47,3 | 42,9 | 44,4 | 45,2 | 1,27 | 0,27 | 0,10 |
| Mortalidade (%) | 1,60 | 1,09 | 1,09 | 0,54 | --- | --- | 0,81 |
| **33-61 días de idade** | | | | | | | |
| Peso medio 61 d (g) | 2015 | 2015 | 2023 | 2013 | 20,8 | <0,001 | 0,99 |
| GMD (g) | 39,7 | 39,6 | 39,9 | 39,6 | 0,74 | 0,12 | 0,99 |
| Mortalidade (%) | 10,9 | 8,20 | 8,20 | 8,20 | --- | --- | 0,74 |

n=24 por tratamento; agáso IC: n=12. SL: *S. latissima* deshidratada, U: *Ulva* spp deshidratada, EU: extracto de *Ulva* spp. GMD: ganancia media diaria; CMDA: consumo medio diario de alimento; IC: índice de conversión. EEM: erro estándar da media. Cov: peso medio inicial covariable da camada.

### 4.3.2. Efectos das macroalgas sobre os parámetros de saúde intestinal

4.3.2.1. Poboacións das especies bacterianas seleccionadas

Todos os grupos mostraron crecemento *de E. coli* (Táboa 4.3.2), aínda que foi moi variable entre animais. Nalgúns deles non se detectou crecemento, mentres que outros mostraron un crecemento disparado desta bacteria. As cepas enteropatóxenas de

*E. coli* só foron confirmadas nalgúns animais, mentres que ningunha das dúas especies de *Clostridium* estudadas foi detectada en ningún dos grupos. Non se observaron diferenzas significativas entre os grupos experimentais para estas variables.

**Táboa 4.3.2. Efecto dos tratamentos con macroalgas sobre as poboacións microbianas no colon (recontos e porcentaxe de animais en cada grupo no que se detectou cada variable) dos coellos aos 47 días de idade.**

| Variable | Control | SL | U | EU | valor *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* (ufc/g) | 50 x $10^6$ | 25 x $10^6$ | 37 x $10^6$ | 50 x $10^6$ | 0,75 |
| **Coellos, %** | | | | | |
| Crecemento de *E. coli* (%) | 50 | 37,5 | 62,5 | 75 | 0,48 |
| *E. coli* > 100 ufc/g (%) | 50 | 25 | 50 | 62,5 | 0,59 |
| *E. coli* enteropatóxena | 0 | 25 | 0 | 25 | - |
| *E. coli* multirresistente (%) | 37,5 | 12,5 | 37,5 | 37,5 | 0,45 |
| *Clostridium perfringens* (%) | nd | nd | nd | nd | - |
| *Clostridium difficile* (%) | nd | nd | nd | nd | - |

N=8. SL: *S. latissima* deshidratada, U: *Ulva* spp deshidratada, EU: extracto de *Ulva* spp. Nd: non detectado.

4.3.2.2. Reconto de coccidios

A maioría dos coellos presentaron infeccións mixtas con especies de *Eimeria* spp, acadando nalgúns casos recontos moi elevados. Non se observaron diferenzas significativas entre as dietas experimentais, aínda que os animais alimentados coa dieta EU tenderon a mostrar valores máis altos que o grupo alimentado coa dieta SL (Táboa 4.3.3, $p = 0,10$). O grupo SL mostrou os recontos de coccidios máis baixos en case todos os animais, mentres que o grupo EU mostrou os valores máis altos, xa que moitos animais alcanzaron recontos de máis de 20000 opg .

**Táboa 4.3.3. Reconto de coccidios en feces nos grupos experimentais (coccidios/gr feces) dos coellos aos 47 días de idade.**

| Variable | Control | SL | U | EU | valor *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| Reconto de coccidios | 6756 | 3211 | 9100 | 20088 | 0,10 |

N=8. SL: *S. latissima deshidratada*, U: *Ulva* spp deshidratada, EU: extracto de *Ulva* spp.

4.3.2.3. Estudo histolóxico e morfométrico

Xunto cos coccidios observados nas feces, a nivel histolóxico *Eimeria* spp observouse nalgúns animais en diferentes lugares, principalmente concentrados na metade distal do intestino delgado (xexuno, íleo) e no cego. Atopáronse diferentes etapas do ciclo vital da especie (esquizontes, gametocitos e ooquistes) invadindo os enterocitos (Figura 4.3.1). Nas zonas afectadas por coccidios observouse unha maior destrución dos enterocitos e unha atrofia das vilosidades, así como un número variable de leucocitos (predominantemente heterófilos) infiltrando a lámina propia. As seccións afectadas por coccidios pareceron ser máis susceptibles á proliferación bacteriana e á invasión da mucosa danada, xa que a zona apical das vilosidades presentou erosión e bacterias adheridas á súa superficie (lesión "effacing-attaching"), ou incluso penetrando no borde de cepillo dos enterocitos e atopándose no citoplasma.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

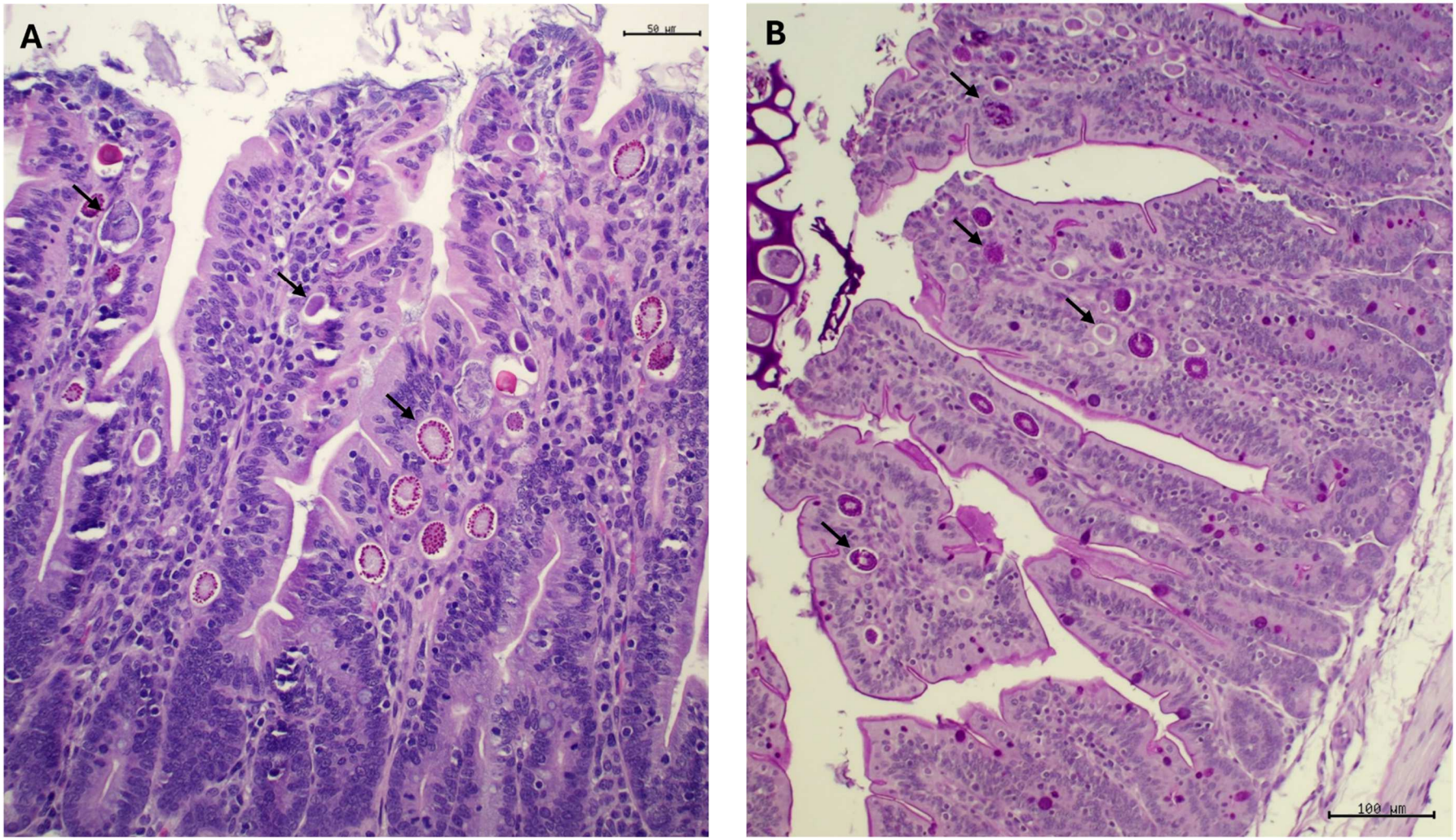



**Figura 4.3.1. Seccións de mucosa ileal dos coellos aos 47 días de idade, tinguidas con hematoxilina-eosina (A) e ácido periódico-Schiff, PAS (B). R. O epitelio das vilosidades mostra un aspecto festonado. O bordo apical está erosionado e no lumen hai restos de alimentos parcialmente dixeridos. O epitelio de revestimento mostra múltiples estadios de desenvolvemento dos coccidios (frechas), que están intensamente marcados coa tinción de PAS (B, frechas). Escala: 50 µm (A) e 100 µm (B).**

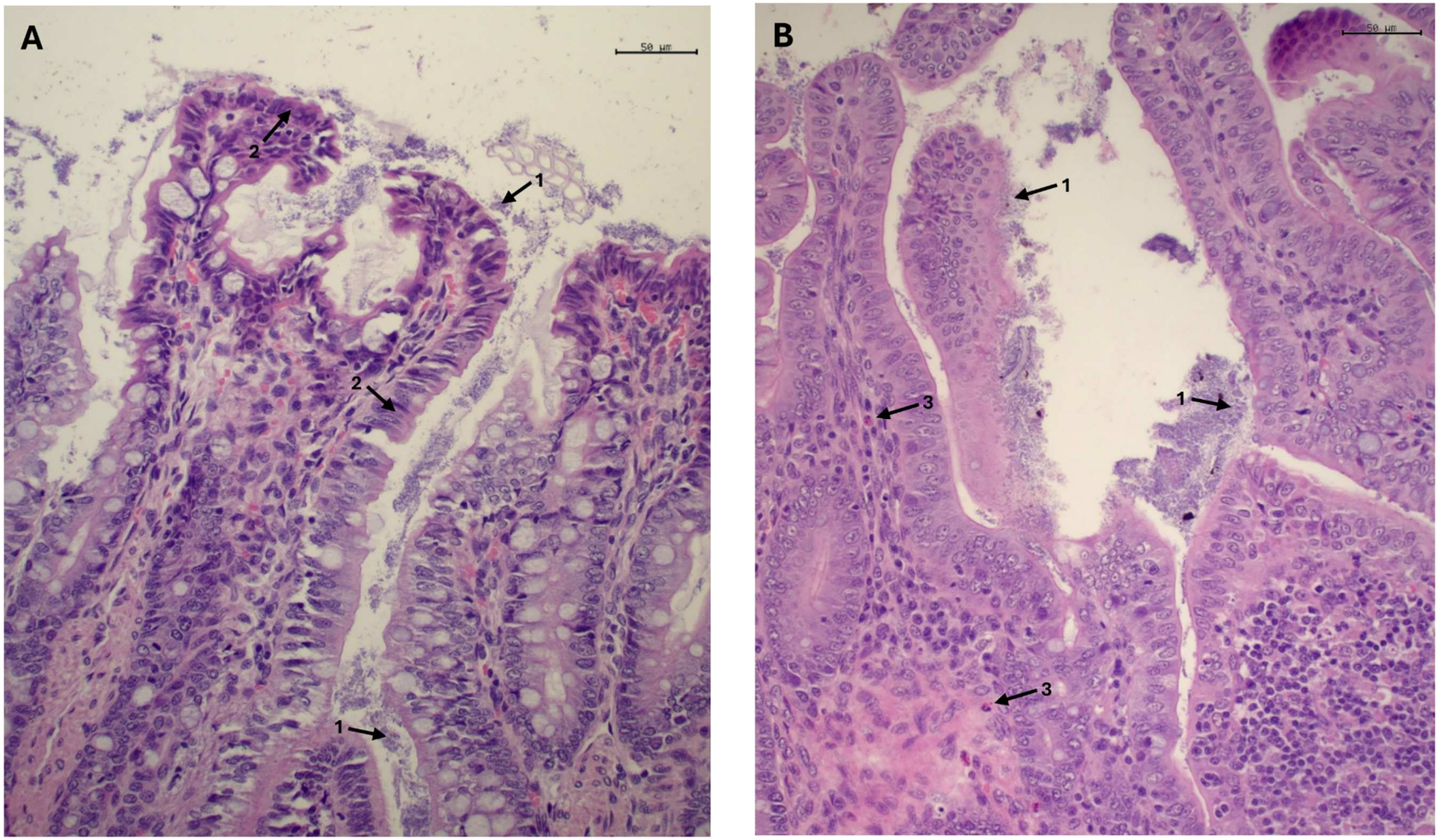



**Figura 4.3.2. Mucosa da válvula ileocecal dos coellos aos 47 días de idade. Obsérvanse numerosos cocobacilos adheridos á superficie epitelial dos enterocitos, tanto na zona apical das vilosidades como en rexións máis profundas (frecha 1). Nalgunhas zonas, as células epiteliais permanecen intactas; mais noutras os enterocitos presentan un aspecto cuboidal, inchado ou deformado (frecha 2), dando lugar a un aspecto ondulado do bordo epitelial. Nestas rexións, a lámina propia presenta unha poboación mixta de heterófilos, linfocitos e células plasmáticas (frecha 3). Escala: 50 µm.**

Moitos animais presentaron a lesión "effacing-attaching" asociada á proliferación bacteriana (Figura 4.3.2), principalmente no xexuno, íleo, cego e colon. Unha gran cantidade de bacterias apareceron enfrontadas ou adheridas aos enterocitos e nalgúns casos colonizaron o epitelio superficial. En moitos casos, as bacterias invadiron os enterocitos e colonizaron lugares máis profundos da mucosa, provocando unha importante perda da integridade das vilosidades. Nas zonas afectadas, a arquitectura da mucosa apareceu notablemente alterada, cunha importante destrución dos enterocitos e unha erosión do borde en cepillo. A lámina propia apareceu infiltrada con leucocitos, predominantemente heterófilos e linfocitos. Tamén se observou unha hipertrofia das células caliciformes nalgunhas áreas.

En canto ás medidas morfométricas da mucosa do xexuno, observáronse diferenzas significativas entre os grupos experimentais (Táboa 4.3.4) . Os animais alimentados coa dieta SL mostraron unha maior altura das vilosidades ($p < 0,001$) e unha maior profundidade das criptas ($p < 0,001$) en comparación coas outras dietas experimentais, e o grupo control mostrou un valor intermedio entre os grupos SL e EU. O grupo alimentado coa dieta EU mostrou a menor altura das vilosidades e a menor profundidade das criptas. Os tratamentos non influíron no ratio VH:CD ($p = 0,55$).

**Táboa 4.3.4. Altura das vilosidades e profundidade das criptas (µm) da mucosa do xexuno, e concentración de mucina bruta ileal en coellos aos 47 días de idade. As letras diferentes indican diferenzas estatisticamente significativas.**

| Variable | Control | SL | U | EU | EEM | valor *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Altura das vilosidades | 335 $^{ac}$ | 391 $^{c}$ | 280 $^{b}$ | 195 $^{a}$ | 9,19 | <0,001 |
| Profundidade da cripta | 119 $^{a}$ | 141 $^{b}$ | 106 $^{a}$ | 102 $^{a}$ | 2,19 | <0,001 |
| VH:CD | 2,82 | 2,77 | 2,64 | 1,91 | 0,053 | 0,55 |
| Mucina bruta (%) | 8,14 | 9,43 | 8,78 | 7,77 | 0,489 | 0,67 |

n=8. SL: *S. latissima deshidratada*, U: *Ulva* spp deshidratada, EU: extracto de *Ulva* spp. VH:CD: ratio entre altura das vilosidades e profundidade das criptas. EEM: erro estándar da media.

4.3.2.4. Contido de mucina bruta no íleo

Non se observaron diferenzas ($p = 0,67$) entre os grupos experimentais en canto á concentración de mucina bruta no íleo (Táboa 4.3.4).

4.3.2.5. Microbioma

A microbiota colónica estivo dominada por Firmicutes (60%) e Bacteroidetes (25%). Os resultados obtidos da análise da secuenciación de amplicóns de ARN 16S mostraron diferenzas significativas para as Cianobacterias ($p = 0,04$) e as TM7 (*Saccharibacteria*) ($p = 0,007$) a nivel de filo (Figura 4.3.3: A, B). Para ambos filos, a abundancia relativa diminuíu co tratamento con macroalgas en comparación co control. As cianobacterias mostraron os niveis máis baixos para *Ulva* spp, mentres que no caso das TM7 os niveis máis baixos atopáronse nos coellos tratados con *S. latissima*. A nivel de familia, atopáronse diferenzas significativas (Figura 4.3.3: C, D, E) para as familias p_Cianobacterias;c_4C0d-2;o_YS2;f_ ($p = 0,04$), p_TM7;c_TM7-3;o__CW040; f__F16 ($p = 0,007$) e p_Bacteroidetes; c_Flavobacteria; o_Flavobacteriales; f_ Cryomorphaceae ($p = 0,040$). Dentro desta última familia tamén se atoparon diferenzas significativas ($p =$

0,008) a nivel de xénero para *Fluviicula* (Figura 4.3.3: F), o cal aumentou na microbiota dos coellos dos grupos U e EU en comparación co control.

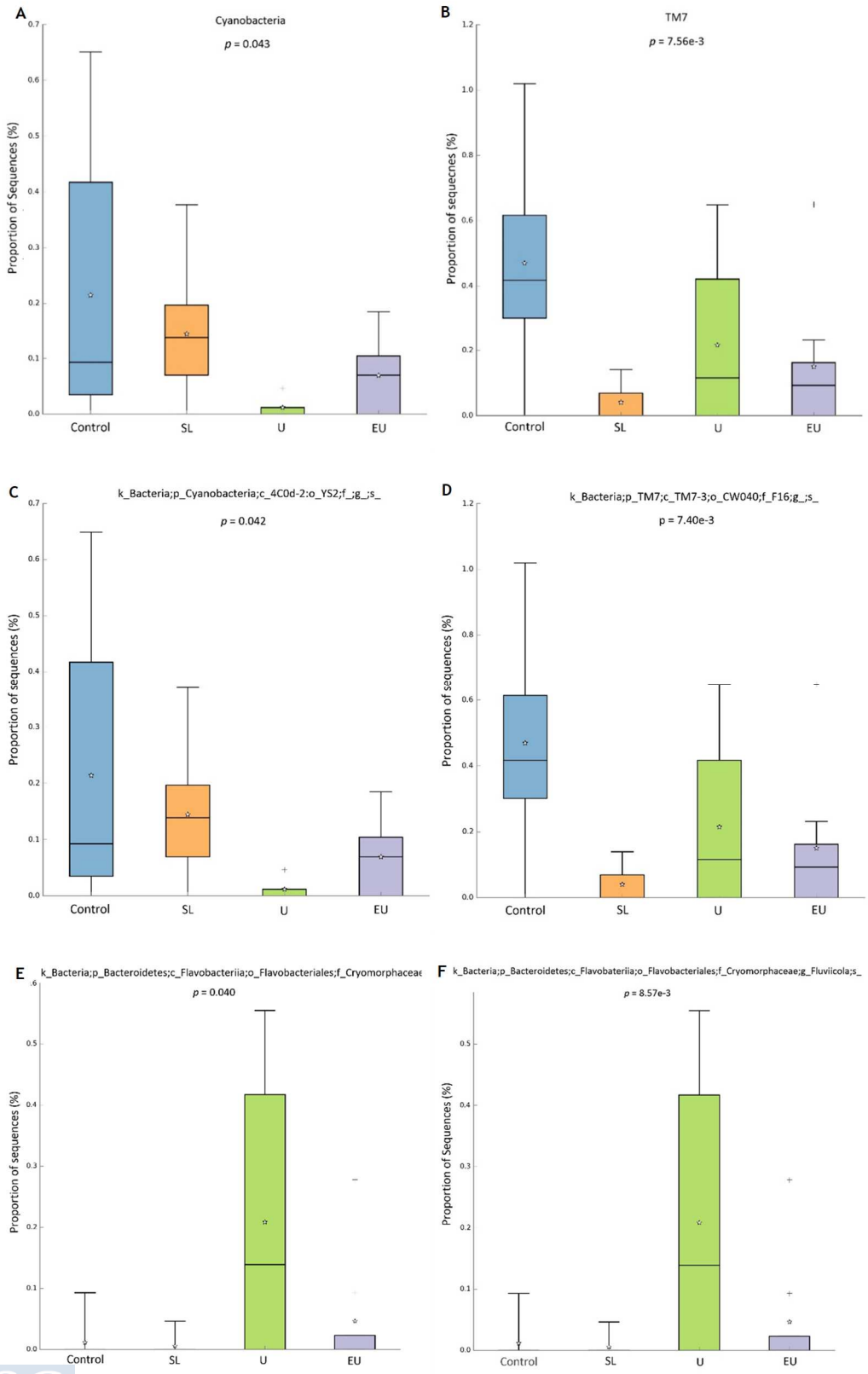



**Figura 4.3.3: Diferenzas significativas observadas na microbiota colónica entre grupos experimentais dos coellos aos 47 días de idade. A: Filo Cianobacteria; B: Filo TM7; C: Familia YS2; D: Familia TM7-F16; E: Familia Cryomorphaceae; F: Xénero *Fluviicula*. SL: *S. latissima* deshidratada; U: *Ulva* spp deshidratada; EU: extracto de *Ulva* spp.**

4.3.2.6. Expresión de xenes de inmunidade e das proteínas de unión estreita dos enterocitos, a nivel do apéndice cecal

En canto ás interleuquinas (IL-6 e IL-10) e o TNF-α, non se observaron diferenzas significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Figura 4.3.4*)*.

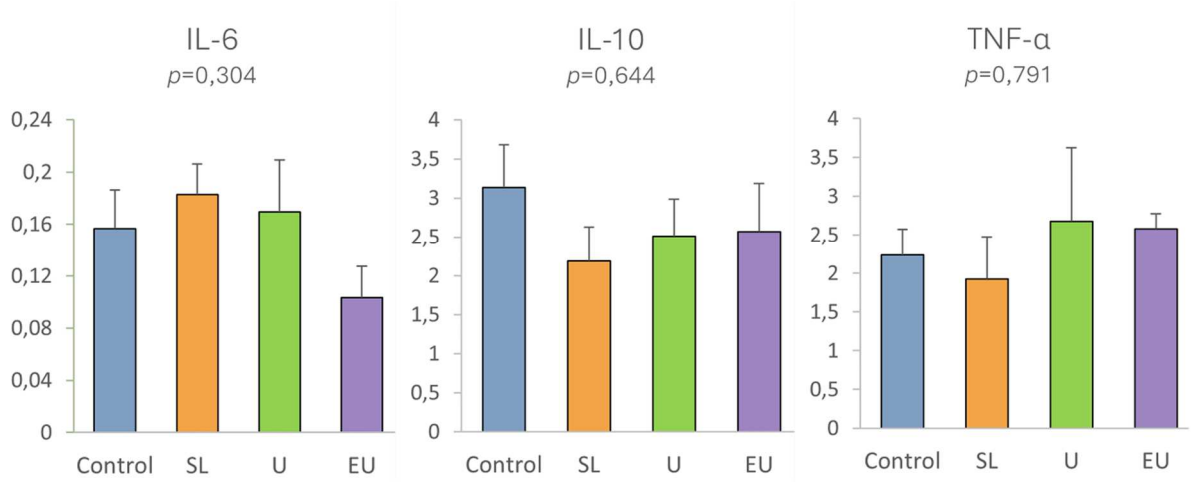



**Figura 4.3.4. Expresión xénica das interleuquinas (IL-6, IL-10) e o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) nas dietas experimentais, na mucosa do apéndice cecal dos coellos aos 47 días de idade. SL: *S. latissima* deshidratada ; U: *Ulva* spp deshidratada; EU: extracto de *Ulva* spp.**

No caso das proteínas de unión estreita dos enterocitos (Figura 4.3.5), só se observaron diferenzas no caso das claudinas-1 ($p < 0,001$), mostrando o grupo SL a expresión máis baixa e o grupo U a máis alta. Aínda que non resultou significativo, a zonula occludens ($p = 0,11$) tendeu a mostrar unha maior expresión do xen en todos os grupos alimentados con macroalgas que no grupo control, especialmente no caso de U e EU.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

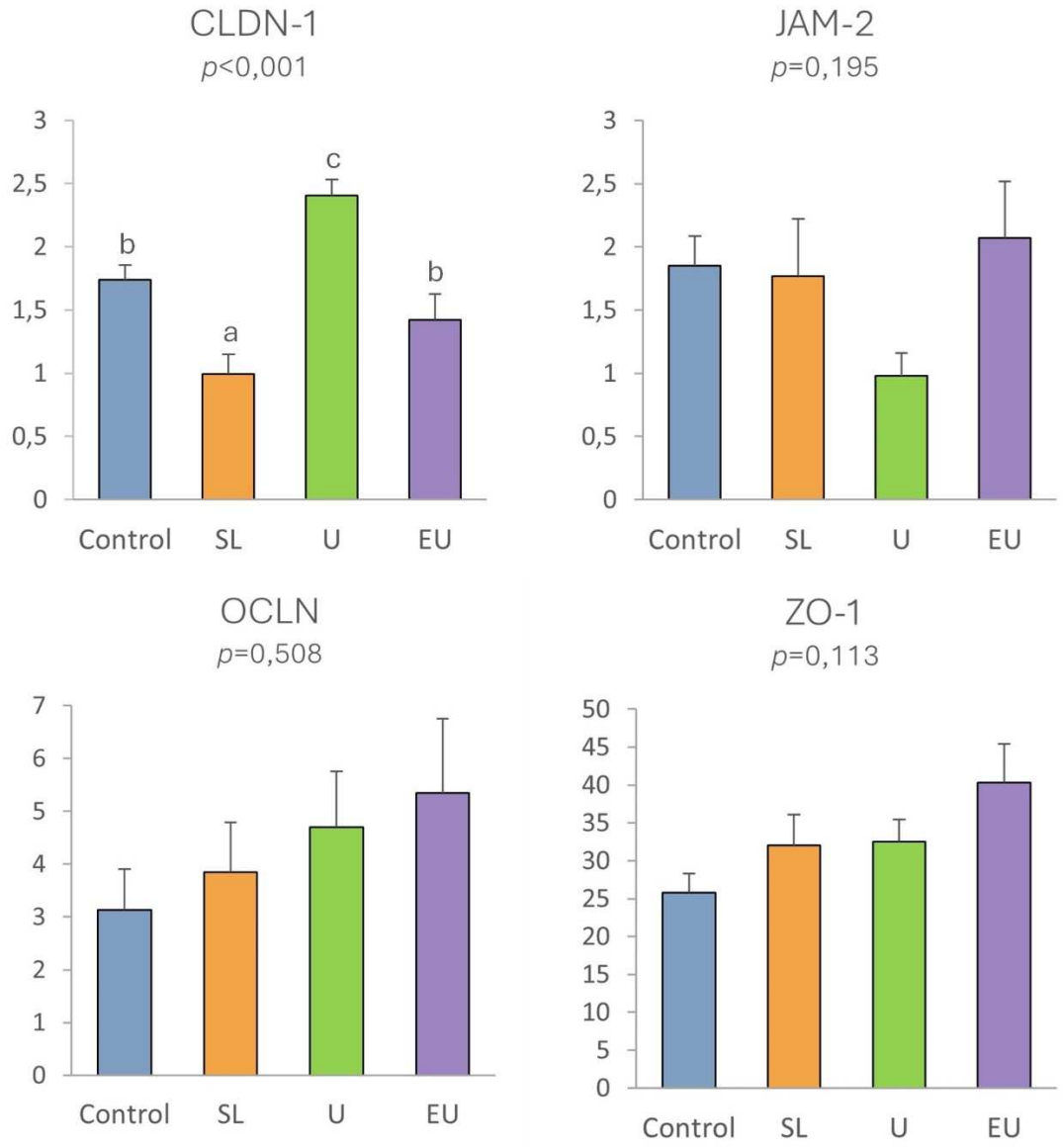



**Figura 4.3.5. Expresión xénica das proteínas de unión estreita na mucosa do apéndice cecal, nas diferentes dietas experimentais. SL: *S. latissima* deshidratada; U: *Ulva* spp deshidratada; EU: extracto de *Ulva* spp.**

## DISCUSIÓN

Os nosos resultados indican que a inclusión de *Saccharina latissima* (deshidratada) e *Ulva* spp. (deshidratada ou como extracto) nas dietas dos coellos foi ben aceptada polos animais. En consecuencia, os coellos chegaron ao final do ciclo de produción con pesos finais comparables aos do grupo control, e mesmo experimentaron taxas de mortalidade numericamente inferiores a este. Ademais, o índice de conversión foi lixeiramente mellorado, o que suxire un mellor aproveitamento do alimento. Estes resultados poderían estar relacionados coa mellora da dixestibilidade, tal e como se observou cando estas mesmas macroalgas foron incluídas ao 1,025% nas dietas dos coellos, nas probas en granxa experimental [144]. Tamén se observaron resultados similares cando os coellos se alimentaron cunha dieta suplementada con 0,3% de

*Laminaria* spp e unha mestura de polifenoles derivados de plantas [84], xa que esta dieta mellorou tanto a GMD como o IC, pois os coellos reduciron a súa inxesta pero alcanzaron un maior peso final. A adición dun 1% de *Ulva* spp. á dieta dos coellos mellorou tamén a GMD e o IC [80]. En leitóns na post-desteta, a inclusión de laminarina ao 0,03% na dieta tamén mellorou estes dous mesmos parámetros [168], así como a dixestibilidade da enerxía e da proteína [168,225]. Esta mellora da dixestibilidade podería estar relacionada cunha mellor funcionalidade da mucosa intestinal, como resultado da mellora do transporte de nutrientes [168] e da morfoloxía da mucosa do duodeno [75].

No noso estudo apareceu un brote de enfermidade entérica durante a fase post-desteta dos animais estudados, a cal é unha situación habitual na cría comercial de coellos. A maioría dos animais mostrou infección con *Eimeria* spp., alcanzando algúns deles valores moi elevados de ooquistes por g de feces (>10000 opg, considerado como patolóxico [226]). A inclusión de SL na dieta pareceu reducir a incidencia de *Eimeria* spp. en comparación co grupo control, mentres que os animais alimentados coa dieta EU mostraron recontos de coccidios notablemente máis altos. A presenza de coccidios en coellos na post-desteta pode empregarse como un marcador do seu estado sanitario e inmune. Nos casos de coccidiose aguda, este parasito pode actuar como un patóxeno primario causando enfermidade clínica, especialmente na fase da post-desteta, xa que é un período crítico no que os coellos son máis sensibles a trastornos dixestivos [10,11]. Sen embargo, en moitos casos os coccidios producen infeccións subclínicas, que están relacionadas cunha redución dos rendementos produtivos e un maior risco de infección con outros patóxenos. Nestes casos, os coccidios conducen a unha disbiose no intestino, o que pode debilitar aos coellos en períodos de estrés como a desteta. Este desequilibrio está acompañado a miúdo por patóxenos oportunistas que poden producir procesos concomitantes de maior gravidade, como a colibacilose ou a infección por clostridios. Ao mesmo tempo, cando aparecen estes procesos bacterianos, os coccidios tamén se extenden e complican aínda máis todo o proceso [227,228]. Neste caso, os coellos pareceron sufrir unha infección concomitante de coccidios e *E. coli*, aínda que non se pode descartar a participación doutros patóxenos. Ambos procesos alteraron a arquitectura da mucosa e a súa protección contra outros patóxenos, o que podería ter derivado nunha disbiose e infección multifactorial, máis difícil de controlar e diagnosticar. Neste sentido, os coellos presentaron niveis anormais de *E. coli*, xa que moitos deles mostraron ou ben un crecemento excesivo que superaba os niveis normais ou ben unha ausencia total de crecemento. Estes resultados poderían ser explicados polo feito de que os coellos foron tratados con antibióticos, o que podería conducir a unha redución drástica destas bacterias ou a unha disbiose. En calquera caso, numerosos coellos de todos os grupos mostraron recontos altos que indican a existencia dunha patoloxía dixestiva e disbiose, a cal pode estar polo menos parcialmente relacionada coa proliferación de *E. coli*. As lesións do tipo "effacing-attaching" observadas no estudo histolóxico tamén serían compatibles co sobrecrecemento desta bacteria. Pola contra, as especies de *Clostridium* estudadas non foron atopadas nas mostras de colon, polo que estas especies en concreto non pareceron estar implicadas na enfermidade entérica observada neste ensaio. Sen embargo, debe terse en conta que os coellos poden verse afectados por outras especies de *Clostridium* (como *C. spiroforme*), e que o

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

illamento desta bacteria non sempre é posible, incluso en coellos con síntomas clínicos compatibles con *Clostridium* [18]. En conxunto, estes resultados non permiten unha comparación axeitada entre os grupos experimentais, en relación con estes indicadores de saúde intestinal. En estudos previos en leitóns suplementados con laminarina, observouse unha redución nas poboacións colónicas de *E. coli* [72,74,225,229]. Sen embargo, as macroalgas estudadas neste ensaio non mostraron ningunha inhibición directa do crecemento de *E. coli*, cando se probaron *in vitro* (Capítulo I), e polo tanto a redución das poboacións deste patóxeno podería estar relacionada coa proliferación de bacterias beneficiosas, debido ao potencial efecto prebiótico das macroalgas [230].

Os coellos alimentados coa dieta SL mostraron melloras nos índices morfométricos de saúde intestinal en comparación co grupo control. Concretamente, mostraron aumentos estatisticamente significativos da profundidade das criptas, así como unha altura numericamente maior das vilosidades, a nivel de xexuno. Pola contra, este efecto positivo non se observou nos animais suplementados con U ou EU, os cales mostraron medidas numericamente inferiores en comparación co control, especialmente evidente no caso da altura das vilosidades do grupo EU. Os resultados obtidos coa suplementación con SL foron similares aos observados en leitóns na post-desteta alimentados con laminarina e/ou fucoidano, xa que estes presentaron unha maior altura das vilosidades e de produción de AGV [225]; e o mesmo ocorreu nesta especie cando foi suplementada coa alga parda *Ecklonia cava*, a cal aumentou a altura das vilosidades no íleo dos leitóns [229]. Ademais, as probas realizadas previamente nas granxas experimentais proporcionaron resultados complementarios aos obtidos neste ensaio. *S. latissima* presentou unha elevada fermentación *in vitro* por parte da microbiota cecal (Capítulo I), e tamén mellorou a dixestibilidade da materia seca e da proteína bruta *in vivo* [144], o que podería estar relacionado cun mellor estado e morfoloxía da mucosa intestinal. En conxunto, todos estes resultados parecen indicar que a adición de *S. latissima* á dieta dos coellos podería estimular a microbiota saprófita e aumentar a súa produción de AGV, o que melloraría o estado da mucosa intestinal e a protexería fronte a algúns patóxenos como os coccidios [59]. Estes resultados concordan con achados previos e suxiren que certos polisacáridos contidos en *S. latissima* -como a laminarina e o fucoidano- producirían un efecto positivo sobre a saúde intestinal actuando potencialmente como prebióticos, como xa foi sinalado por numerosos autores [59,72,230].

O microbioma intestinal xoga un papel fundamental na mantemento da saúde intestinal, e aínda que o seu estudo aínda se atopa no seu inicio, a súa modulación a través da dieta proponse como un aspecto crucial para reducir a incidencia de trastornos dixestivos nas granxas [231]. A información dispoñible sobre o microbioma intestinal dos coellos é bastante limitada; sen embargo, os nosos resultados mostraron a composición característica descrita en estudos previos doutros autores [232,233]. Ao analizar o impacto da suplementación coas macroalgas estudadas sobre a microbiota do colon, atopáronse certas diferenzas en comparación co grupo control, especialmente en relación coas poboacións de TM7 e das cianobacterias. O TM7 é un subgrupo de bacterias Gram positivas incultivables asociadas á inflamación oral [234]. Esta división bacteriana foi descrita orixinalmente en ambientes naturais [234–237], aínda que

tamén foi atopada nalgúns animais, como en feces de ratos. En humanos, as TM7 foron detectadas na placa subxenxival e foron asociadas con enfermidades inflamatorias das mucosas [234,236,237]. Tamén se suxeriu que esta división bacteriana podería xogar un papel importante nas etapas iniciais dos procesos inflamatorios nas mucosas, probablemente debido á modificación das condicións de crecemento para as bacterias competidoras [238]. A inclusión de macroalgas nas dietas dos coellos podería, polo tanto, reducir a aparición de procesos inflamatorios a nivel intestinal, xa que a expresión deste filo diminuíu en todos os grupos alimentados con macroalgas en comparación co control, especialmente no caso de SL e EU. Por outro lado, as cianobacterias intestinais aínda se atopan escasamente estudadas [239]. Os estudos realizados ata o momento en canto á presenza de cianobacterias na microbiota intestinal mostran diferenzas significativas na súa abundancia entre grupos control (animais sans) e os grupos enfermos, o que indica que estes organismos poderían estar relacionados co neurodesenvolvemento, a neurodexeneración, a obesidade e certas enfermidades gastrointestinais, respiratorias e oculares en humanos [240–242]. Así mesmo, a bibliografía existente mostra unha asociación entre estes microorganismos e certas enfermidades, aínda que estas evidencias son só correlativas. Por tanto, aínda non está claro se as cianobacterias intestinais poderían participar no desenvolvemento de certas enfermidades ou se os cambios na súa abundancia son resultado da propia enfermidade. É necesario, por tanto, realizar máis estudos para identificar, cultivar e caracterizar as especies de cianobacterias intestinais, co fin de entender o papel destes microorganismos na saúde e no desenvolvemento de enfermidades [239]. En canto á familia Cryomorphaceae, non se atoparon referencias na literatura científica para coellos, e en humanos só existe certa información en relación ao xénero *Flavobacterium*, a cal describe que a súa abundancia está asociada a individuos cun peso normal mentres que os individuos con obesidade mostran unha menor poboación destas bacterias [243]. Por tanto, será necesario realizar máis estudos para entender se o aumento desta familia nos coellos alimentados con U e EU pode indicar unha mellora no estado de saúde.

A regulación da resposta inmune, a cal abarca a produción de mucinas, interleucinas e outros mediadores como citoquinas pro e anti-inflamatorias, así como a expresión das proteínas de unión estreita dos enterocitos, emerxe como outro aspecto crítico, xunto co microbioma intestinal, no mantemento da saúde intestinal. Estes factores xogan un papel fundamental no mantemento da integridade da barreira intestinal, na modulación da inflamación e na organización da resposta inmune local, contribuíndo substancialmente ao equilibrio e á homeostase do tracto gastrointestinal. No noso ensaio, a inclusión de macroalgas nas dietas dos coellos non afectou significativamente á produción de mucinas a nivel de íleo, consideradas como un mecanismo de protección contra patóxenos, ao atrapalos e crear unha barreira que dificulta a súa entrada nos enterocitos; e tampouco influíu significativamente na expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e TNF-α) ou anti-inflamatorias (IL-10). Pola contra, observouse un efecto significativo das macroalgas sobre a expresión xénica das proteínas de unión estreita dos enterocitos. Os coellos do grupo U mostraron unha maior expresión das claudinas-1, mentres que os dos grupos U e EU mostraron unha tendencia a aumentar a expresión da *zonula occludens*, en comparación co control. As proteínas de unión estreita xogan

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

un papel crucial na regulación da permeabilidade das unións laterais entre os enterocitos, e por tanto a súa maior expresión indica un selado máis forte e unha menor permeabilidade da mucosa, o que ten como resultado unha barreira mucosa máis fortalecida contra patóxenos e toxinas [60,170,173,244]. En humanos demostrouse que os compoñentes da dieta, así como a presenza de certas cepas comensais e probióticas, poden producir un aumento da expresión das proteínas de unión estreita dos enterocitos e, nalgúns casos, previr ou contrarrestar os efectos adversos de certos patóxenos [244]. No noso estudo, a maior expresión destas proteínas de unión estreita nos coellos alimentados con *Ulva* spp. podería suxerir un potencial mecanismo de acción desta macroalga, aínda que neste ensaio o fortalecemento da barreira intestinal foi insuficiente para manter a saúde intestinal nun contexto de enfermidade, xa que os coellos destes grupos mostraron os peores resultados en relación cos recontos de coccidios e as medidas morfométricas da mucosa xexunal. Ata onde sabemos, este potencial mecanismo de acción de *Ulva* spp. non foi avaliado previamente en coellos, aínda que si se observaron resultados similares en leitóns na fase da post-desteta, tras ser alimentados cun 0,1-0,5% dun extracto derivado doutra macroalga verde- *Blidingia* spp- ao observarse un aumento da expresión de CLDN-1, OCLN e ZO-1 [245].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 4.4. CAPÍTULO IV: INCLUSIÓN DE CATRO PRODUTOS DE MACROALGAS NAS DIETAS DOS COELLOS: EFECTOS SOBRE A CALIDADE DA CARNE.

### 4.4.1. Composición química e propiedades fisicoquímicas e antioxidantes da carne

A inclusión dos produtos de macroalgas na dieta non afectou ao peso corporal final nin ao rendemento da canal, que foron de media 2162 g e 60,2%, respectivamente (Táboa 4.4.1). Estes datos coinciden coa ausencia de efecto da inclusión de baixos niveis de macroalgas sobre a taxa de crecemento dos coellos observada nun experimento paralelo [246].

**Táboa 4.4.1. Efecto da inclusión de produtos de macroalgas na dieta sobre o rendemento da canal aos 63 días.**

| | Control | DSL | ESL | EHE | EU | EEM | Valor *P* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Peso corporal, g | 2141 | 2257 | 2167 | 2138 | 2109 | 63,1 | 0,531 |
| Peso da carcasa quente, g | 1302 | 1357 | 1307 | 1277 | 1268 | 41,6 | 0,589 |
| Rendemento da canal, % | 60,8 | 60,1 | 60,3 | 59,7 | 60,1 | 0,51 | 0,650 |

DSL: *S. latissima deshidratada*; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva* spp. n=8 por tratamento

Os resultados da composición química e as propiedades fisicoquímicas e antioxidantes da carne preséntanse, para cada tratamento, na Táboa 4.4.2. Os contidos medios de humidade (76,36%), proteínas (21,81%) e cinzas (1,23%) dos cinco tratamentos coincidiron cos valores de referencia indicados [247] para este corte de carne (75% de humidade, 22% de proteínas, 1% de cinzas). En canto ao contido lipídico, os valores obtidos foron moito menores (media 0,53%) aos valores de referencia para o solombo, 1,4% (e 38% de coeficiente de variación; [248]) e 2 ± 1,5% (media ± desviación típica; [247]). Esta diferenza pode ser explicada pola idade de sacrificio, xa que neste estudo os coellos sacrificáronse a unha idade máis nova (63 días) que nos países de orixe da maioría dos datos de referencia (Francia e Italia) (idade arredor dos 70 e 80 días). O contido en graxa do músculo LL aumenta gradualmente desde o destete ata as 20 semanas [249,250], e a principal encima implicada na síntese nova de ácidos graxos (acetil-CoA carboxilasa) permanece baixa ata as 9 semanas de idade [251].

Non se observaron diferenzas significativas entre os grupos experimentais en canto ao contido de humidade, proteínas ou cinzas do músculo LL ($p \geq 0,216$). Pola contra, no que respecta aos lípidos, o contido de graxa no LL foi maior ($p < 0,05$) nos coellos alimentados coa dieta que contiña o extracto de *Ulva* spp. (0,96%) que nos alimentados coas dietas que contiñan os outros produtos de macroalgas e os do grupo control (0,33%). En todos os casos o contido de lípidos estivo por debaixo do límite inferior do intervalo de referencia para este corte de carne. Estas diferenzas non pareceron estar relacionadas co nivel de graxa da dieta. O contido de graxa das dietas experimentais foi relativamente baixo (de media 3,5% MS) e atópase dentro do intervalo (2,5-3,5% MS) no que non se observan cambios ou só moi menores na graxa intramuscular [252]. De feito, os contidos de graxa da dieta e do músculo LL non estiveron correlacionados linealmente (r = -0,25; $p = 0,12$; n = 40). En porcino, as dietas con baixo contido en proteínas (ou lisina) melloraron a acumulación de graxa no músculo sen afectar á graxa subcutánea [253,254]. Isto pode explicar en parte o contido de graxa relativamente alto no grupo

USC DE COMPOSTELA

alimentado coa dieta que contén *Ulva* spp., xa que nun experimento paralelo observouse que esta dieta presentaba a menor razón [proteína/enerxía] dixestible [144], mentres que a inxestión de alimento reduciuse nun 10% en todos os grupos suplementados con macroalgas (resultados sen publicar), o que levou a este grupo á menor inxestión de proteínas dixeribles.

**Táboa 4.4.2. Efecto da inclusión de produtos de macroalgas na dieta sobre a composición química e as propiedades fisicoquímicas e antioxidantes do músculo *longissimus lumborum* do coello.**

| Parámetro | Control | DSL | ESL | EHE | EU | EEM | Valor *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Composición química** | | | | | | | |
| Humidade (%) | 76,6 | 76,5 | 76,3 | 76,4 | 75,9 | 0,099 | 0,216 |
| Lípidos (%) | 0,33$^{a}$ | 0,55$^{ab}$ | 0,44$^{a}$ | 0,36$^{a}$ | 0,96$^{b}$ | 0,059 | 0,002 |
| Proteínas (%) | 21,8 | 21,5 | 21,9 | 22,0 | 21,8 | 0,083 | 0,423 |
| Cinza (%) | 1,22 | 1,23 | 1,20 | 1,23 | 1,27 | 0,014 | 0,653 |
| **Propiedades fisicoquímicas** | | | | | | | |
| *L* * (luminosidade) | 61,3 | 63,0 | 62,4 | 62,9 | 63,5 | 0,305 | 0,168 |
| *a* * (vermello) | -1,80 | -1,51 | -1,86 | -1,93 | -1,61 | 0,108 | 0,742 |
| *b* * (amarelo) | 9,90 | 10,5 | 9,96 | 10,34 | 10,8 | 0,163 | 0,327 |
| pH | 5,72 | 5,71 | 5,67 | 5,73 | 5,74 | 0,052 | 0,751 |
| **Propiedades antioxidantes** | | | | | | | |
| TBARS (mg MDA/kg) | 0,00891 | 0,0162 | 0,0448 | 0,0239 | 0,0295 | 0,006 | 0,370 |
| DPPH (µg trolox/g) | 115 | 118 | 108 | 131 | 108 | 3,17 | 0,132 |

DSL: *S. latissima deshidratada* ; ESL: extracto de *S. latissima* ; EHE: extracto de *H. elongata* ; EU: extracto de *Ulva* spp. n=8 por tratamento. TBARS: grao de oxidación lipídica; DPPH: actividade de eliminación de radicais libres da carne. $^{a\text{-}b}$ :para cada parámetro (fila) as letras diferentes indican que os valores medios foron diferentes ($P$ <0,05; test de Tukey).

En canto ás propiedades fisicoquímicas, nin os parámetros de cor nin o pH diferiron en relación ás dietas experimentais ($p \geq 0{,}168$). En todos os grupos, os parámetros de cor indicaron que a carne foi lixeiramente máis clara (media $L$*=62,64), menos vermella (media $a$*= -1,74) e máis amarelada (media $b$*= 10,31) do que se referenciou anteriormente para o músculo LL dos coellos á mesma idade de sacrificio [255]. A cor vermella está asociada á oxidación da carne [256] e, neste caso, os valores máis baixos de $a$* poderían explicarse por un grao moi baixo de oxidación lipídica, como se explica a continuación.

En canto ás propiedades antioxidantes da carne, nin a actividade de eliminación de radicais libres da carne (DPPH) nin o grao de oxidación lipídica (TBARS) diferiron en relación ás dietas experimentais ($p \geq 0{,}132$). Os valores de TBARS foron notablemente baixos en todos os tratamentos (media TBARS= 0,02 mg MDA/kg), o que indica que a oxidación lipídica foi moi baixa. Como xa se explicou, o contido en lípidos do músculo LL resultou ser moi reducido, o que podería explicar en parte o baixo grao de oxidación dos lípidos. Estes valores están dentro do intervalo observado por algúns autores [257–259] aínda que son inferiores aos publicados por outros autores [260,261] para este tipo de carne. A cantidade e o tipo de graxa, o tipo de mostra (refrixerada vs. conxelada) e o tempo de almacenamento poderían influír nestes valores.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

As macroalgas mariñas demostraron ter tanto efectos positivos como negativos sobre a capacidade antioxidante da carne. Por unha banda, son coñecidas polos seus altos contidos en polifenois e outros compostos antioxidantes [62,159], que poderían reducir a oxidación lipídica da carne cando son incluídas en alimentación animal [262]. A cantidade de compostos antioxidantes nas macroalgas varía moito dependendo da especie, o momento de recolección, a temperatura e factores estresantes, e por tanto se o obxectivo é conseguir o efecto antioxidante das macroalgas é necesario determinar o seu contido nestes compostos [262]. Por outra banda, tanto as macroalgas como a carne de coello son ricas en ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) [61], o que conleva a un maior grao de oxidación e, en consecuencia, a unha redución da vida útil e a un posible sabor rancio dalgúns cortes de carne [106,263,264]. Por tanto, é importante acadar un equilibrio entre o contido en antioxidantes e un perfil saudable de ácidos graxos na carne de coello.

### 4.4.2. Perfil de ácidos graxos da carne

O perfil de ácidos graxos do músculo LL móstrase, para cada grupo experimental, na Táboa 4.4.3. Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) foron predominantes en todos os grupos (de media 496 mg/100 g de músculo), seguidos dos ácidos graxos saturados (SFAs, de media 383 mg/100 g de músculo) e os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs, de media 309 mg/100 g de músculo). Estes valores difiren dos valores de referencia indicados para este tipo de carne [248,263,265]. Aínda que a carne de coello se caracteriza por un perfil de ácidos graxos saudable en relación con outros tipos de carne, xa que xeralmente presenta menores contidos de SFAs e colesterol e maiores cantidades de PUFAs e n-3 e n-6 equilibrados, a maior proporción de ácidos graxos está constituída polos SFAs (38-40%), seguidos dos MUFAs (22-32%) ou PUFAs (24-37%), dependendo do corte de carne. Polo tanto, o cambio nas proporcións de ácidos graxos (MUFAs > SFAs > PUFAs) é un efecto positivo xa que os MUFAs considéranse beneficiosos para a saúde humana, en comparación cos SFAs, que neste caso foron moi inferiores aos valores habituais. Respecto aos ácidos graxos individuais, os máis abundantes en todos os tratamentos foron os ácidos palmítico (C16:0), trans-vaccénico (11t-C18:1), oleico (C18:1n-9) e linoleico (C18:2n-6). Estes resultados coinciden cos valores publicados anteriormente para esta carne, nos que os ácidos palmítico, oleico e linoleico tamén foron os ácidos graxos máis abundantes [263].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.4.3. Composición de ácidos graxos do músculo *longissimus lumborum* (mg/100 g de músculo) en relación con cada dieta experimental.**

| Ácidos graxos | Control | DSL | ESL | EHE | EU | EEM | Valor *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C6:0 | 0,369 $^{a}$ | 0,545 $^{ab}$ | 0,475 $^{ab}$ | 0,423 $^{ab}$ | 0,639 $^{b}$ | 0,030 | 0,031 |
| C8:0 | 0,280 | 0,371 | 0,330 | 0,304 | 0,430 | 0,021 | 0,159 |
| C:10 | 0,770 $^{a}$ | 1,40 $^{ab}$ | 1,10 $^{ab}$ | 1,15 $^{ab}$ | 2,44 $^{b}$ | 0,170 | 0,017 |
| C12:0 | 1,032 $^{a}$ | 1,67 $^{ab}$ | 1,44 $^{ab}$ | 1,59 $^{ab}$ | 3,19 $^{b}$ | 0,207 | 0,007 |
| C13:0 | 0,136 $^{a}$ | 0,152 $^{ab}$ | 0,145 $^{ab}$ | 0,143 $^{a}$ | 0,207 $^{b}$ | 0,008 | 0,017 |
| C14:0 | 14,8 $^{a}$ | 20,3 $^{ab}$ | 19,3 $^{ab}$ | 17,6 $^{a}$ | 28,4 $^{b}$ | 1,23 | 0,004 |
| C14:1*n*-5 | 0,932 $^{a}$ | 1,97 $^{ab}$ | 2,06 $^{ab}$ | 1,44 $^{ab}$ | 3,09 $^{b}$ | 0,230 | 0,032 |
| C15:0 | 4,15 | 4,51 | 4,50 | 4,36 | 5,86 | 0,204 | 0,056 |
| C16:0 | 239 $^{a}$ | 276 $^{ab}$ | 284 $^{ab}$ | 259 $^{a}$ | 369 $^{b}$ | 13,1 | 0,013 |
| C16:1*n*-7 | 19,6 $^{a}$ | 33,3 $^{ab}$ | 36,2 $^{ab}$ | 27,4 $^{a}$ | 50,0 $^{b}$ | 2,79 | 0,005 |
| C17:0 | 5,09 | 5,30 | 5,19 | 5,05 | 6,77 | 0,242 | 0,118 |
| C18:0 | 54,0 | 58,8 | 56,6 | 54,8 | 72,5 | 2,29 | 0,060 |
| 9t-C18:1 | 2,26 | 2,24 | 2,39 | 2,23 | 2,34 | 0,070 | 0,938 |
| 11t-C18:1 | 185 $^{a}$ | 208 $^{ab}$ | 224 $^{ab}$ | 197 $^{a}$ | 289 $^{b}$ | 11,0 | 0,017 |
| C18:1*n*-9 | 163 $^{a}$ | 212 $^{ab}$ | 229 $^{ab}$ | 201 $^{ab}$ | 296 $^{b}$ | 12,4 | 0,009 |
| C18:1*n*-7 | 12,7 | 13,6 | 15,1 | 12,5 | 17,2 | 0,623 | 0,083 |
| C18:2*n*-6 | 206 $^{a}$ | 224 $^{ab}$ | 224 $^{ab}$ | 219 $^{ab}$ | 289 $^{b}$ | 9,67 | 0,045 |
| C18:3*n*-6 | 0,949 | 1,06 | 1,11 | 1,10 | 1,38 | 0,053 | 0,111 |
| C18:3*n*-3 | 13,5 $^{a}$ | 15,8 $^{ab}$ | 15,2 $^{ab}$ | 14,6 $^{a}$ | 22,8 $^{b}$ | 0,963 | 0,012 |
| 9c,11t-C18:2 (CLA) | 1,12 | 1,45 | 1,34 | 1,19 | 1,67 | 0,068 | 0,072 |
| C20:0 | 0,845 $^{a}$ | 1,01 $^{ab}$ | 0,944 $^{ab}$ | 0,900 $^{a}$ | 1,35 $^{b}$ | 0,052 | 0,012 |
| C20:1*n*-9 | 2,09 | 2,34 | 2,50 | 2,04 | 3,30 | 0,162 | 0,088 |
| C20:2*n*-6 | 3,89 | 4,13 | 4,12 | 3,74 | 4,38 | 0,146 | 0,708 |
| C21:0 | 1,26 | 1,28 | 1,28 | 1,15 | 1,14 | 0,039 | 0,655 |
| C20:3*n*-6 | 4,69 | 4,48 | 4,76 | 4,44 | 4,67 | 0,126 | 0,923 |
| C20:4*n*-6 | 41,0 | 36,8 | 40,6 | 39,2 | 34,3 | 1,08 | 0,250 |
| C20:3*n*-3 | 0,492 | 0,467 | 0,462 | 0,418 | 0,553 | 0,030 | 0,728 |
| C20:5*n*-3 (EPA) | 1,59 | 1,53 | 1,55 | 1,52 | 1,45 | 0,042 | 0,874 |
| C22:0 | 0,474 | 0,518 | 0,491 | 0,509 | 0,627 | 0,024 | 0,288 |
| C22:1*n*-9 | 0,237 | 0,262 | 0,278 | 0,228 | 0,287 | 0,017 | 0,791 |
| C22:2*n*-6 | 1,13 | 1,09 | 1,58 | 1,28 | 1,25 | 0,085 | 0,413 |
| C24:0 | 0,413 | 0,509 | 0,426 | 0,323 | 0,659 | 0,067 | 0,610 |
| C22:5*n*-3 (DPA) | 7,27 | 6,55 | 7,19 | 6,64 | 6,55 | 0,164 | 0,443 |
| C22:6*n*-3 (DHA) | 1,75 | 1,56 | 1,82 | 1,62 | 1,59 | 0,047 | 0,349 |
| C24:1*n*-9 | 0,336 | 0,324 | 0,375 | 0,335 | 0,410 | 0,020 | 0,664 |
| SFA | 324 $^{a}$ | 374 $^{ab}$ | 377 $^{ab}$ | 348 $^{a}$ | 494 $^{b}$ | 17,3 | 0,014 |
| MUFA | 387 $^{a}$ | 475 $^{ab}$ | 513 $^{ab}$ | 445 $^{a}$ | 663 $^{b}$ | 26,3 | 0,008 |
| PUFA | 281 | 298 | 302 | 293 | 369 | 11,3 | 0,098 |
| *n*-3 | 22,9 | 24,6 | 23,9 | 22,7 | 31,9 | 1,11 | 0,041 |
| *n*-6 | 258 | 272 | 276 | 269 | 337 | 10,2 | 0,106 |
| Total | 992 $^{a}$ | 1146 $^{ab}$ | 1191 $^{ab}$ | 1086 $^{a}$ | 1527 $^{b}$ | 53,8 | 0,015 |

DSL: *S. latissima* deshidratada; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva spp*. SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados; *n*-3: Omega-3; *n*-6: Omega-6. $^{a-b}$ :para cada parámetro (fila), as letras diferentes indican que os valores medios foron diferentes ($P < 0,05$; test de Tukey). EEM: erro estándar da media.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En canto ás dietas experimentais, os coellos que foron alimentados coa dieta que contiña o extracto de *Ulva* spp. (grupo EU) mostraron unha composición significativamente diferente de ácidos graxos ao resto de grupos. Tanto os contidos de MUFAs como de SFAs na carne do grupo EU (663 e 494 mg/100 g de músculo, respectivamente) foron significativamente máis altos (1,7 e 1,5 veces máis) que no grupo control (387 e 324 mg/100 g de músculo, respectivamente). Os grupos DSL e ESL mostraron valores máis altos destes ácidos graxos que o grupo control, aínda que non foi significativo. O contido de PUFAs tamén foi maior no grupo EU (369 mg/100 g de músculo) que no grupo control (281 mg/100 g de músculo), aínda que non resultou significativo. Este efecto podería estar asociado co maior contido de graxa no músculo LL neste grupo, xa que o contido total de ácidos graxos foi significativamente maior no grupo EU (1527 mg/100 g de músculo) que no grupo control (992 mg/100 g de músculo). Como se describiu anteriormente, estes efectos poderían proceder da menor dixestibilidade das proteínas neste grupo. De feito, nos porcos alimentados con dietas con baixo contido de proteínas (ou lisina), nos que aumentou a acumulación de graxa no músculo, o contido de MUFAs e SFAs tamén aumentou e o contido de PUFA diminuíu [253,254]. De todos os xeitos, tanto o contido total de graxa como o perfil de ácidos graxos da carne de porco son moi diferentes aos da carne de coello, polo que os resultados deben ser comparados con precaución.

O contido nalgúns ácidos graxos individuais, como o mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), trans-vaccénico (11t-C18:1), oleico (C18:1*n*-9) e linoleico (C18:2*n*-6), tamén foi maior ($p$<0,05) na carne dos coellos suplementados con *Ulva* spp. Ademais, dous ácidos graxos de cadea impar (C15:0 e C17:0) mostraron unha tendencia a aumentar no grupo EU en comparación co grupo control.

Estes achados difiren dos doutros estudos, aínda que, polo que sabemos, non hai estudos comparables nos que se probasen as mesmas macroalgas e a mesma dose en coellos. Por exemplo, a inclusión de extractos de laminarina e fucoidano derivados de *Laminaria digitata* (macroalga parda) nas dietas de porcos a doses de 450-900 mg/kg de penso [106] diminuíu o contido de SFAs do músculo LL. Tamén se obtiveron resultados similares tras a inclusión de *Cladophora glomerata* (macroalgas verdes de auga doce) a doses do 4 e do 8% (p/p) en dietas para coellos no post-destete [264], o que mellorou o perfil da carne ao diminuír os SFAs e MUFAs e aumentar a proporción de PUFAs. Noutro estudo realizado en coellos no que a microalga *Spirulina platensis* foi engadida ás súas dietas a razón de 50-150 g/kg de penso, a carne (músculo LL) tamén mostrou un menor contido de SFAs e MUFAs e un maior contido de PUFAs [266]. A comparación destes resultados debe ter en conta que o posible efecto das macroalgas sobre o perfil de ácidos graxos da carne probablemente variará en función de numerosos factores. Por exemplo, *Spirulina platensis* é unha microalga cunha composición moi diferente á das macroalgas mariñas. Por outra banda, a dose incluída tamén determina os posibles efectos, e estes estudos en coellos incluíron unha maior proporción de algas (4-8% para *Cladophora glomerata* e 5-15% para *Spirulina platensis*) que a utilizada neste estudo.

A pesar destas diferenzas, algunhas macroalgas mariñas parecen modificar o perfil de ácidos graxos da carne cando se inclúen en alimentación animal. Para comprender por que se

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

producen estes efectos, é importante ter en conta que o contido en lípidos da maioría das macroalgas mariñas é inferior ao 5% de MS [61,95], e que xeralmente se empregan a doses baixas (<2%) en alimentación animal, como ocorre neste estudo. De feito, algunhas investigacións observaron que a contribución directa de ácidos graxos por parte das macroalgas á dieta non explicaría o efecto sobre o perfil de ácidos graxos da carne [106]. No presente estudo, a dose incluída de macroalgas foi moi baixa (1,025%) e o contido de graxa bruta da dieta foi relativamente baixo. Ademais, tres dos produtos de macroalgas utilizados foron extractos acuosos, nos que se prevé que os lípidos estean practicamente ausentes (salvo o inesperado alto contido en graxa do extracto de *Ulva* spp.), xa que son procesados co obxectivo de mellorar a dixestibilidade e concentrar os polisacáridos fermentables beneficiosos. De feito, o perfil de ácidos graxos de todas as dietas experimentais foi moi similar (Táboa 3.11), o que significa que o aumento de ácidos graxos no grupo EU non pode provir da súa contribución directa na dieta. Polo tanto, a explicación podería ser que as macroalgas alteran o perfil de ácidos graxos da carne ao interactuar coa microbiota intestinal e/ou co metabolismo das graxas. Algúns polisacáridos derivados de macroalgas demostraron que actúan como prebióticos e que, polo tanto, alteran o microbioma, co consecuente aumento de ácidos graxos de cadea curta (SCFA). Estes SCFA actúan como substrato para a síntese endóxena de ácidos graxos, o que explica o seu efecto sobre o perfil de ácidos graxos da carne [106,107]. Esta influencia podería verse reflectida nos ácidos graxos de cadea impar (C15:0 e C17:0), que son sintetizados pola microbiota intestinal mediante o alongamento de propionato e valerato -ácidos graxos volátiles derivados da fermentación microbiana en coellos- e que son empregados en ruminantes como biomarcadores da función ruminal [267]. No noso caso, a inclusión de *Ulva* spp., rica en fibra soluble [187], mostrou unha tendencia a aumentar a proporción de ácidos graxos de cadea impar no músculo LL, o que podería constituír un indicio deste tipo de efecto sobre a microbiota do coello. Do mesmo xeito, a inclusión de polpa de remolacha azucreira (fibra soluble) aumentou os ácidos graxos de cadea impar e ramificada no músculo LL do coello [268] e no leite [269].

### 4.4.3. Análise sensorial da carne

Os resultados obtidos da análise sensorial da carne de cada tratamento móstranse na Figura 4.1.1. O olor, a tenrura e a fibrosidade da carne non se viron afectadas polas dietas experimentais ($p$>0,05). A zumarencia da carne mellorou cando os coellos foron alimentados con extracto *de H. elongata*, comparado coa carne do grupo control (5,6 vs 4,8; $p$ = 0,012). O sabor da carne tamén se viu mellorado pola dieta experimental que contiña extracto *de S. latissima* (5,8 vs 5,2, $p$ = 0,008). Estes resultados preliminares son moi positivos, xa que é importante comprobar que a adición de macroalgas mariñas ás dietas dos coellos non outorga un sabor desagradable á carne. As dietas suplementadas con macroalgas non afectaron negativamente aos atributos sensoriais da carne e, polo tanto, a aceptabilidade dos produtos por parte das persoas consumidoras non debería verse afectada. Ademais, algúns atributos sensoriais desta carne -xa moi apreciada- foron incluso mellorados, xa que os panelistas consideraron que a zumarencia da carne mellorou ao engadir o extracto de *H. elongata* á dieta do coello. No caso da dieta

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

suplementada co extracto *de S. latissima*, o sabor da carne considerouse máis agradable que o da carne da dieta control.

Hai moi poucos estudos dispoñibles para comparar estes resultados, aínda que outros estudos tamén observaron en xeral efectos sensoriais positivos da inclusión de macroalgas na dieta de diferentes especies. A inclusión de extractos de laminarina e fucoidano en dietas porcinas [106] mellorou as propiedades sensoriais visuais da carne e non modificou as propiedades sensoriais (aspecto, textura, aceptabilidade), de forma que concluíron que estes extractos poderían empregarse sen afectar á aceptación do produto. Nun estudo previo realizado con coellos [83] incluíronse polisacáridos derivados de *Laminaria* spp. a doses de 0,3 e 0,6% (p/p) e a carne obtida mellorou en canto a textura e sabor. Os nosos resultados, que mostran que tanto o sabor como a textura da carne de coello melloraron grazas á inclusión de macroalgas pardas na dieta, son consistentes con estas investigacións previas.

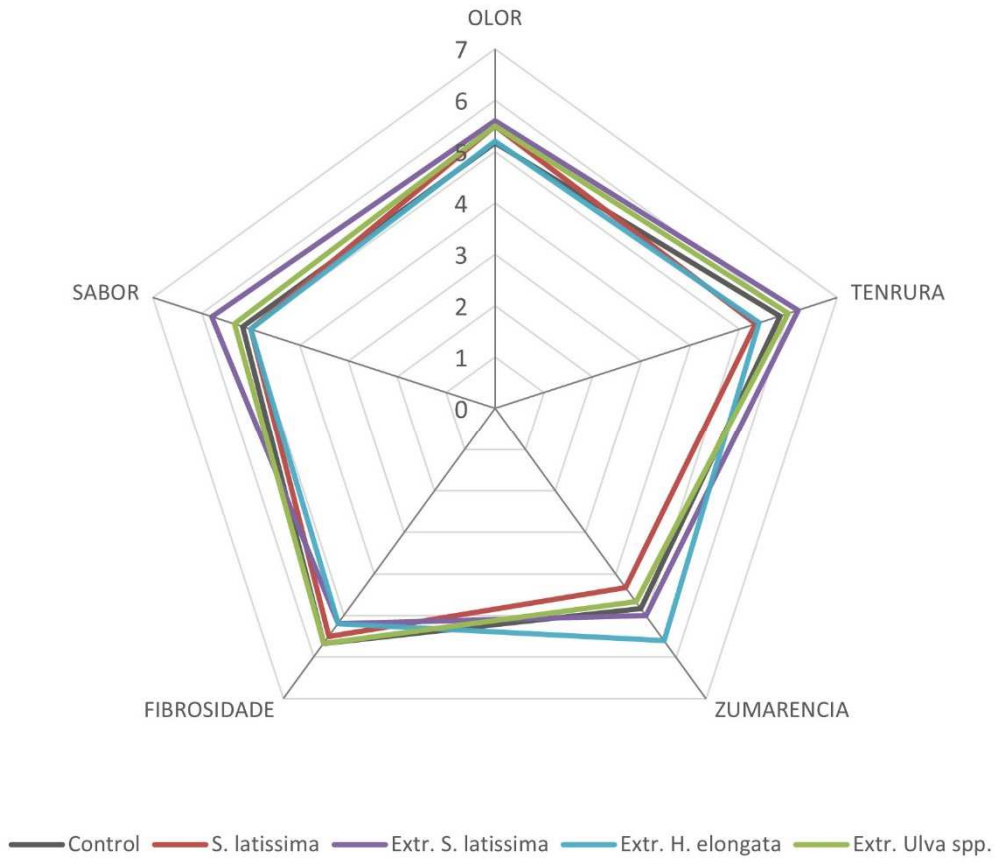



**Figura 4.4.1: Puntuacións medias (escala 0-7) das propiedades sensoriais da carne, para cada tratamento.**

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 4.5. CAPÍTULO V: ELEMENTOS ESENCIAIS E TÓXICOS NA CARNE E VÍSCERAS DE COELLOS ALIMENTADOS CON CATRO PRODUTOS DE MACROALGAS.

### 4.5.1. Macrominerais

Os resultados do perfil mineral nos tecidos (fígado, ril e músculo) e no soro dos coellos alimentados coas diferentes dietas suplementadas con macroalgas preséntanse na Figura 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente. En xeral, as concentracións de macrominerais no grupo control atopáronse dentro dos intervalos normais descritos anteriormente na bibliografía [248,265,270]. A carne de coello caracterízase por niveis moi baixos de sodio e niveis moi altos de potasio e fósforo, en comparación con outras especies como o porco, o vacún ou o polo (entre 0,6-1,0 g de sodio/kg de carne, 1,5-3,7 g de potasio/kg de carne e 1,5-2,2 g de fósforo/kg de carne; [7,270]); o que fai que a carne de coello sexa especialmente recomendada nas dietas para persoas hipertensas [7].

A pesar da elevada concentración de macrominerais observada nalgunhas das especies de macroalgas empregadas no noso estudo (como se indica na Táboa 3.12), a súa inclusión nas dietas dos coellos mostrou un impacto mínimo tanto nas concentracións de macrominerais no soro como nos tecidos. Estes resultados coinciden co esperado, xa que a dieta basal foi formulada para aportar os niveis recomendados de cada macromineral incorporando unha premestura mineral, o que indica que as necesidades nutricionais foron adecuadamente cubertas. A ausencia de diferenzas entre os grupos experimentais indica unha eficiente regulación homeostática dos macrominerais [271] unha vez satisfeitas as necesidades fisiolóxicas.

O extracto de *Ulva* spp. (EU) foi o único tratamento que tivo un impacto estatisticamente significativo na deposición de macrominerais nos tecidos. Este extracto presentou unha concentración de xofre excepcionalmente alta (117 g/kg MS), superando a outros produtos de macroalgas nunha orde de magnitude, o que resultou nun aumento do 26,2% deste elemento na dieta. En consecuencia, provocou un aumento significativo das concentracións de xofre no ril (4,36 g/kg) tanto en comparación co control (3,89 g/kg) como cos grupos suplementados con outras macroalgas. Estes achados pódense atribuír ao patrón observado de excreción renal deste mineral [271]. A falta de influencia sobre outros tecidos pode considerarse un resultado positivo. Sen embargo, o xofre foi descrito en estudos previos como antagonista do selenio [103], principalmente en ruminantes [104,105,272], xa que ambos elementos mostran propiedades químicas e físicas similares [105]. Nestes estudos, os altos niveis de xofre na dieta reduciron a concentración de selenio no fígado e no plasma, o que tería un efecto negativo nas áreas deficientes en selenio [104]. Polo tanto, sería necesario estudar o efecto do alto contido en xofre dalgunhas macroalgas sobre o contido de selenio no músculo e nas vísceras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

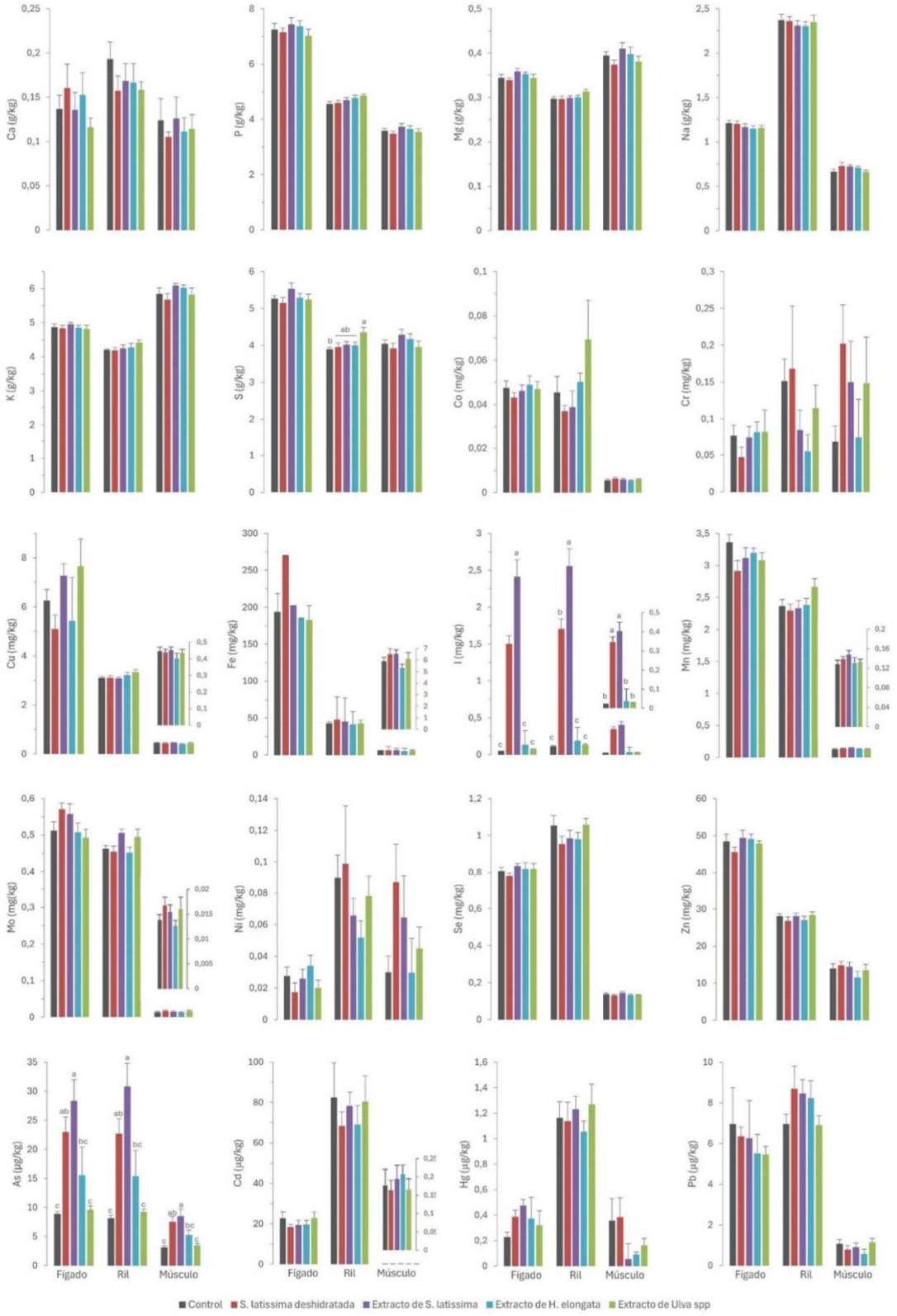



**Figura 4.5.1. Contido de macrominerais (calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K), xofre (S), expresados en g/kg de peso húmido), microminerais (cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), iodo (I), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se), zinc (Zn), expresados en mg/kg húmido peso) e elementos tóxicos (arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), chumbo (Pb), expresados en µg/kg de peso húmido) presentes no fígado, ril e músculo dos coellos alimentados coas diferentes dietas de macroalgas.**

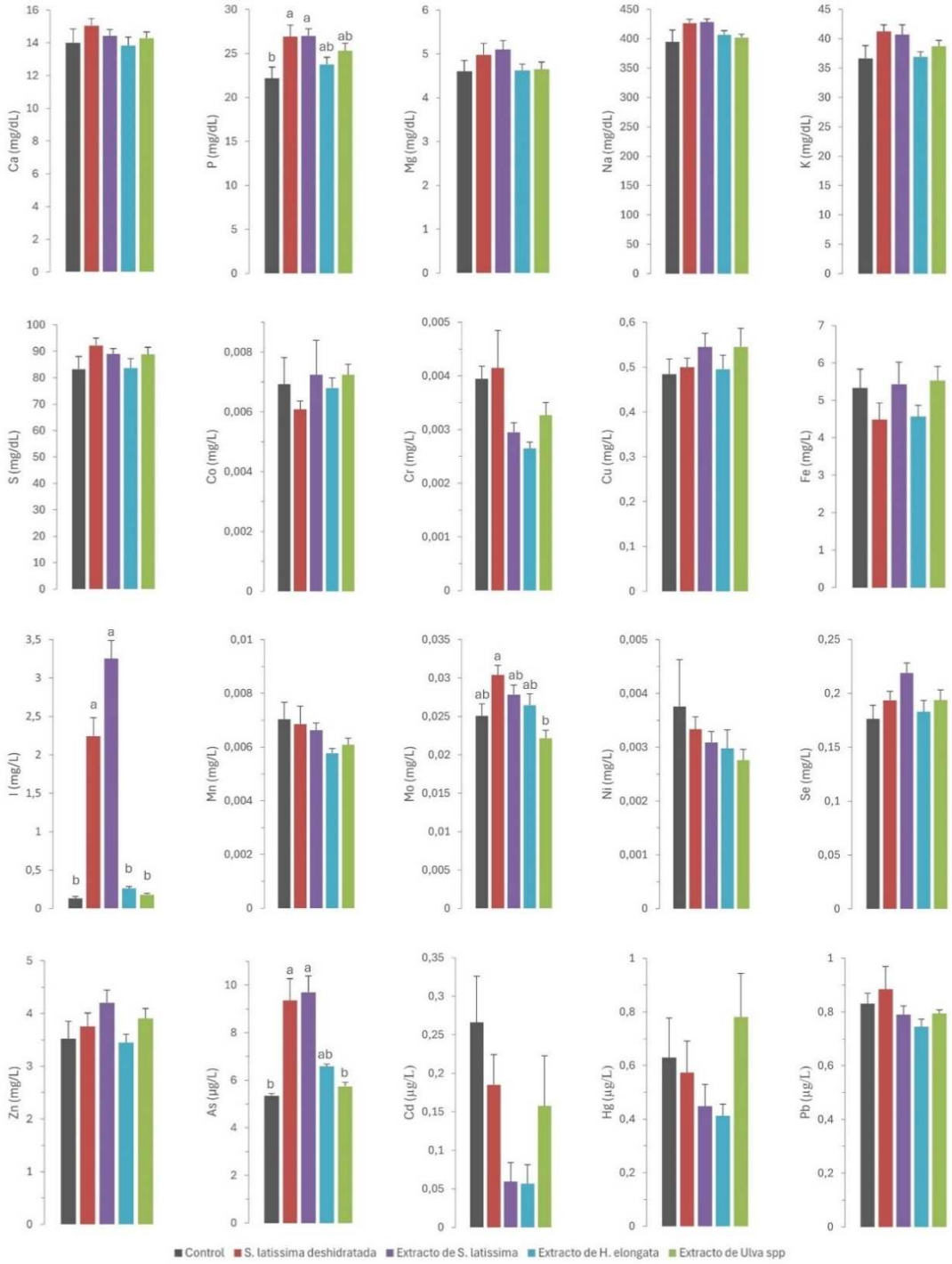



**Figura 4.5.2. Contido de macrominerais (calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K), xofre (S), expresados en mg/dL), microminerais (cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), iodo (I), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se), zinc (Zn), expresados en mg/L) e elementos tóxicos (arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), chumbo (Pb), expresados en µg/L) presentes no soro dos coellos alimentados coas diferentes dietas de macroalgas.**

Ademais, o extracto de *Ulva* spp. foi rico en magnesio (43,5 g/kg MS), mostrando valores unha orde de magnitude máis altos que outros produtos de macroalgas e resultando nun aumento do 23,8% de magnesio na dieta. Aínda que houbo unha tendencia a aumentar ($p$ =0,101) as concentracións de magnesio no ril neste grupo (0,313 g/kg) en comparación co control (0,296

g/kg) e os outros grupos suplementados con macroalgas, non se observaron máis diferenzas nas concentracións de magnesio nos outros tecidos. Isto suxire un potencial papel do ril na regulación homeostática deste macromineral, similar ao patrón observado para o xofre.

Cabe destacar tamén o considerable contido de sodio observado en todos os produtos de macroalgas estudados, que oscilou entre 26,9 e 99,9 g/kg de MS. Isto representa ata un 28,7% de aumento no contido de sodio nas dietas suplementadas con macroalgas en comparación coa dieta control. A pesar destas variacións, non se observaron diferenzas estatisticamente significativas entre os grupos experimentais do noso estudo. Este resultado é especialmente prometedor xa que o alto contido en sal dalgunhas macroalgas é motivo de preocupación para o seu emprego en dietas animais, especialmente no caso da carne de coello, xa que é apreciada polos seus baixos niveis de sodio. Este atributo fai que a carne de coello sexa moi recomendable para as persoas que seguen dietas hipotensas [270].

Un resultado sorprendente do noso estudo é o incremento estatisticamente significativo ($p$=0,011) das concentracións de fósforo sérico (Figura 4.5.2) en todos os grupos experimentais (entre 24,3 e 26,9 mg/dl) en comparación co grupo control (22,1 mg/dL), especialmente nos dous grupos *de S. latissima.* Isto é inesperado dadas as concentracións de fósforo considerablemente máis baixas en todas as macroalgas probadas (entre 1,67 e 4,17 g/kg MS) en comparación coa dieta control basal (7,18 g/kg MS). Aínda que estes resultados poden parecer de menor importancia ao atoparse dentro dos valores fisiolóxicos, estes poderían indicar unha maior biodispoñibilidade do fósforo nas macroalgas en comparación con outros ingredientes empregados nos pensos. Numerosos autores veñen observando un baixo contido de ácido fítico en moitas especies de macroalgas -por debaixo da maioría dos ingredientes empregados nos pensos- o que indica que o fósforo proporcionado polas macroalgas tería unha biodispoñibilidade bastante elevada, e por tanto as macroalgas poderían ser unha fonte interesante deste elemento [273–275]. Estes resultados positivos son destacables xa que a redución de fósforo nas dietas é unha preocupación ambiental importante [276]. Este aspecto merecería unha investigación máis extensa para comprendelo de forma completa.

### 4.5.2. Microminerais

As concentracións de microminerais nos tecidos e no soro atopáronse dentro dos intervalos normais previamente descritos para coellos na literatura [248,265,270]. A carne de coello, ao igual que outras carnes brancas, caracterízase por un menor contido en ferro, en comparación con outras especies gandeiras (oscilando entre 18-46 mg Fe/kg nas carnes vermellas), mentres que o contido en selenio é bastante elevado en comparación con outras carnes como a tenreira (<0,10 mg de selenio/kg de carne) pero similar á carne de vaca ou polo (0,15-0,17 mg de selenio/kg de carne) [7,277].

O iodo foi o único elemento que mostrou diferenzas significativas entre os grupos experimentais (Figura 4.5.1). O contido en iodo foi moi elevado (ata 4 ordes de magnitude) en *S. latissima,* tanto deshidratada (4446 mg/kg MS) como no extracto (6627 mg/kg MS), e en

USC

menor medida no extracto de *H. elongata* (220 mg/kg MS) e no extracto de *Ulva* spp. (36 mg/mg MS), o que provocou un aumento das concentracións de iodo nas dietas experimentais do 45 ao 8099% (Táboa 3.12). Estas altas concentracións de iodo nas dietas experimentais deron lugar a unha absorción de iodo moi elevada no intestino (non medida directamente, pero observada a partir das concentracións séricas de iodo: 2,24 e 2,79 mg/l nos grupos SL e ESL, e 0,715 e 0,179 mg/l nos grupos EHE e EU, en comparación con 0,133 mg/l no grupo control). É ben sabido que o iodo segue un control homeostático renal; a diferenza da maioría dos macro e microminerais, o iodo é absorbido en exceso no intestino e posteriormente o exceso é excretado no ril; no caso das galiñas e das femias dos mamíferos nos ovos ou no leite [278]. Este control homeostático, tamén utilizado polo selenio, permite desenvolver produtos animais enriquecidos con iodo [71]. En comparación co grupo control, a concentración de iodo no músculo aumentou significativamente, multiplicándose por 17, 20 e 2 nos grupos SL, ESL e EHE, respectivamente. No fígado e no ril, multiplicouse por 32, 52 e 3, e por 15, 23 e 2, respectivamente, nos tres grupos. Estes resultados confirman que as macroalgas son unha boa fonte dietética de iodo, o cal é transferido con éxito aos tecidos animais, debido á debilidade dos enlaces entre os polisacáridos e o iodo [92], e indican que o iodo proporcionado polas macroalgas é máis biodispoñible que o iodo inorgánico, como xa foi descrito anteriormente [71,278,279].

Ao analizar a asociación entre as concentracións de iodo nas diferentes dietas e nos tecidos observouse unha forte relación lineal (Figura 4.5.3; r >0,98; $p$ <0,001). Estes achados son particularmente interesantes xa que suxiren un patrón consistente da biodispoñibilidade de iodo e da deposición nos tecidos en todas as especies e/ou produtos de macroalgas probadas. Ademais, cando os nosos resultados foron comparados con outros estudos publicados na literatura científica en diferentes especies animais (incluíndo peixes), as cales recibiron varios tipos de macroalgas na súa dieta cun amplo rango de inclusión (ata 240 mg de iodo/kg de penso completo), o patrón de deposición de iodo no músculo foi moi similar (Figura 4.5.4; r =0,98; $p$<0,001). Esta uniformidade abre a posibilidade de adaptar facilmente as concentracións de iodo na carne e os produtos cárnicos para adaptalas ás necesidades específicas da poboación. Cabe destacar que, aínda que o iodo é crucial para manter a saúde e a produtividade, unhas concentracións excesivas poden ter efectos nocivos tanto en humanos como en animais, polo que é necesario realizar unha regulación coidadosa dentro dos intervalos apropiados [71].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

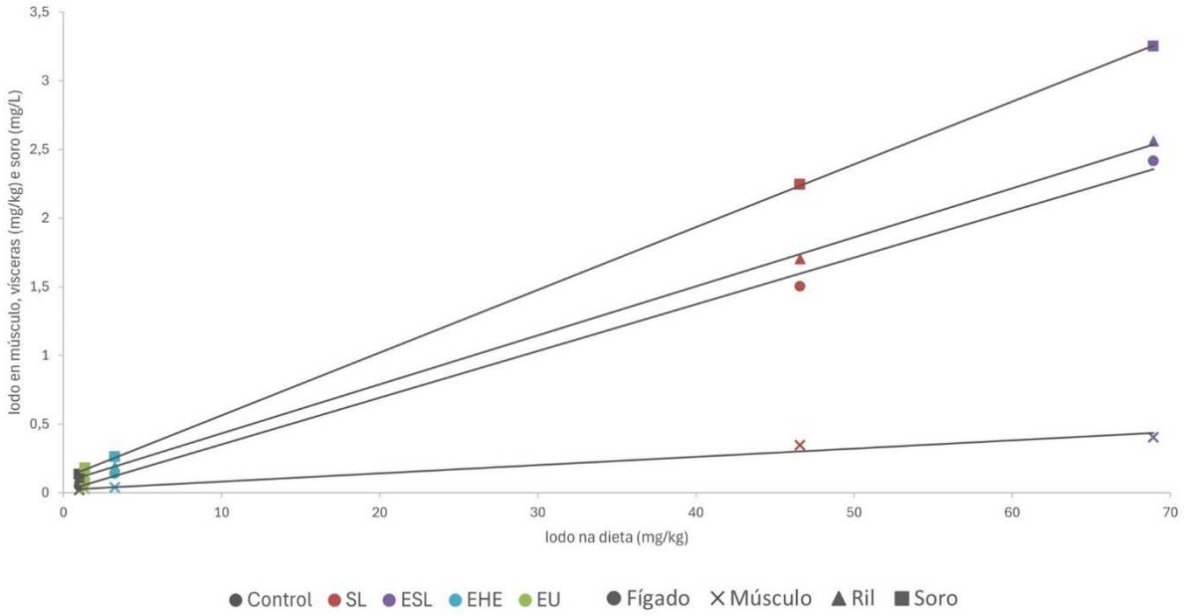



**Figura 4.5.3. Relación lineal entre o contido de iodo na dieta (mg/kg de materia seca) e no músculo, vísceras (mg/kg de peso húmido) e soro (mg/L) dos coellos. SL: *S. latissima* deshidratada; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva* spp.**

En xeral, a maioría das carnes caracterízanse por un baixo contido de iodo, que normalmente oscila entre 0,02 e 0,06 mg/kg. En cambio, outros alimentos como o leite (0,10 mg/kg), o queixo (0,20 mg/kg), os ovos (0,33 mg/kg) e o peixe (0,13 mg/kg) son significativamente máis ricos neste elemento esencial [71]. Non obstante, mediante a suplementación con macroalgas pardas da dieta dos animais -dentro dos niveis de iodo permitidos pola lexislación europea (10 mg de iodo/kg de penso completo)- o iodo acadou unhas concentracións destacables no músculo (0,35-0,40 mg/kg), equivalentes a algúns dos alimentos ricos en iodo mencionados anteriormente. De feito, numerosas especies de macroalgas foron xa propostas como prometedoras ferramentas para mellorar o contido de iodo da carne e doutros produtos de orixe animal, contribuíndo así a mitigar a deficiencia de iodo, que é endémica en numerosas rexións do mundo [71]. Varios estudos previos enriqueceron a carne con iodo de forma exitosa, incorporando determinadas especies de macroalgas nas dietas do gando, como se observa na Figura 4.5.4. Ademais, as macroalgas propuxéronse como unha ferramenta moi axeitada para proporcionar iodo nas producións gandeiras ecolóxicas, nas que a suplementación mineral está máis limitada. Por exemplo, en vacún de leite, un suplemento composto por *Ulva rigida, Sargasum muticum* e *Saccorhiza polyschides* (administrado a 100 g/animal/día) duplicou o contido de iodo no leite, tratando eficazmente a deficiencia de iodo dos animais e producindo leite enriquecido con iodo [94].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

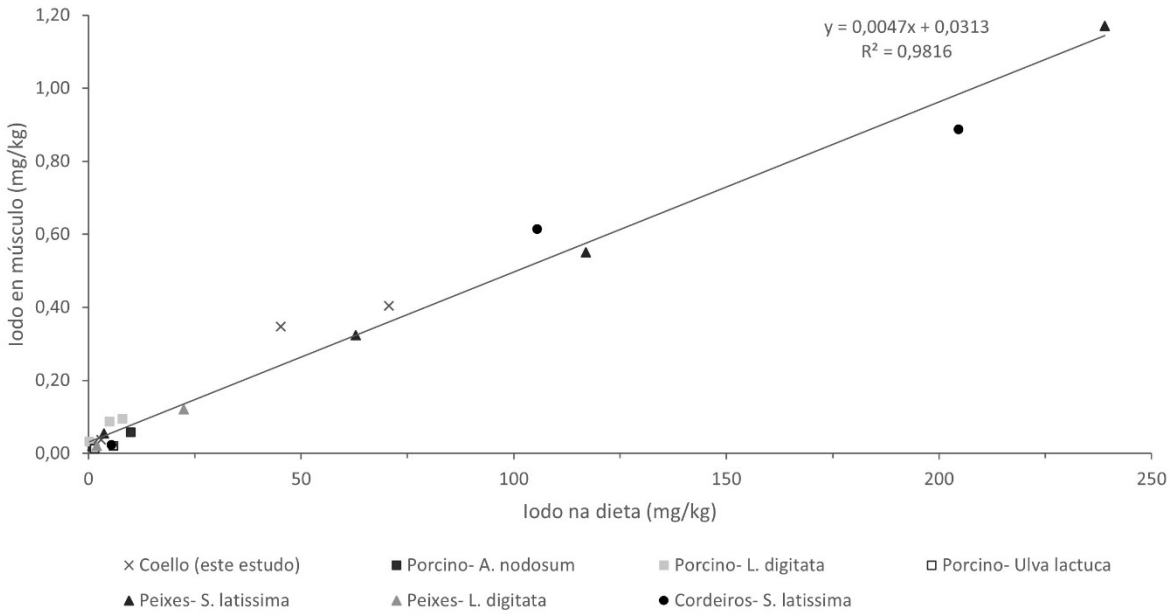



**Figura 4.5.4. Deposición de iodo no músculo (mg/kg de peso húmido) de animais alimentados con diferentes dietas de macroalgas, en relación co contido de iodo na dieta (mg/kg de peso seco). Os valores fan referencia ao presente estudo (coellos) e a estudos realizados con diferentes macroalgas en porcino (*Ascophyllum nodosum* [71], *Laminaria digitata* [279], *Ulva lactuca* [280]), peixes (*S. latissima* [101], *L. digitata* [281] e cordeiros (*S. latissima* [282]).**

Coa excepción do iodo, as concentracións da maioría dos outros elementos traza foron baixas en todos os produtos de macroalgas probados no noso estudo, en comparación coa dieta basal/control (Táboa 3.12), o que indica que estas macroalgas non proporcionarían ningunha contribución mineral adicional. En consecuencia, non se esperaría ningún efecto da suplementación de macroalgas sobre o contido micromineral da carne e das vísceras. Sen embargo, o contido de ferro no fígado mostrou unha tendencia ($p$ = 0,085) a aumentar no grupo SL (269 mg/kg) en comparación co control (193 mg/kg) e os demais grupos experimentais (182-202 mg/kg). Tendo en conta que a concentración de ferro de *S. latissima*, aínda que alta en comparación con outras algas, é menor que a proporcionada pola dieta basal, estes resultados poderían suxerir que a biodispoñibilidade do ferro proporcionado por esta macroalga podería ser maior que a doutros ingredientes empregados nos pensos. De feito, algúns estudos previos xa describiron que a biodispoñibilidade do ferro en *Laminaria* spp. é de aproximadamente o 92,4% [283], e que existe unha correlación positiva entre a fibra soluble (constituída por algúns carbohidratos que se atopan nas macroalgas como a laminarina ou o fucoidano) e a biodispoñibilidade dalgúns minerais. Ademais, o baixo contido en ácido fítico atopado nas macroalgas podería mellorar a biodispoñibilidade doutros minerais como o ferro, como foi descrito anteriormente para o fósforo, xa que o ácido fítico pode actuar como un factor antinutritivo para algúns elementos [273,274].

Un patrón similar ao descrito para o ferro foi observado no caso do molibdeno, onde a inclusión de SL na dieta, cun contido de molibdeno máis elevado que as outras macroalgas pero menor que a dieta control, provocou un aumento significativo da concentración de molibdeno no soro ($p$ =0,002) e unha tendencia no fígado ($p$ =0,088) en comparación co control e os outros

grupos de macroalgas. A diferenza do ferro, non hai información na literatura científica sobre a biodispoñibilidade do molibdeno nas algas que explique os nosos resultados. Outra posible explicación podería ser a existencia dunha interacción con outros elementos da dieta. De feito, un estudo previo do noso grupo realizado en vacún de leite suplementado con macroalgas observou un efecto significativo sobre os niveis de molibdeno sérico e a excreción no leite, suxerindo que o contido de xofre do suplemento de macroalgas tería un efecto sobre o contido de molibdeno [94]. Outra posible explicación podería ser a existencia dunha interacción do molibdeno con outros elementos que presentan un patrón de excreción renal, como é o caso do iodo [271]. De feito, ademais da xa mencionada interacción entre o xofre e o selenio, na literatura reportáronse interaccións significativas entre o iodo e o arsénico e o selenio: uns niveis altos de iodo e arsénico poden diminuír os niveis de selenio [100–102], mentres que os altos niveis de selenio poden reducir o contido de certos elementos tóxicos como o arsénico [284]. No noso estudo, a concentración de selenio foi constante en todas as dietas e non se observaron diferenzas nas concentracións de selenio no soro e nos tecidos entre os grupos experimentais (ver Figura 4.5.1 e 4.5.2). Estes achados son importantes, xa que no caso contrario as altas concentracións tanto de iodo como de arsénico poderían dificultar o metabolismo do selenio e a súa deposición en varios tecidos.

### 4.5.3. Elementos tóxicos

Os residuos dos elementos tóxicos no soro e nos tecidos dos coellos alimentados coa dieta control foron baixos, o que indica unha exposición ambiental mínima a través da súa dieta. De feito, as concentracións de elementos tóxicos na dieta control foron notablemente máis baixas (Táboa 3.12) en comparación con outras dietas animais (arsénico: 0,31-0,85 mg/kg; cadmio: 0,07-0,19 mg/kg; mercurio: 0,012-0,05 mg/kg; chumbo: 0,07-1,16 mg/kg), e especialmente co peixe (arsénico: 4,25 mg/kg; cadmio: 0,17 mg/kg; mercurio: 0,06 mg/kg; chumbo: 0,07 mg/kg; [165]), nas cales tanto o arsénico como o mercurio acadan valores moi altos nas dietas xa que conteñen grandes cantidades de fariña de peixe, moi rica nestes elementos tóxicos [285]. No noso estudo, os residuos de elementos tóxicos atopados no músculo e no fígado foron similares ou incluso inferiores aos valores descritos anteriormente para o coello [286], aínda que a bibliografía é escasa. Non obstante, cando se compara coas concentracións de elementos tóxicos no fígado e nos riles doutras especies gandeiras en España [287,288], os coellos presentaron niveis significativamente máis baixos. Estas diferenzas poderían ser probablemente atribuíbles á lonxevidade relativamente máis curta dos coellos no momento do sacrificio, especialmente se os comparamos con outras especies gandeiras como os ruminantes.

A excepción do arsénico, as concentracións dos elementos tóxicos nas macroalgas analizadas no noso estudo foron destacablemente baixas (<0,5 mg/kg de MS) e moi similares aos niveis atopados na dieta control. En consecuencia, non se observaron diferenzas significativas nos residuos de cadmio, chumbo e mercurio no soro e nos tecidos dos coellos (como se mostra nas Figuras 4.5.1 e 4.5.2). Pola contra, e mostrando un patrón semellante ao iodo, as concentracións de arsénico nas macroalgas foron especialmente altas, alcanzando ata

tres ordes de magnitude superior en comparación coa dieta control. Este incremento foi moi destacable en *S. latissima*, tanto na súa forma deshidratada (89,3 mg/kg MS) como como extracto (133 mg/kg MS), e en menor medida nos extractos de *H. elongata* (51,9 mg/kg MS) e de *Ulva* spp. (2,25 mg/mg MS). Por tanto, as concentracións de arsénico nas dietas experimentais sufriron un aumento que oscilou entre 7,8% e 558,4%. Estas elevadas concentracións de arsénico nas dietas experimentais traducíronse en residuos de arsénico significativamente máis altos tanto no soro como nos tecidos en comparación co grupo control (Figuras 4.5.1 e 4.5.2), mostrando unha correlación lineal sólida coas concentracións de arsénico na dieta (ver Figura 4.5.5; r >0,93; $p$ <0,001). Aínda que foron elevados en comparación co control, os residuos de arsénico no fígado e nos riles (ata 30 µg/kg, o que supón un aumento por tres respecto ao grupo control) e, especialmente, no músculo (ata 8,5 µg/kg, aproximadamente tres veces máis que o grupo control), son relativamente baixos cando se comparan cos niveis atopados habitualmente na carne e nas vísceras [165], e moito máis baixos que noutros alimentos [289] como o arroz (90-150 µg/kg), e similares a outros alimentos como os ovos (8 µg/kg) ou o leite (3 µg/kg). En calquera caso, o contido de arsénico nos tecidos estivo moi por debaixo dos niveis máximos permitidos para outros alimentos (Regulamento UE 915/2023).

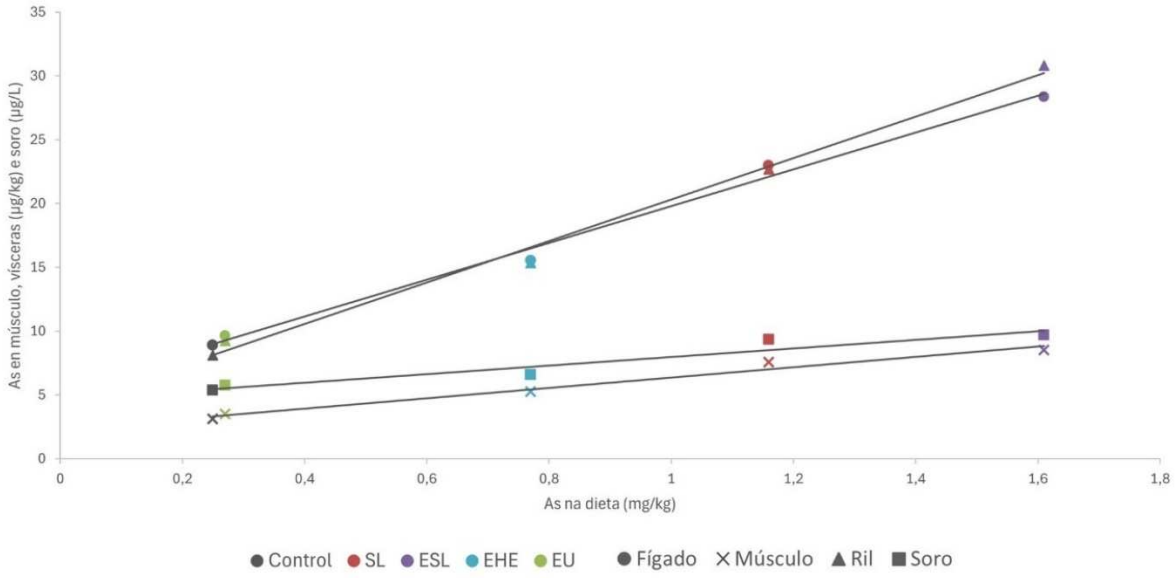



**Figura 4.5.5: Relación lineal entre o contido de arsénico na dieta (mg/kg de materia seca) e no músculo, vísceras (µg/kg de peso húmido) e soro (µg/L) dos coellos. SL: *S. latissima* deshidratada; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva spp*.**

Ademais, as macroalgas incorporadas a estas dietas experimentais demostraron posuír niveis moi baixos de arsénico inorgánico (<1 mg/kg MS), a forma máis tóxica de arsénico, mentres que a maior parte do arsénico nas macroalgas se atopa en formas orgánicas de mínima toxicidade [223]. A transferencia destas baixas cantidades de arsénico inorgánico aos tecidos animais tamén é mínima, polo que a carne fai unha contribución insignificante á exposición humana ao arsénico [165,289]. Ademais, observouse que o arsénico das macroalgas é menos biodispoñible en comparación co da fariña e as graxas de pescado, que son fontes primarias de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

arsénico en alimentación animal [101,271]; e en consecuencia, a deposición de arsénico na carne é moi limitada.

### 4.5.4. Interaccións entre elementos

Tendo en conta os patróns observados en varios elementos en diferentes tecidos, tal como se comentou anteriormente e apoiado polos antecedentes descritos na bibliografía, realizouse unha análise multivariante dos datos para cada tecido, co fin de dilucidar as relacións existentes entre os elementos. A análise de compoñentes principais revelou resultados interesantes no ril. A Figura 4.5.6 mostra un gráfico 3D que mostra as puntuacións das mostras de ril baseadas nos tres primeiros compoñentes principais, o que explica case o sesenta por cento da variabilidade total dos datos. Desta forma, xurdiron dous grupos distintos, cun grupo que representaría os tratamentos SL e ESL e o outro que incluiría as mostras de EHE, EU e do grupo control. Aínda que estes resultados eran esperados, dados os niveis significativamente diferentes de iodo e arsénico nas dietas SL e ESL, a aparición destas fortes asociacións no ril está determinada polo patrón de excreción renal destes elementos. Este patrón pode, á súa vez, influír noutros elementos que empregan esta vía de regulación, como o fósforo, o xofre, o molibdeno ou o selenio, como parecían suxerir os nosos resultados.

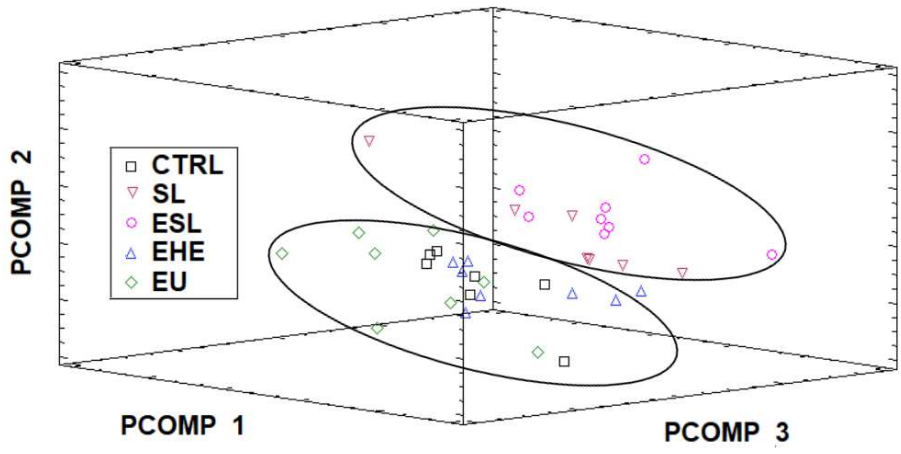



**Figura 4.5.6. Mostras de ril dos animais no espazo definido polos tres primeiros compoñentes principais (58,87% da varianza total dos datos) segundo as distintas dietas empregadas. SL: *S. latissima* deshidratada; ESL: extracto de *S. latissima*; EHE: extracto de *H. elongata*; EU: extracto de *Ulva* spp.**

Tras esta primeira análise, realizouse unha análise factorial para explorar as covarianzas dentro dun conxunto reducido das variables máis significativas (seleccionadas mediante a estatística "F-to-enter"), incluíndo iodo, fósforo, xofre, selenio e arsénico. A Figura 4.5.7, xerada despois da rotación Varimax, ilustra os resultados. O primeiro factor parece correlacionar o xofre e o fósforo, mentres que o segundo factor explicaría principalmente a covarianza entre o iodo e o arsénico. O selenio foi o único contribuínte do factor 3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

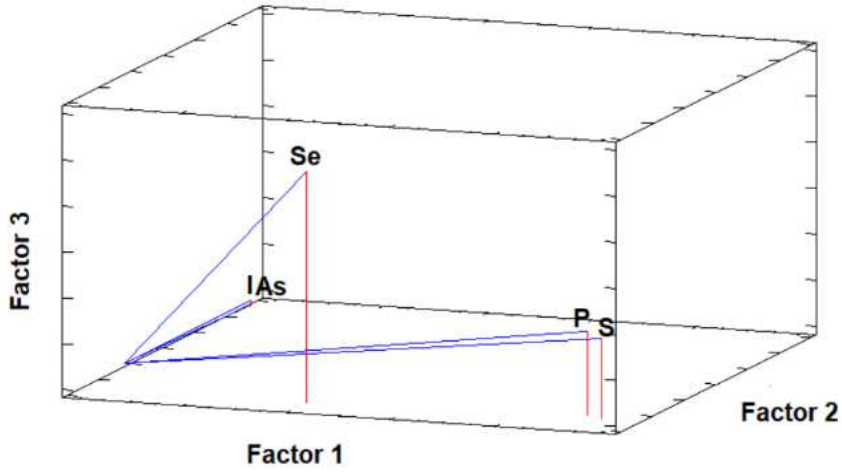



**Figura 4.5.7. Gráfico coas variables máis representativas nas mostras de ril segundo as distintas dietas empregadas.**

Estes resultados demostran que as altas concentracións de iodo e arsénico atopadas na maioría das macroalgas, particularmente *S. latissima* (dietas SL e ESL), así como a abundancia de xofre en todas as macroalgas, especialmente en *Ulva* spp., non interactuaron significativamente con outros elementos que presentan un patrón de eliminación renal. Como se mencionou anteriormente, a interacción entre iodo, arsénico e xofre co selenio, descrita na literatura científica [100–102,104,105], require de atención na práctica para evitar as posibles consecuencias da súa interacción competitiva (a altas concentracións) sobre os niveis de selenio nos animais. O selenio desempeña numerosas funcións no corpo como un compoñente esencial das encimas antioxidantes, realizando un papel fundamental na protección das células fronte ao dano oxidativo e reforzando a función inmune [290]. De aí que a falta de interaccións significativas entre estes tres elementos (iodo, arsénico e xofre), presentes en altas concentracións nas macroalgas, e outros elementos esenciais, especialmente o selenio, supoña un resultado moi favorable, xa que permitiría a incorporación destas macroalgas nas dietas animais sen limitacións.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 4.6. CAPÍTULO VI: PERCEPCIÓN DAS PERSOAS CONSUMIDORAS SOBRE SUPLEMENTAR AS DIETAS DOS COELLOS CON ALGAS MARIÑAS PARA REDUCIR O USO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUCIÓN CUNÍCOLA EN ESPAÑA.

### 4.6.1. Características socio-demográficas e hábitos xerais de consumo

As características socio-demográficas das persoas enquisadas (Táboa 4.6.1) foron homoxéneas en canto a xénero e idade debido ás cotas de mostraxe, e o nivel de renda e o nivel educativo foron representativos de todos os sectores da poboación. A maioría das persoas enquisadas vivían coa familia ou coa parella, aínda que unha alta proporción vivía soa ou con amizades. Ao redor dun terzo posuían Educación Secundaria Obrigatoria ou formación profesional, e dous terzos tiñan un título de grao ou posgrao (máster ou doutoramento).

**Táboa 4.6.1. Características socio-demográficas dos entrevistados.**

| **Xénero** | **N** |
|---|---|
| Muller | 209 |
| Home | 174 |
| Outro | 0 |
| **Idade (anos)** | |
| 18-30 | 53 |
| 31-64 | 226 |
| > 65 | 105 |
| **Ingresos mensuais (euros)** | |
| Ata 999 | 24 |
| 1000 a 1499 | 73 |
| 1500 a 1999 | 60 |
| 2000 a 2500 | 80 |
| 2500 a 2999 | 39 |
| 3000 ou máis | 100 |
| N/C | 7 |
| **Con quen vive** | |
| Familia | 205 |
| Só/soa | 54 |
| Amizades | 14 |
| Parella | 108 |
| Outros | 2 |
| **Nivel educativo** | |
| Sen estudos | 8 |
| Estudos Primarios | 33 |
| Educación Secundaria Obrigatoria | 59 |
| Formación profesional | 74 |
| Título universitario | 209 |

A maioría das persoas enquisadas tiñan hábitos de consumo similares (Táboa 4.6.2), xa que mercaban principalmente en supermercados (83,8%), así como noutro tipo de tendas, como tendas especializadas (carnicería, froitería, etc.) ou mercados locais. Respecto dos factores que máis lles inflúen á hora de mercar, deuse un amplo abano de respostas, mais a maioría da xente pareceu estar preocupada pola calidade do produto, a súa orixe e a súa frescura, e aínda que o prezo tamén foi un factor importante, non se considerou tan importante como a calidade do produto. O consumo frecuente de produtos locais, de tempada, frescos e de baixo procesamento

USC COMPOSTELA

considérase un trazo característico da dieta tradicional galega, a denominada dieta atlántica [291].

**Táboa 4.6.2. Hábitos xerais de consumo.**

| **Tipo de establecemento onde merca habitualmente (o máis frecuente)** | **%** |
|---|---|
| Supermercado/Hipermercado | 83,8 |
| Tendas especializadas | 12,3 |
| Mercado local | 1,6 |
| Tendas de produtos ecolóxicos | 1,6 |
| Ultramarinos | 0,5 |
| Sen resposta | 0,3 |
| **Tipo de establecemento onde compras habitualmente (o 2º máis frecuente)** | |
| Supermercado/Hipermercado | 24,8 |
| Tendas especializadas | 39,4 |
| Mercado local | 12,0 |
| Tendas de produtos ecolóxicos | 5,7 |
| Ultramarinos | 5,2 |
| Sempre merco no mesmo tipo de establecemento | 12,3 |
| Auto-abastecemento | 0,3 |
| Sen resposta | 0,3 |
| **Factores que máis inflúen na compra dun produto?** [1] | |
| Calidade | 32,0 |
| Prezo | 20,7 |
| Produción local | 18,2 |
| Produto fresco | 17,7 |
| Produción sostible | 5,52 |
| Establecemento | 2,48 |
| Marca | 1,80 |
| Outros | 1,58 |
| **Como describiría a súa dieta?** [1] | |
| Intento comer todo de forma equilibrada | 57,4 |
| Busco alimentos con baixo contido de colesterol | 8,4 |
| Busco alimentos cun perfil de ácidos graxos saudable | 11,7 |
| Alto en proteínas | 6,5 |
| Baixo contido en sal | 9,3 |
| Dieta vexetariana | 1,8 |
| Inclúo prebióticos e probióticos na miña dieta | 2,1 |
| Outros | 2,8 |
| **Con que frecuencia consume carne?** | |
| Todos/case tódolos días | 17,5 |
| Dúas ou tres veces por semana | 58,7 |
| Unha vez á semana | 18,8 |
| Unha ou dúas veces ao mes | 2,9 |
| Menos dunha vez ao mes | 0,3 |
| Nunca | 1,8 |

[1] respostas múltiples

A maioría das persoas enquisadas afirmaron que levan unha dieta equilibrada, e unha proporción bastante elevada mostrou preocupación por consumir alimentos cun perfil de ácidos graxos saudable, baixo contido de colesterol ou baixo contido de sal. Algunhas persoas tamén teñen unha dieta rica en proteínas e só algunhas inclúen conscientemente prebióticos e probióticos na súa dieta. A dieta atlántica caracterízase tamén polo consumo moderado de carnes -especialmente de porco e vacún- entre outros produtos [291]. A maioría das persoas

enquisadas consumen carne dúas ou tres veces por semana, mentres que unha proporción substancial o fai todos os días ou case tódolos días. O baixo consumo de carne foi bastante frecuente, xa que case unha cuarta parte das persoas consume carne só unha vez á semana ou menos.

### 4.6.2. Perfil das persoas consumidoras de carne de coello

Segundo a frecuencia de consumo de carne de coello, os principais tipos de persoas consumidoras foron as esporádicas (41,3%), seguidas de preto polas habituais (38,6%). As persoas non consumidoras de carne de coello representaron o 18,0% e as vexetarianas representaron o 2,1% do total. En canto ás características socio-demográficas das persoas consumidoras de carne de coello (Figura 4.6.1), non se observaron diferenzas significativas en relación ao xénero nin ao nivel de ingresos. Non obstante, o consumo de carne de coello diferiu significativamente dependendo da idade das persoas ($p$ <0,001). Neste sentido, o consumo de carne de coello foi significativamente maior nas persoas maiores de 65 anos, mentres que tanto as persoas mozas (18-30) como as de mediana idade (31-64 anos) foron consumidoras predominantemente esporádicas. As persoas non consumidoras de carne de coello foron máis frecuentes no grupo de mediana idade que no grupo mozo, aínda que as vexetarianas foron predominantemente mozas. O consumo habitual de carne de coello foi máis frecuente nas persoas entre 31 e 64 anos que nas persoas máis novas. Como era de agardar, as persoas que consumían máis carne en xeral tamén consumían máis carne de coello ($p$ <0,001).

| Variable | N | % | Non consume | % Esporádico | % Habitual | % Vexetariano/a | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 383 | | 69 | 158 | 148 | 8 | |
| **Xénero** | | | | | | | NS |
| Muller | 209 | 19,6 | | 37,3 | 40,7 | 2,4 | |
| Home | 174 | 16,1 | | 46,0 | 36,2 | 1,7 | |
| **Idade (anos)** | | | | | | | ** |
| 18-30 | 53 | 15,1 | | 58,5 | 18,9 | 7,5 | |
| 31-64 | 225 | 20,4 | | 44,4 | 33,3 | 1,8 | |
| >65 | 105 | 14,3 | | 25,7 | 60,0 | 0,0 | |
| **Nivel de ingresos** | | | | | | | NS |
| Ata 999 | 24 | 25,0 | | 33,3 | 41,7 | 0,0 | |
| 1000 a 1499 | 73 | 17,8 | | 38,4 | 42,5 | 1,4 | |
| 1500 a 1999 | 60 | 20,0 | | 31,7 | 45,0 | 3,3 | |
| 2000 a 2499 | 80 | 21,3 | | 43,8 | 31,3 | 3,8 | |
| 2500 a 2999 | 39 | 10,3 | | 48,7 | 38,5 | 2,6 | |
| 3000 ou máis | 100 | 15,0 | | 49,0 | 35,0 | 1,0 | |
| NC | 7 | 28,6 | | 0,0 | 71,4 | 0,0 | |
| **Frecuencia de consumo de carne** | | | | | | | ** |
| Todos/case tódolos días | 67 | 6,0 | | 52,2 | 41,8 | 0,0 | |
| 2-3 veces á semana | 225 | 19,1 | | 40,4 | 40,4 | 0,0 | |
| 1 vez á semana | 72 | 22,2 | | 40,3 | 37,5 | 0,0 | |
| 1-2 veces ao mes | 11 | 54,5 | | 27,3 | 18,2 | 0,0 | |
| Nunca ou <1/mes | 8 | 25,0 | | 0,0 | 0,0 | 75,0 | |
| **Lugar de compra de carne de coello[1]** | | | | | | | ** |
| Supermercado | 117 | | | 47,9 | 52,1 | | |
| Criado en casa | 104 | | | 51,9 | 48,1 | | |
| Carnicería | 40 | | | 40,0 | 60,0 | | |
| Non merca | 21 | | | 95,2 | 4,8 | | |
| Mercado local | 15 | | | 60,0 | 40,0 | | |
| Outros | 9 | | | 50,0 | 50,0 | | |

**Figura 4.6.1. Perfil das persoas consumidoras de carne de coello tendo en conta diferentes variables socio-demográficas e hábitos de consumo.**
[1] só consumidoras de carne de coello

En canto ao lugar de compra máis frecuente de carne de coello (Figura 4.6.1), tanto as consumidoras esporádicas como as habituais presentaban preferencias diferentes ($p$ <0,001), que axudan a explicar os distintos tipos de consumo. Os supermercados foron o lugar de compra máis habitual en ambos os grupos, seguidos a certa distancia polas carnicerías, ou outros lugares como mercados locais. Non obstante, un terzo das persoas consumidoras de carne de coello non merca carne de coello, senón que cría os coellos na casa (ou a familia). Este tipo de consumo foi parecido en todas as franxas de idade, e non estivo directamente vinculado a persoas maiores como cabería esperar. En cambio, indica que case un terzo das persoas mozas consumidoras de carne de coello depende do abastecemento por parte da súa familia e non está afeita a mercar esta carne nos supermercados. Algunhas persoas consumidoras esporádicas non mercan carne de coello, e probablemente a consuman nas comidas familiares, nos restaurantes ou só cando a carne se recibe como agasallo.

A frecuencia de consumo de carne de coello determinada no presente estudo diferiu da reportada para o conxunto de España, xa que o non consumo e o consumo habitual de carne de coello foron menos frecuentes, mentres que unha maior proporción da poboación consumiu a carne de forma esporádica. Escriba-Pérez *et al* [292] estudou o consumo de diferentes tipos de carne en España (en todo o territorio nacional) entre a poboación consumidora de carne (entre 25 e 75 anos) e observou que o 34,6% destas persoas non consumía carne de coello, mentres que as que o facían de forma habitual supoñían preto do 50% da poboación. Outro estudo realizado en España [293] obtivo proporcións similares de consumo de carne de coello (38% non consumo, 49% consumo habitual). Non obstante, ambos os estudos incluíron todo o territorio de España, que é moi diverso e, polo tanto, espéranse algunhas diferenzas nos resultados. Lugo é un concello pequeno (aprox. 100.000 habitantes), como moitos outros de Galicia e España (o 58% das cidades de España teñen menos de 100.000 habitantes [294]), que seguen moi vinculados ao medio rural e, polo tanto, aos sistemas de produción gandeira. Este feito podería afectar aos hábitos de consumo e podería explicar a maior proporción de consumo de carne de coello.

Noutros países mediterráneos como Italia, onde a carne de coello forma parte da tradición gastronómica, o consumo foi similar ao de toda España, xa que ao redor do 30% da poboación non consume esta carne, mentres que o 38% o fai de forma habitual [26]. En Francia reportáronse taxas de consumo similares ás obtidas no presente estudo [295], xa que só o 20% da poboación era non consumidora de carne de coello. Noutros países como Romanía [296] e Hungría [297], o consumo foi baixo e maioritariamente esporádico. En España e na maioría dos países mencionados, o consumo de carne de coello foi maior nas persoas de mediana idade ou na idade avanzada que nas persoas máis novas [25,292].

O lugar de compra de carne de coello varía moito entre países e rexións: os supermercados son preferidos en países como Italia [26] ou Romanía [296], mentres que en Hungría a maioría das persoas consumidoras mercan a carne directamente nas granxas ou producen a carne persoalmente [297]. En España, a maioría das persoas consumidoras de carne de coello mercan esta carne en carnicerías locais (46,6%) ou en supermercados (33,3%), mentres que as persoas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

que crían coellos ou compran a carne directamente nas granxas só representan o 4,8% [293], aínda que nalgúns casos as carnicerías teñen tamén producións propias desta carne. No noso estudo foi notable o número de consumidores de carne de coello cuxas familias aínda crían coellos, polo que a dispoñibilidade de carne é moi importante para o mantemento do seu consumo. A agricultura familiar é moi importante en Galicia -a rexión de España con maior superficie de espazos de agricultura familiar [298]- que xera unha economía alternativa e un consumo doméstico que pode non estar contemplada nos indicadores oficiais desta carne e probablemente doutras. É probable que este tipo de abastecemento dalgúns produtos como a carne de coello se produza tamén noutros pequenos concellos similares de Galicia e de España, cuxo estreito contacto co medio rural pode favorecer o consumo deste tipo de carne.

Estes resultados mostran a importancia das redes informais de distribución de alimentos producidas por familiares maiores que viven no rural e que proporcionan alimentos aos seus descendentes que viven na cidade [141], tanto no relativo á carne de coello como tamén a vexetais. Unha alta proporción da poboación depende do aporte de carne de coello da súa familia e consume habitualmente carne de coello. Polo tanto, parece haber unha oportunidade para atraer aos consumidores deste nicho, para que no caso de que no futuro deixen de ter esta oferta familiar poidan mercar un produto de alta calidade que lles permita manter o seu consumo de carne de coello.

### 4.6.3. Características positivas e negativas da carne de coello

Cando se lles preguntou ás persoas enquisadas que características positivas e negativas da carne de coello destacarían (Figura 4.6.2), a maioría delas pareceu ter unha imaxe moi positiva deste produto. En canto aos atributos positivos, a metade delas destacou o seu valor nutricional (ácidos graxos saudables, proteínas de boa calidade, antioxidantes, baixo contido de colesterol, etc.), e máis dun terzo destacou o seu sabor e textura; aínda que algúns declararon que non destacarían ningún aspecto positivo, o que pode estar relacionado coa falta de información sobre as súas propiedades. No caso das propiedades negativas, a metade respondeu que non destacaría ningunha propiedade negativa da carne de coello, aínda que a outra metade mencionou algúns atributos como a percepción dos coellos como mascotas, as dificultades para preparar a carne por descoñecemento de como cociñala ou por falta de tempo, o seu sabor, o seu aspecto ou o formato de presentación, a textura e o prezo.

A percepción da carne de coello diferiu significativamente entre os tipos de consumo desta carne (Figura 4.6.2). A maioría das persoas consumidoras habituais e esporádicas apreciaron o valor nutricional e o sabor da carne de coello, mentres que a maioría do grupo que non a consume non destacou ningunha propiedade positiva da carne. O mesmo se aplica ás propiedades negativas, xa que a maioría das persoas consumidoras habituais non destacou ningunha, mentres que algunhas esporádicas considerou que o coello é unha mascota, non sabían como preparar a carne ou non lles gustaba a súa textura. Moitas persoas non

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

consumidoras consideraron tamén que o coello é unha mascota, aínda que outras non destacaron ningunha característica negativa ou non lles gusta o sabor intenso da carne.

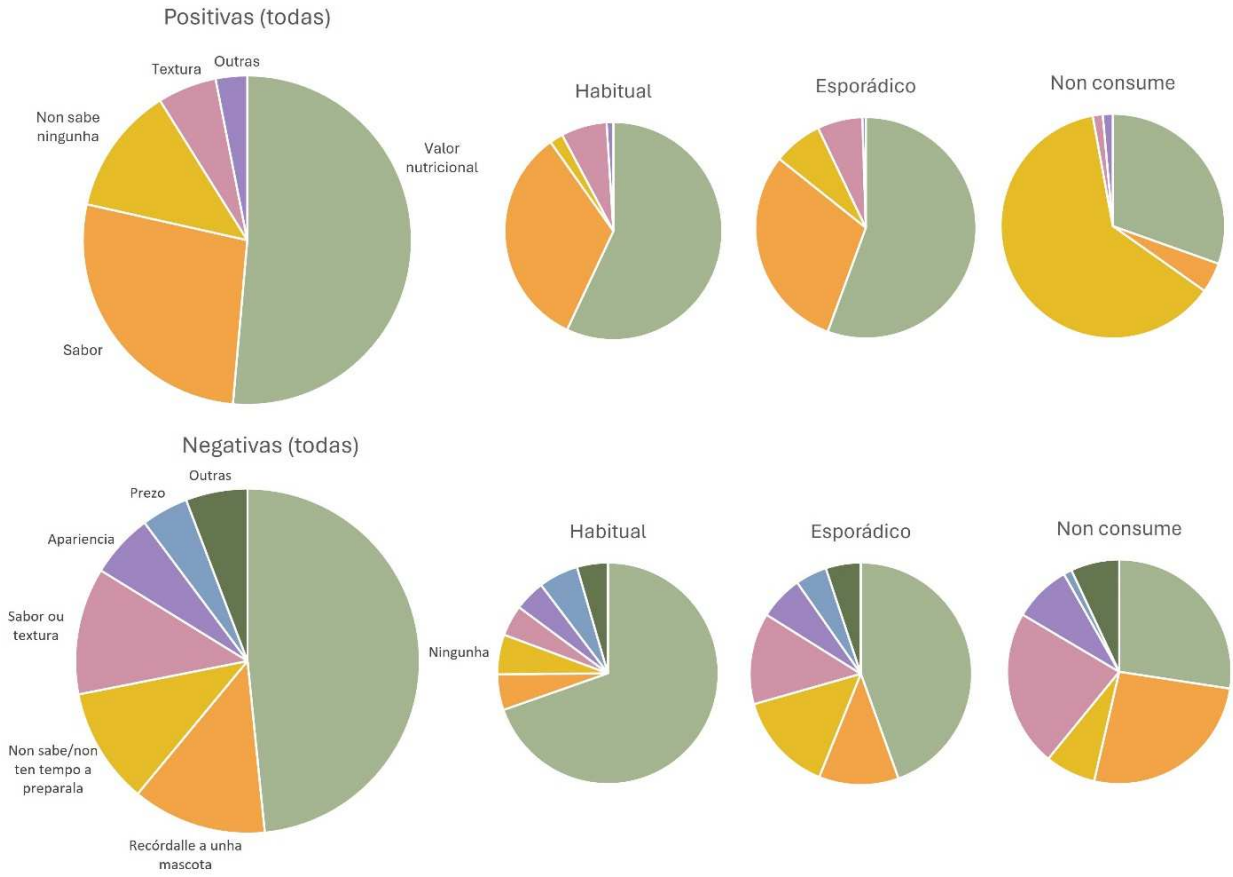



**Figura 4.6.2. Características positivas e negativas da carne de coello destacadas por todas as persoas enquisadas e por frecuencias de consumo de carne de coello.**

Estes resultados coinciden cos de enquisas anteriores realizadas en España e noutros países europeos, onde a carne de coello é considerada unha carne sa, baixa en graxa e saborosa [293,294,296], aínda que en estudos anteriores tamén se observou unha falta de información sobre as propiedades nutricionais da carne de coello [25,27]. A promoción do valor nutricional da carne foi xa proposto en numerosas ocasións para potenciar o seu consumo [1,3,27,299], non só entre as persoas conscientes da súa saúde e aquelas que precisan manter unha dieta baixa en sodio ou colesterol, senón entre todas as persoas consumidoras de carne en xeral.

Aínda que a metade das persoas enquisadas non destacou ningún atributo negativo da carne de coello, a outra metade mencionou varias desvantaxes desta carne. Unha alta proporción da xente considera aos coellos como animais de compañía e non como animais de produción de carne, como xa se observou anteriormente en España [28,293,300] e noutros países [1,25–27,295]. É improbable que este grupo de persoas vaia consumir carne de coello xa que xa non forma parte da súa dieta habitual. O sabor é outra barreira para o consumo de carne de coello, xa que algunhas persoas consideran que o seu sabor intenso é unha característica negativa máis que positiva [3]. Estes puntos de vista opostos xa foron observados en España [293,294] e

invitan a considerar a posibilidade de elaborar preparados nos que este sabor intenso estea oculto ou menos predominante, para que máis xente coma esta carne. Outros obstáculos para o seu consumo son a falta de coñecemento de como cociñalo ou a falta de tempo necesario para facelo, así como a presentación ou o formato no que se vende esta carne. Estes problemas tamén se observaron en estudos anteriores [25,26,28], xa que a carne de coello adoita venderse como unha peza enteira, xeralmente coa cabeza incluída [3]. Este tipo de presentación está relacionada coa elaboración tradicional da carne de coello e asociada a comidas sociais ou familiares e a longos tempos de cocción [3]; o cal é contrario ás formas modernas de cociñar, que buscan preparacións rápidas e fáciles, adaptadas á vida cotiá [25]. O feito de que a canal adoite venderse coa cabeza tamén é un factor desagradable para moitas persoas [1]. En España e outros países [1] xa se comezaron a desenvolver algunhas actuacións que se poden levar a cabo para solucionar estes problemas [28,300] co fin de ofrecer unha variedade máis ampla de produtos de carne de coello mellor adaptados ás actuais formas de consumo: porcións máis pequenas da canal que non precisen moito tempo de cociñado e outros produtos innovadores [1,27].

En resumo, as persoas habitantes deste concello parecen ter unha imaxe bastante positiva da carne de coello, o que pode estar relacionado co feito de que unha meirande parte da poboación teña vínculos estreitos coas zonas rurais onde os coellos son criados, ou mesmo estes son criados pola súa propia familia ou persoas achegadas [141]. Estes achados están de acordo coas conclusións de Montero-Vicente et al. [294], quen observou que as persoas que viven en cidades de España de ata 100.000 habitantes tiñan unha imaxe moito máis positiva da carne de coello que as que viven en cidades máis grandes. Estes resultados poden indicar que as cidades máis pequenas e os concellos con estreitos vínculos coas zonas rurais poderían considerarse rexións obxectivo para a promoción do consumo de carne de coello.

### 4.6.4. Consumo de algas

As persoas enquisadas clasificáronse en tres grupos en relación co consumo de algas (Figura 4.6.3). A maioría delas declararon non consumir nunca algas, mentres que un terzo as consumía esporádicamente e moi poucas persoas as consumían regularmente. As diferenzas no consumo de algas non estiveron relacionadas co xénero das persoas, pero si se observaron algunhas diferenzas significativas en canto á súa idade ($p$ <0,001). Tanto as persoas mozas como as de mediana idade mostraron patróns similares de consumo de algas, mentres que a maioría das persoas maiores de 65 anos foron non consumidoras. Ademais, a maioría das enquisadas que destacaron propiedades positivas das algas consumían algas de forma esporádica ou regular, mentres que as que non destacaron propiedades positivas das algas foron maioritariamente non consumidoras ou consumidoras esporádicas deste produto.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

| Variable | N | % Non consume | % Esporádico | % Habitual | p |
|---|---|---|---|---|---|
| N | 383 | 230 | 137 | 16 | |
| Xénero | | | | | NS |
| Muller | 209 | 62,2 | 33,5 | 4,3 | |
| Home | 174 | 57,5 | 38,5 | 4,0 | |
| Idade (anos) | | | | | ** |
| 18-30 | 53 | 52,8 | 43,4 | 3,8 | |
| 31-64 | 225 | 52,9 | 42,2 | 4,9 | |
| >65 | 105 | 79,0 | 18,1 | 2,9 | |
| Destaca propiedades positivas das algas | | | | | ** |
| Non | 167 | 88,0 | 12,0 | 0,0 | |
| Si | 216 | 38,4 | 54,2 | 7,4 | |

**Figura 4.6.3. Perfil das persoas consumidoras de algas en relación a diferentes variables.**

Cando as persoas enquisadas seleccionaron os aspectos positivos e negativos que destacarían das algas (Figura 4.6.4), observáronse algunhas barreiras para o seu consumo. En canto aos aspectos positivos, moitas persoas non coñecían ningún, o que indica a falta de información sobre estes novos produtos entre a poboación consumidora. Ao mesmo tempo, case a metade destacou o valor nutricional das algas, incluíndo o alto contido en ácidos graxos saudables, minerais, fibra dietética e antioxidantes, así como os seus efectos prebióticos, o que indica que aquelas persoas que si consumen algas probablemente sexan conscientes dos beneficios para a saúde asociados ao seu consumo (Fig. 4.6.3). Só algunhas persoas destacaron o sabor, o que pode indicar que parte das persoas consumirían algas polos beneficios para a saúde en lugar de porque lles guste especialmente o sabor. En estudos anteriores observouse que as características saudables e nutritivas eran os motivos máis importantes para consumir algas [301] e, polo tanto, que a promoción destes atributos era a clave para atraer novas persoas consumidoras [302].

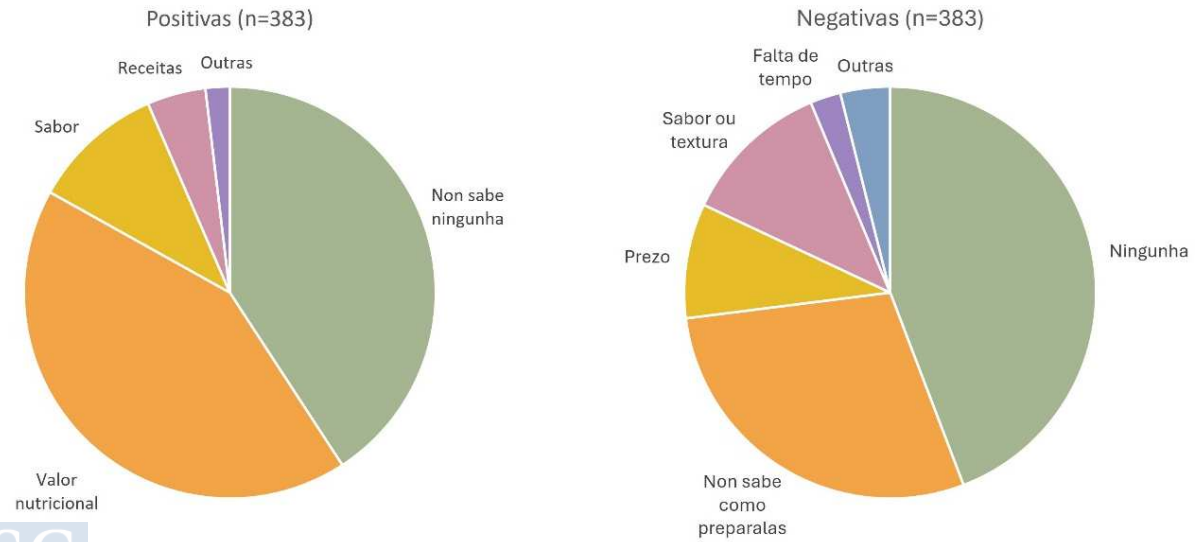



**Figura 4.6.4. Aspectos positivos e negativos destacados das algas.**

Case a metade das persoas enquisadas non destacou ningún aspecto negativo das algas, o que indica que non existe unha percepción negativa xeral sobre este produto. Entre os aspectos negativos, algunhas persoas destacaron o prezo, o sabor e a textura. O aspecto negativo máis destacable foi que moitas persoas non sabían como cociñar as algas, o que indica unha falta de información entre persoas que poderían estar dispostas a consumir este produto pero non teñen información suficiente para facelo; e tamén indica que hai moitas persoas potencialmente consumidoras de algas. Entre este grupo de persoas, é probable que moitas delas só consuman algas fóra das súas casas. De feito, a maioría das persoas que consumían algas declararon que o facían en restaurantes ou outros establecementos (ou as encargaban na casa), mentres que só un terzo as cociñaba na casa e, polo tanto, tiña o coñecemento necesario.

A maioría das persoas enquisadas que nunca consumiran algas, en todos os grupos de idade, estarían dispostas a probar o produto (68%). Polo tanto, a percepción xeral das algas parece ser positiva, e a elevada vontade de probar o produto é relevante á hora de prever a disposición da poboación a probar outros produtos relacionados, como a carne de coello alimentada con algas.

### 4.6.5. Disposición a consumir carne de coello alimentada con algas

A maioría das persoas enquisadas (66%) afirmaron que estarían dispostas a mercar carne de coello alimentada con algas, elixíndoa fronte a outros produtos similares de carne de coello (Figura 4.6.5), mentres que unha cuarta parte non se vería influenciada por esta diferenza e só unha pequena proporción non escollería este produto. Esta tendencia non se viu influenciada pola idade nin o xénero, mentres que si se observaron algunhas diferenzas significativas en canto á frecuencia de consumo de carne de coello. A maioría das persoas que mercarían este produto foron consumidoras esporádicas de carne de coello, seguidas das consumidoras habituais, que foron máis reticentes a facelo. Sorprendentemente, case a metade das persoas que non consumen carne de coello si que escollería este produto, o que é importante xa que iso podería aumentar o consumo desta carne. O lugar de compra da carne de coello non pareceu influír na decisión das persoas (só considerando aquelas consumidoras de carne de coello), o que podería indicar que as persoas que crían coellos tamén mercarían esta carne se non tivesen esta vía de abastecemento. O consumo de algas por parte das persoas enquisadas non influíu na súa decisión, mais si que se observou unha diferenza significativa entre as que destacaron propiedades positivas das algas e as que non o fixeron. Unha imaxe positiva das algas parece ser un factor que aumenta a vontade das persoas a mercar este produto, aínda que non consuman algas. Este feito é importante xa que ofrece unha oportunidade para salientar os beneficios das algas e mellorar así a aceptación dos produtos asociados a estes novos ingredientes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

| Variable | N | % Si | % Non influiría | % Non | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 383 | 252 | 101 | 30 | |
| **Xénero** | | | | | |
| Muller | | 67,5 | 23,4 | 9,1 | NS |
| Home | | 63,8 | 29,9 | 6,3 | |
| **Idade (anos)** | | | | | NS |
| 18-30 | 53 | 66,0 | 32,1 | 1,9 | |
| 31-64 | 225 | 67,1 | 24,4 | 8,4 | |
| >65 | 105 | 62,9 | 27,6 | 9,5 | |
| **Frecuencia de consumo de carne de coello** | | | | | ** |
| Non consume | 69 | 46,4 | 30,4 | 23,2 | |
| Esporadicamente | 158 | 75,9 | 21,5 | 2,5 | |
| Habitualmente | 148 | 65,5 | 29,1 | 5,4 | |
| Vexetariano/a | 8 | 37,5 | 37,5 | 25 | |
| **Lugar de compra de carne de coello[1]** | | | | | NS |
| Supermercado | 117 | 70,9 | 26,5 | 2,6 | |
| Criado en casa | 104 | 70,2 | 23,1 | 6,7 | |
| Carnicería | 40 | 72,5 | 27,5 | 0 | |
| Non merca | 21 | 66,7 | 28,6 | 4,8 | |
| Mercado local | 15 | 86,7 | 13,3 | 0 | |
| Outros | 9 | 55,6 | 33,3 | 11,1 | |
| **Tipo de consumo de algas** | | | | | NS |
| Non consume | 230 | 63,0 | 27,4 | 9,6 | |
| Esporadicamente | 137 | 68,6 | 26,3 | 5,1 | |
| Habitualmente | 16 | 81,3 | 12,5 | 6,3 | |
| **Coñece propiedades positivas das algas** | | | | | * |
| Si | 216 | 73,1 | 21,3 | 5,6 | |
| Non | 167 | 56,3 | 32,9 | 10,8 | |

**Figura 4.6.5. Se soubera que os coellos foron alimentados cunha dieta que incluíu algas, co obxectivo de reducir o uso de antibióticos, elixiría esta carne fronte a outros tipos de carne de coello?**
[1] Só persoas consumidoras de carne de coello (306 enquisadas)

Cando se lles preguntou ás persoas enquisadas se aumentarían o seu consumo de carne de coello se souberan que os coellos foron alimentados cunha dieta con algas mariñas, as respostas foron variables (Figura 4.6.6), xa que cada resposta foi dada por preto dun terzo das persoas. A análise das respostas en relación ás frecuencias de consumo de carne de coello mostrou que un terzo das consumidoras habituais e esporádicas comería máis carne de coello; mentres que entre as non consumidoras, máis da metade non o faría e ao redor dunha cuarta parte delas si que comería máis carne de coello se fose alimentada con algas (Figura 4.6.6). Estes resultados indican que o consumo de carne de coello aumentaría lixeiramente se os coellos fosen alimentados con esta dieta e se se explicase e comercializase adecuadamente o produto. En todo caso, este produto tería que ser probado antes de poder declarar que repetirían ou mesmo aumentarían o seu consumo de carne de coello.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

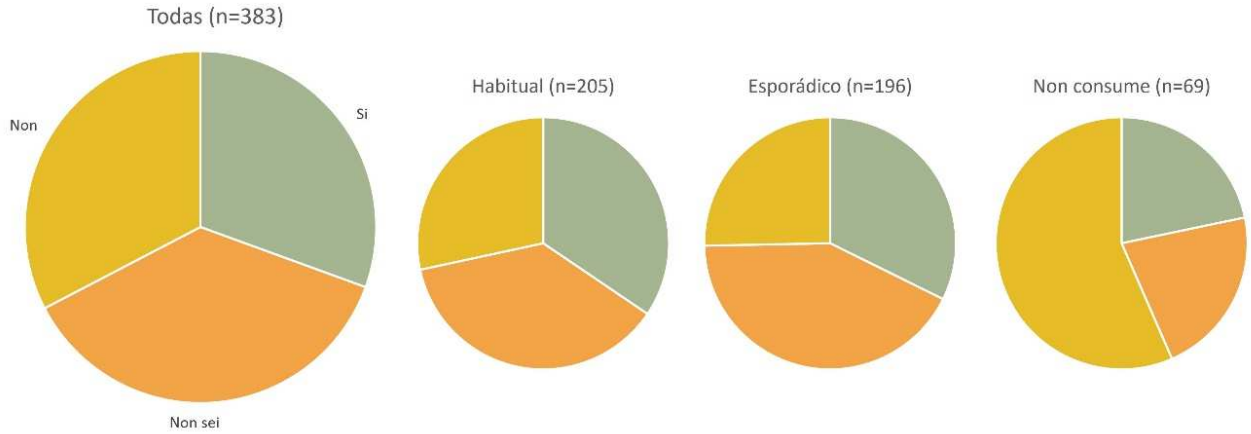



**Figura 4.6.6. Resposta á pregunta: se soubera que os coellos foron alimentados cunha dieta que inclúe algas mariñas, comería máis carne de coello?**

Para obter máis información sobre a vontade de elixir este produto fronte a outros produtos de carne de coello, preguntouse ás persoas enquisadas que responderan que non o elixirían cales eran as súas razóns (Táboa 4.6.3). Moitas delas non o elixirían xa que non consumen carne de coello con frecuencia ou porque non comen carne. Algunhas persoas consideraban que non era unha dieta axeitada para os coellos, xa que debían alimentarse de forma "natural", e outras desconfiaban dos efectos beneficiosos desta estratexia de alimentación ou dos pensos industriais en xeral.

**Táboa 4.6.3. Pregunta aberta: por que non elixiría mercar carne de coello alimentada con algas? (%).**

| Razóns para non elixir carne de coello alimentada con algas | % |
|---|---|
| Non come carne de coello | 43,3 |
| Non é unha dieta adecuada para os coellos | 20,0 |
| Desconfianza dos efectos beneficiosos da dieta | 13,3 |
| Desconfianza da carne de coello por enfermidades | 6,67 |
| Desconfianza dos pensos industriais | 6,67 |
| Non lle gustan as algas | 3,33 |
| N/C | 6,67 |

n=30

Tamén se lles preguntou por que non comerían máis carne de coello, sabendo que foi alimentado con algas (Táboa 4.6.4). Para un terzo das persoas, a razón foi só que non lles gustaba a carne de coello ou que non a consumían. Outras persoas non se verían influenciadas por esta estratexia ou consideraron que xa comen suficiente carne de coello. Outras explicaron que preferían o "coello criado na casa" ou o coello alimentado de xeito "tradicional", cunha dieta a base de verduras; e que non lles gustaba a carne que se vende nos supermercados (xeralmente criada de forma intensiva).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Táboa 4.6.4. Respostas á pregunta aberta: "Por que non consumiría máis carne de coello se soubera que os coellos foron alimentados con algas?"**

| Motivos para non consumir máis carne de coello | % |
|---|---|
| Non lle gusta | 20,0 |
| Non come carne de coello | 12,8 |
| Non lle influiría | 12,8 |
| Xa come suficiente | 12,0 |
| Consume só coello de produción propia | 8,0 |
| Falta de hábito | 8,0 |
| Considera que non é unha dieta adecuada para os coellos | 6,4 |
| Non ten información suficiente | 4,0 |
| Considera o coello como unha mascota | 4,0 |
| Difícil de cociñar | 2,4 |
| Prezo | 2,4 |
| Non sabe | 3,2 |
| Outras razóns | 4,0 |

n = 125

En canto ás estratexias de alimentación, moitas persoas diferenciaron entre dous tipos de produción de coellos e tiñan unha opinión clara sobre eles. Por unha banda, relacionaron a carne de coello que se vende nos supermercados con prácticas de cría intensiva nas que os coellos recibirían unha dieta baseada en pensos industriais e cun uso excesivo de antibióticos; e opinaron que esta carne era de baixa calidade e con pouco sabor. Por outra banda, a carne de coello mercada directamente nas granxas ou producida na propia casa ou pola familia foi asociada á cría "natural e tradicional", onde non se empregarían pensos industriais nin antibióticos e os coellos serían alimentados só con vexetais de orixe local. Este segundo tipo de produción produciría carne de coello de moi alta calidade e boas propiedades organolépticas, polo que foi a preferida por moita xente. Esta dicotomía xa foi observada en estudos anteriores [1,26,27], aínda que tamén se observaron certas contradicións, xa que as persoas tamén pensaban que a carne de coello vendida nos supermercados era máis segura que a carne de coello producida na casa [26]. Este estudo, realizado en Italia, concluíu que os consumidores estaban dispostos a pagar máis pola carne de coello producida sen o uso rutineiro de antibióticos [26], ao igual que no noso estudo. Outros estudos tamén declararon que este tipo de características da carne de coello non son visibles para as persoas consumidoras, polo que é fundamental incluír na etiqueta do produto información relativa ás estratexias de produción e alimentación, que podería influír na súa elección [26,27]. Sen embargo, é probable que a maioría das persoas teñan que probar primeiro esta carne e comprobar persoalmente os beneficios (ou polo menos as non desvantaxes) da súa calidade, para elixilo fronte a outros tipos de carne de coello.

Os nosos resultados indican que a poboación consumidora está preocupada polas estratexias de alimentación e o uso de antibióticos na produción de coellos. Outros estudos previos xa observaron que estes factores exercen unha forte influencia á hora de elixir o tipo de carne de coello mercado, tanto a produción sen o uso rutineiro de antibióticos [26,295] como os tipos de alimentación [25,27,295,296]. Estes estudos tamén sinalaron outros factores que inflúen nesta elección, como a orixe local da carne e a produción baixo criterios de benestar animal [1,25–27,303].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

En conxunto, estes resultados indican que a aceptación deste novo tipo de produtos dependerá en gran medida dos aspectos socioculturais da poboación, que inciden nas decisións en materia de alimentación [143]. Polo tanto, para que a promoción dos alimentos, neste caso da carne de coello, teña éxito, débense ter en conta todos estes factores e adaptarse á poboación destinataria.

### 4.6.6. Beneficios de incluír algas na alimentación do coello

Nesta enquisa preguntouse primeiro ás persoas enquisadas -a través dunha pregunta aberta- que beneficios consideraban que tería alimentar ós coellos con algas (Táboa 4.6.5). Aínda que case a metade das persoas non respondeu ou non coñecía ningún beneficio, moitas foron conscientes dos beneficios na redución do uso de antibióticos e sinalaron que esta estratexia podería ser máis saudable tanto para os coellos como para as persoas. Algunhas persoas afirmaron que a carne sería máis nutritiva e de maior calidade. Para outras persoas, sería unha oportunidade para revalorizar as algas como ingrediente local, facendo máis sostible a produción de carne de coello.

**Táboa 4.6.5. Respostas á pregunta aberta: que beneficios considera que tería incluír algas na dieta dos coellos?**

| Beneficios de incluír algas na dieta dos coellos | % |
|---|---|
| Non sabe | 21,9 |
| Redución do uso de antibióticos | 16,7 |
| Carne máis saudable | 11,3 |
| Maior calidade da carne | 5,48 |
| Máis sostible | 3,92 |
| Máis natural | 4,0 |
| Carne máis nutritiva | 2,61 |
| Ningún | 2,61 |
| Uso de produtos locais | 1,83 |
| Valorización de algas | 1,57 |
| Non ten información suficiente | 1,31 |
| Carne enriquecida con minerais | 1,04 |
| N/C | 25,8 |

n = 383

Tras esta pregunta aberta, volvéuselles preguntar sobre o seu grao de acordo con algunhas afirmacións relacionadas cos beneficios que tería a inclusión de algas na dieta dos coellos (Figura 4.6.7). Só unha pequena proporción das persoas estivo en desacordo coas afirmacións, mentres que a maioría da xente estivo de acordo ou tiña dúbidas. Entre os posibles beneficios desta estratexia, as persoas enquisadas coincidiron sobre todo nos beneficios ambientais, mentres que outros beneficios como a mellora na calidade da carne ou na saúde dos coellos non estiveron tan claros para moitas persoas. Estes achados non son sorprendentes xa que os beneficios ambientais son máis sinxelos de ver e de relacionar con esta estratexia de alimentación, xa que os consumidores xa están informados sobre a economía circular, a produción local de ingredientes ou a redución de antibióticos. Estes resultados son tamén valiosos xa que indican que é moi importante e necesario considerar outros posibles beneficios desta estratexia, que son máis difíciles de observar. Isto pódese extrapolar a calquera sistema

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de produción animal no que se poidan incluír algas, xa que o beneficio potencial para a saúde é aplicable a outras especies de produción e mesmo ás persoas, que se beneficiarían de incorporar estes ingredientes á súa propia dieta. Como as algas son un ingrediente relativamente novo na nosa cultura, é preciso realizar un esforzo para transmitir esta información a toda a sociedade.

Cando o nivel de acordo coas afirmacións foi relacionado coa vontade de escoller carne de coello alimentada con algas fronte a outros tipos de carne de coello (Figura 7), observáronse diferenzas significativas en todos os casos, como era de esperar. En xeral, aquelas persoas que si elixirían esta carne coincidiron máis coas afirmacións, xa que poderían ser máis sensibles a estas cuestións e estar máis convencidas desta estratexia. Pola contra, aquelas que non se verían influenciadas por esta estratexia de alimentación dubidaron máis sobre os seus beneficios. As persoas que non elixirían este produto estaban máis en desacordo coas afirmacións que os demais grupos, aínda que a maioría estaba de acordo ou tiña dúbidas.

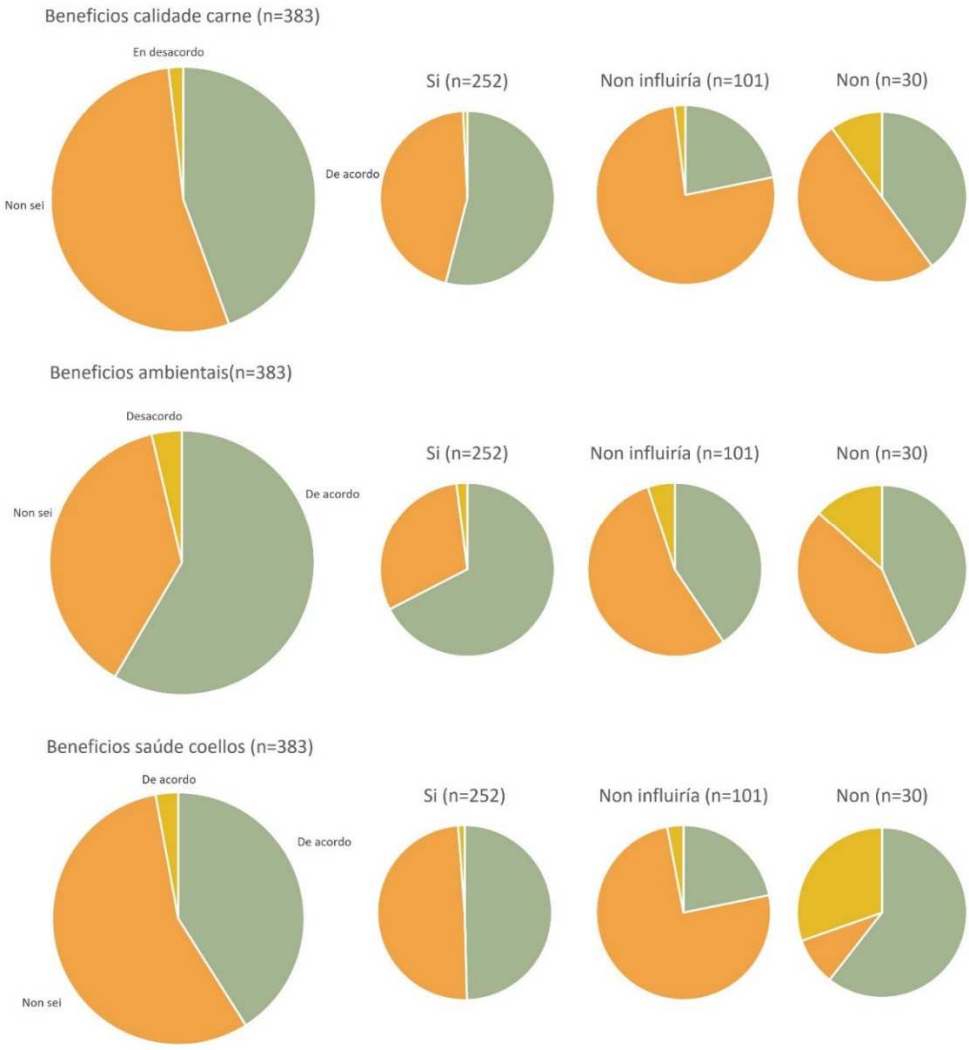



**Figura 4.6.7. Grao de acordo das persoas enquisadas coas seguintes afirmacións: A inclusión de algas na dieta dos coellos 1) melloraría a calidade da carne 2) aportaría beneficios ambientais 3) melloraría a saúde do coello; e respostas ás afirmacións relacionadas coa disposición de escoller carne de coello alimentada con algas fronte a outros tipos de carne de coello.**

# 5. CONCLUSIÓNS

**C1.** As macroalgas deshidratadas analizadas destacaron polo seu elevado contido en minerais e en fibra dietética, de especial interese polos altos niveis de fibra soluble. Os métodos estándar empregados para caracterizar os tipos de fibra nas plantas terrestres non permiten realizar unha cuantificación precisa da composición dos produtos de macroalgas. A dixestibilidade *in vitro* da MS das macroalgas deshidratadas foi elevada, na maioría dos casos similar á da polpa de remolacha. En cambio, a dixestibilidade *in vitro* da PB foi menor nas macroalgas ca na polpa de remolacha. Pola contra, ambos tipos de extractos mostraron unha moi elevada dixestibilidade *in vitro* da MS e da PB, superior á da polpa de remolacha. Os resultados das CMI non indicaron ningunha inhibición clara dos patóxenos probados por parte dos produtos de macroalgas, polo que as macroalgas analizadas parecen ter un efecto potencialmente prebiótico, en lugar dunha actividade antimicrobiana directa.

**C2.** As macroalgas pardas *S. latissima* e *H. elongata* foron as especies que presentaron os mellores resultados *in vitro*. Todos os produtos de *S. latissima* mostraron unha elevada fermentabilidade, similar ou superior á da polpa de remolacha, especialmente nos extractos, o que podería estar relacionado co seu alto contido en laminarina e alxinato. Estes produtos tamén mostraron unha produción total de AGV similar á da polpa de remolacha, polo que presentan un potencial efecto prebiótico. A fermentación do extracto acuoso de *H. elongata* produciu elevadas cantidades de butirato, maiores que as da polpa de remolacha ou as demais macroalgas. Este resultado é de interese polos potenciais beneficios que proporciona o butirato sobre a saúde intestinal.

**C3.** As macroalgas deshidratadas presentaron un contido elevado en numerosos macrominerais, tal como Ca, K e Na, mentres que o contido en P foi baixo. *Ulva* spp. presentou niveis destacables de Mg e S. As concentracións de elementos traza esenciais foron máis variables entre especies, aínda que algunhas delas (*F. vesiculosus, M. stellatus*) presentaron niveis elevados de Fe e Mn. Todas as macroalgas analizadas mostraron niveis excepcionalmente altos de I, especialmente *S. latissima* e *L. ochroleuca*. As macroalgas pardas presentaron niveis elevados de As, pero baixos no resto de elementos potencialmente tóxicos. O proceso de extración incrementou os niveis de macrominerais pero reduciu os dos elementos traza esenciais e potencialmente tóxicos, mentres que aumentou o contido de I.

**C4**. A maior parte do As contido nas macroalgas estivo composto de As orgánico de baixa toxicidade, mentres que o iAs apareceu en moi baixas concentracións, o cal non suporía un risco para o animal.

**C5.** As concentracións da maioría dos macrominerais foron polo menos unha orde de magnitude maiores que as da maioría dos cereais e leguminosas empregados en alimentación animal, mentres que as concentracións de elementos traza esenciais foron similares a estes ingredientes. Os niveis de I contidos na maioría das macroalgas non son comparables a ningún outro ingrediente empregado nas dietas animais. As macroalgas e os seus extractos serían por tanto

UVigo UNIVERSIDADE DE VIGO

unha excelente fonte de macrominerais, especialmente de I, a cal sería sostible e economicamente viable.

**C6.** O contido de I das macroalgas sería a principal limitación á hora de incluílas nas dietas animais, especialmente no caso de *S. latissima* e *L. ochroleuca*. No caso dos extractos, os niveis de inclusión serían algo máis baixos que os das macroalgas deshidratadas. Se ben é importante axustar sempre estas doses, todos os produtos poderían ser aportados ás concentracións habituais empregadas en nutrición animal (<2%).

**C7.** A adición dos produtos de macroalgas (*S. latissima* e *Ulva* spp.) ás dietas dos coellos non empeorou os parámetros produtivos nin a mortalidade dos animais, e incluso melloraron o índice de conversión, o que podería estar relacionado cunha mellora da dixestibilidade.

**C8.** Os coellos alimentados con *S. latissima* deshidratada mostraron menores recontos de coccidios e maior altura de vilosidades, que xunto cos resultados derivados das probas en granxa experimental parecen indicar que certos polisacáridos contidos nesta macroalga poderían influír positivamente sobre a saúde intestinal dos animais, ao mellorar a dixestibilidade e modular o microbioma intestinal. Non se observaron efectos positivos das macroalgas en relación á concentración de mucina ileal ou á expresión de xenes relacionados coa inmunidade. Por outra banda, os animais alimentados con *S. latissima* e co extracto de *Ulva* spp. mostraron unha redución na expresión do filo TM7, relacionado coa inflamación; e por tanto poderían contribuír a reducir a aparición de procesos inflamatorios a nivel intestinal. Ademais, os animais alimentados con *Ulva* spp. deshidratada mostraron unha maior expresión de certas proteínas de unión estreita dos enterocitos, asociadas a unha mellora da función de barreira do intestino; aínda que mostraron peores resultados en canto ao reconto de coccidios e a morfoloxía das mucosas.

**C9.** A adición de 1,025% de extracto de *Ulva* spp. ás dietas dos coellos modificou positivamente o perfil de ácidos graxos da carne, ao incrementar a proporción de MUFAs e SFAs; o que podería estar relacionado con cambios na produción de SCFA por parte da microbiota.

**C10.** A inclusión dos produtos de macroalgas non afectou negativamente ás propiedades sensoriais da carne, polo que o seu uso non afectaría á aceptación do produto por parte das persoas consumidoras. De feito, a suplementación con *S. latissima* e *H. elongata* mellorou algúns parámetros sensoriais como o sabor e a zumarencia da carne. A adición destes ingredientes sostibles á dieta dos coellos podería facer desta carne un produto máis atractivo para persoas consumidoras responsables co medio ambiente.

**C11.** A adición dun 1,025% das macroalgas estudadas produciu cambios significativos nas concentracións de I e As tanto na carne como nas vísceras. A ausencia de interaccións significativas con outros micronutrientes, especialmente o Se, suxire que a incorporación de macroalgas nas dietas animais nas concentracións probadas non restrinxe o contido mineral dos tecidos. A aparente mellora da biodispoñibilidade dalgúns elementos como o P e o Fe podería aportar certos beneficios e debería ser considerada á hora de formular as dietas animais, de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

forma que se puidera reducir potencialmente a necesidade de empregar suplementos minerais e por tanto mitigar o seu impacto ambiental, especialmente no que respecta á utilización do P.

**C12.** O importante aumento nos niveis de I nos tecidos, dependente da dose, é prometedor especialmente nas rexións con deficiencia endémica deste mineral.

**C13.** Se ben a deposición de As por riba dos niveis do grupo control podería ser motivo de preocupación, é importante ter en conta que os residuos observados nos coellos suplementados con macroalgas seguen sendo relativamente baixos, comparables aos que se atopan en carnes alimentadas de xeito convencional, e notablemente máis baixos que noutras fontes de alimentos.

**C14**. Os principais tipos de persoas consumidoras de carne de coello foron as esporádicas, seguidas de preto polas habituais; mentres que as non consumidoras representaron sobre un quinto da poboación. O consumo de carne de coello no concello de Lugo parece atoparse en mellor situación que noutras zonas. Unha importante parte da poboación consume carne de coello criado na casa ou pola súa familia achegada, o cal mostra a importancia das redes informais de distribución de alimentos producidos de forma tradicional. Existe unha percepción positiva sobre a carne de coello por parte da meirande parte da poboación, destacando o seu valor nutricional e o seu sabor. Tamén houbo unha parte da poboación que considera os coellos como mascotas ou non a consume por diferentes barreiras.

**C15.** A maior parte das persoas enquisadas afirmaron que elixirían a carne de coello alimentada con algas fronte a outros produtos similares de carne de coello; mentres que un terzo delas aumentarían o seu consumo desta carne se fose alimentada deste xeito. Para garantir o éxito deste tipo de produtos no mercado é necesario realizar un importante esforzo de comunicación dos seus beneficios.

**C16.** A poboación mostrouse interesada e preocupada polas estratexias de alimentación dos animais de produción e o uso de antibióticos neste eido. A maior parte das persoas enquisadas estivo de acordo con que esta estratexia de alimentación aportaría múltiples beneficios medioambientais, e por tanto podería ser potencialmente empregada como estratexia de "marketing" para incrementar o consumo de carne de coello nesta poboación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# BIBLIOGRAFÍA


1. Petracci, M.; Soglia, F.; Leroy, F. Rabbit Meat in Need of a Hat-Trick: From Tradition to Innovation (and Back). *Meat Sci* **2018**, *146*, 93–100, doi:10.1016/j.meatsci.2018.08.003.
2. FAOSTAT: The Statistics Division of the FAO.
3. Cullere, M.; Dalle Zotte, A. Rabbit Meat Production and Consumption: State of Knowledge and Future Perspectives. *Meat Sci* **2018**, *143*, 137–146, doi:10.1016/j.meatsci.2018.04.029.
4. Trocino, A.; Cotozzolo, E.; Zomeño, C.; Petracci, M.; Xiccato, G.; Castellini, C. Rabbit Production and Science: The World and Italian Scenarios from 1998 to 2018. *Ital J Anim Sci* **2019**, *18*, 1361–1371, doi:10.1080/1828051X.2019.1662739.
5. Carabaño, R.; Piquer, J. The Digestive System of the Rabbit. In *The Nutrition of the Rabbit*; de Blas, C., Wiseman, J., Eds.; CABI Publishing : London, 1998.
6. Al-Soufi; Sevilla L; García J; López-Alonso M; Cegarra E *Cuninews*. February 6 2023,.
7. Dalle Zotte, A.; Szendro, Z. The Role of Rabbit Meat as Functional Food. *Meat Sci* **2011**, *88*, 319–331, doi:10.1016/j.meatsci.2011.02.017.
8. Dalle Zotte, A. Perception of Rabbit Meat Quality and Major Factors Influencing the Rabbit Carcass and Meat Quality. *Livest Prod Sci* **2002**, *75*, 11–32.
9. Cesari, V.; Zucali, M.; Bava, L.; Gislon, G.; Tamburini, A.; Toschi, I. Environmental Impact of Rabbit Meat: The Effect of Production Efficiency. *Meat Sci* **2018**, *145*, 447–454, doi:10.1016/j.meatsci.2018.07.011.
10. Fortun-Lamothe, L.; Boullier, S. A Review on the Interactions between Gut Microflora and Digestive Mucosal Immunity. Possible Ways to Improve the Health of Rabbits. *Livest Sci* **2007**, *107*, 1–18, doi:10.1016/j.livsci.2006.09.005.
11. Gidenne, T.; Fortun-Lamothe, L. Feeding Strategy for Young Rabbits around Weaning: A Review of Digestive Capacity and Nutritional Needs. *Animal Science* **2002**, *75*, 169–184, doi:10.1017/s1357729800052942.
12. Combes, S.; Michelland, R.J.; Monteils, V.; Cauquil, L.; Soulié, V.; Tran, N.U.; Gidenne, T.; Fortun-Lamothe, L. Postnatal Development of the Rabbit Caecal Microbiota Composition and Activity. *FEMS Microbiol Ecol* **2011**, *77*, 680–689, doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01148.x.
13. Rees Davies, R.; Rees Davies, J.A.E. Rabbit Gastrointestinal Physiology. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* **2003**, *6*, 139–153, doi:10.1016/S1094-9194(02)00024-5.
14. Lesbouyries, M.M.; Berthelon, M. Entero-Toxemie Du Lapin. *Bull. Acad.* **1936**, *9*, 74-82.
15. Licois, D.; Wyers, M.; Coudert, P. Epizootic Rabbit Enteropathy: Experimental Transmission and Clinical Characterization. *Vet Res* **2004**, *36*, 601–613.
16. Marlier, D.; Dewrée, R.; Lassence, C.; Licois, D.; Mainil, J.; Coudert, P.; Meulemans, L.; Ducatelle, R.; Vindevogel, H. Infectious Agents Associated with Epizootic Rabbit Enteropathy:


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Isolation and Attempts to Reproduce the Syndrome. *Veterinary Journal* **2006**, *172*, 493–500, doi:10.1016/j.tvjl.2005.07.011.

17. Rosell, J.M.; De La Fuente, L.F.; Badiola, J.I.; De Fernandez, L.D.; Casal, J.; Saco, M. Study of Urgent Visits to Commercial Rabbit Farms in Spain and Portugal during 1997-2007. *World Rabbit Science* **2009**, *17*, 127–136.

18. Solans, L.; Arnal, J.L.; Sanz, C.; Benito, A.; Chacón, G.; Alzuguren, O.; Fernández, A.B. Rabbit Enteropathies on Commercial Farms in the Iberian Peninsula: Etiological Agents Identified in 2018–2019. *Animals* **2019**, *9*, doi:10.3390/ani9121142.

19. Puón-Peláez, X.-H.; McEwan, N.; Olvera-Ramírez, A. Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE): A Review of Current Knowledge. *European Scientific Journal ESJ* **2018**, *14*, 137–149, doi:10.19044/esj.2018.v14n36p137.

20. Badiola, I.; Perez De Rozas, A.; Gonzalez, J.; Aloy, N.; García, J.; Carabaño, R. Recent Advances in ERE in Growing Rabbits (Invited Paper). In Proceedings of the Proceedings 11th World Rabbit Congress - June 15-18, 2016 - Qingdao - China; 2016; pp. 491–502.

21. Gidenne, T.; Kerdiles, V.; Jehl, N.; Arveux, P.; Eckenfelder, B.; Briens, C.; Stephan, S.; Fortune, H.; Montessuy, S.; Muraz, G. Protein Replacement by Digestible Fibre in the Diet of Growing Rabbits: 2-Impact on Performances, Digestive Health and Nitrogen Output. *Anim Feed Sci Technol* **2013**, *183*, 142–150, doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.03.013.

22. Saettone, V.; Biasato, I.; Radice, E.; Schiavone, A.; Bergero, D.; Meineri, G. State-of-the-Art of the Nutritional Alternatives to the Use of Antibiotics in Humans and Monogastric Animals. *Animals* **2020**, *10*, 1–36, doi:10.3390/ani10122199.

23. Attia, Y.A.; Hamed, R.S.; Abd El-Hamid, A.E.; Al-Harthi, M.A.; Shahba, H.A.; Bovera, F. Performance, Blood Profile, Carcass and Meat Traits and Tissue Morphology in Growing Rabbits Fed Mannanoligosaccharides and Zinc-Bacitracin Continuously or Intermittently. *Anim Sci Pap Rep* **2015**, *33*, 85–101.

24. Carabaño, R.; Badiola, I.; Chamorro, S.; García, J. New Trends in Rabbit Feeding : Influence of Nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2008**, *6*, 15–25.

25. Szendro, K.; Szabó-Szentgróti, E.; Szigeti, O. Consumers' Attitude to Consumption of Rabbit Meat in Eight Countries Depending on the Production Method and Its Purchase Form. *Foods* **2020**, *9*, doi:10.3390/foods9050654.

26. Crovato, S.; Pinto, A.; Martino, G. Di; Mascarello, G.; Rizzoli, V.; Marcolin, S.; Ravarotto, L. Purchasing Habits, Sustainability Perceptions, and Welfare Concerns of Italian Consumers Regarding Rabbit Meat. *Foods* **2022**, *11*, doi:10.3390/foods11091205.

27. Siddiqui, S.A.; Gerini, F.; Ikram, A.; Saeed, F.; Feng, X.; Chen, Y. Rabbit Meat—Production, Consumption and Consumers' Attitudes and Behavior. *Sustainability (Switzerland)* 2023, *15*.

28. González-Redondo P; Rodríguez-Serrano Promotion of Rabbit Meat Consumption in Spain. In Proceedings of the 10th World Rabbit Congress; Sharm El-Sheikh, Egypt, September 2012; pp. 955–959.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

29. Martínez-Paredes, E.; Nicodemus, N.; Pascual, J.J.; García, J. Challenges in Rabbit Doe Feeding, Including the Young Doe. *World Rabbit Science* **2022**, *30*, 13–24, doi:10.4995/WRS.2022.15562.

30. Nicodemus, N.; Carabaño, R.; García, J.; Méndez, J.; De Blas, C. Performance Response of Lactating and Growing Rabbits to Dietary Lignin Content. *Anim Feed Sci Technol* **1999**, *80*, 43–54.

31. Nicodemus, N.; García, J.; Carabaño, R.; De Blas, J.C. Effect of a Reduction of Dietary Particle Size by Substituting a Mixture of Fibrous By-Products for Lucerne Hay on Performance and Digestion of Growing Rabbits and Lactating Does. *Livest Sci* **2006**, *100*, 242–250, doi:10.1016/j.livsci.2005.09.004.

32. Gutiérrez, I.; Espinosa, A.; García, J.; Carabaño, R.; De Blas, J.C. Effects of Starch and Protein Sources, Heat Processing, and Exogenous Enzymes in Starter Diets for Early Weaned Rabbits. *Anim Feed Sci Technol* **2002**, *98*, 175–186, doi:10.1016/S0377-8401(02)00028-7.

33. Farias, C.; Feijoo, D.; Gratta, F.; Brambillasca, S.; Ocasio-Vega, C.; Nicodemus, N.; Carabaño, R.; García, J. Efecto Del Nivel de Fibra Insoluble y Soluble Sobre La Cantidad de Fibra Fermentada a Nivel Ileal, Cecal y Fecal En Gazapos En Crecimiento. *XVIII Jornadas sobre Producción Animal* **2019**, 89–91.

34. Gómez-Conde, M.S.; de Rozas, A.P.; Badiola, I.; Pérez-Alba, L.; de Blas, C.; Carabaño, R.; García, J. Effect of Neutral Detergent Soluble Fibre on Digestion, Intestinal Microbiota and Performance in Twenty Five Day Old Weaned Rabbits. *Livest Sci* **2009**, *125*, 192–198, doi:10.1016/j.livsci.2009.04.010.

35. Trocino, A.; Garcia, J.; Carabaño, R.; Xiccato, G. A Meta-Analysis on the Role of Soluble Fibre in Diets for Growing Rabbits. *World Rabbit Science* **2013**, *21*, 1–15, doi:10.4995/wrs.2013.1285.

36. Trocino, A.; Fragkiadakis, M.; Majolini, D.; Tazzoli, M.; Radaelli, G.; Xiccato, G. Soluble Fibre, Starch and Protein Level in Diets for Growing Rabbits: Effects on Digestive Efficiency and Productive Traits. *Anim Feed Sci Technol* **2013**, *180*, 73–82, doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.01.007.

37. Gutierrez, I.; Espinosa, A.; Carabaño, R.; Rebollar, P.G.; De Blas, J.C. Effect of Protein Source on Digestion and Growth Performance of Early-Weaned Rabbits. *Animal Research* **2003**, *52*, 461–471, doi:10.1051/animres:2003032.

38. García-Ruiz, A.I.; García-Palomares, J.; García-Rebollar, P.; Chamorro, S.; Carabaño, R.; de Blas, C. Effect of Protein Source and Enzyme Supplementation on Ileal Protein Digestibility and Fattening Performance in Rabbits. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2006**, *4*, 297–303.

39. Chamorro, S.; Gómez-Conde, M.S.; Pérez De Rozas, A.M.; Badiola, I.; Carabaño, R.; De Blas, J.C. Effect on Digestion and Performance of Dietary Protein Content and of Increased Substitution of Lucerne Hay with Soya-Bean Protein Concentrate in Starter Diets for Young Rabbits. *Animal* **2007**, *1*, 651–659, doi:10.1017/S1751731107708273.

40. Martínez-Vallespín, B.; Martínez-Paredes, E.; Ródenas, L.; Cervera, C.; Pascual, J.J.; Blas, E. Combined Feeding of Rabbit Female and Young: Partial Replacement of Starch with Acid

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Detergent Fibre or/and Neutral Detergent Soluble Fibre at Two Protein Levels. *Livest Sci* **2011**, *141*, 155–165, doi:10.1016/j.livsci.2011.05.014.

41. Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Nicodemus, N.; Diaz-Perales, A.; García, J.; Carabaño, R.; Menoyo, D. Effect of Pre- and Post-Weaning Dietary Supplementation with Arginine and Glutamine on Rabbit Performance and Intestinal Health. *BMC Vet Res* **2019**, *15*, doi:10.1186/s12917-019-1945-2.

42. De la Cruz, P. Efecto Del Nivel de Calcio Sobre Los Rendimientos Productivos de Gazapos. Trabajo Fin de Grado (Grado En Ciencias Agrarias y Bioeconomía). ETSI Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid. **2022**.

43. Ocasio-Vega, C.; Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; Menoyo, D.; García, J. The Effect of Cellobiose on the Health Status of Growing Rabbits Depends on the Dietary Level of Soluble Fiber. *J Anim Sci* **2018**, *96*, 1806–1817, doi:10.1093/jas/sky106.

44. Ocasio-Vega, C.; Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; García, J. Effect of Cellobiose Supplementation on Growth Performance and Health in Rabbits. *Livest Sci* **2019**, *221*, 163–171, doi:10.1016/j.livsci.2019.02.002.

45. El Abed, N.; Delgado, R.; Abad, R.; Romero, C.; Villamide, M.; Menoyo, D.; Carabaño, R.; García., J. Soluble and Insoluble Fibre from Sugar Beet Pulp Enhance Intestinal Mucosa Morphology in Young Rabbits. In *Proc. 62nd Annual meeting of the European Federation (held in Stavanger, Norway) of Animal Science, Book of abstracts. Wageningen Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands.*; 2011; p. 159. ISBN 9789086861774.

46. Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Gómez-Conde, M.S.; García, J. Effect of Type of Fiber, Site of Fermentation, and Method of Analysis on Digestibility of Soluble and Insoluble Fiber in Rabbits. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 2860–2871.

47. Romero, C.; Cuesta, S.; Astillero, J.R.; Nicodemus, N.; De Blas, C. Effect of Early Feed Restriction on Performance and Health Status in Growing Rabbits Slaughtered at 2 Kg Live-Weight. *World Rabbit Science* **2010**, *18*, 211–218, doi:10.4995/wrs.2010.778.

48. Gidenne, T.; Combes, S.; Fortun-Lamothe, L. Feed Intake Limitation Strategies for the Growing Rabbit: Effect on Feeding Behaviour, Welfare, Performance, Digestive Physiology and Health: A Review. *Animal* **2012**, *6*, 1407–1419, doi:10.1017/S1751731112000389.

49. Birolo, M.; Trocino, A.; Zuffellato, A.; Xiccato, G. Effect of Feed Restriction Programs and Slaughter Age on Digestive Efficiency, Growth Performance and Body Composition of Growing Rabbits. *Anim Feed Sci Technol* **2016**, *222*, 194–203, doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.10.014.

50. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14*, 491–502, doi:10.1038/nrgastro.2017.75.

51. Gibson, G.R.; Scott, K.P.; Rastall, R.A.; Tuohy, K.M.; Hotchkiss, A.; Dubert-Ferrandon, A.; Gareau, M.; Murphy, E.F.; Saulnier, D.; Loh, G.; et al. Dietary Prebiotics: Current Status and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

New Definition. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods* **2010**, *7*, 1–19, doi:10.1616/1476-2137.15880.

52. Gibson, G.R.; Probert, H.M.; Loo, J. Van; Rastall, R.A.; Roberfroid, M.B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics. *Nutr Res Rev* **2004**, *17*, 259–275, doi:10.1079/nrr200479.

53. Falcão-e-Cunha, L.; Castro-Solla, L.; Maertens, L.; Marounek, M.; Pinheiro, V.; Freire, J.; Mourão, J.L. Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Rabbit Feeding: A Review. *World Rabbit Science* **2007**, *15*, 127–140.

54. López-Gálvez, G.; López-Alonso, M.; Pechova, A.; Mayo, B.; Dierick, N.; Gropp, J. Alternatives to Antibiotics and Trace Elements (Copper and Zinc) to Improve Gut Health and Zootechnical Parameters in Piglets: A Review. *Anim Feed Sci Technol* **2021**, *271*, doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114727.

55. Corino, C.; Di Giancamillo, A.; Modina, S.C.; Rossi, R. Prebiotic Effects of Seaweed Polysaccharides in Pigs. *Animals* **2021**, *11*, doi:10.3390/ani11061573.

56. Makkar, H.P.S.; Tran, G.; Heuzé, V.; Giger-Reverdin, S.; Lessire, M.; Lebas, F.; Ankers, P. Seaweeds for Livestock Diets: A Review. *Anim Feed Sci Technol* **2016**, *212*, 1–17, doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.09.018.

57. Øverland, M.; Mydland, L.T.; Skrede, A. Marine Macroalgae as Sources of Protein and Bioactive Compounds in Feed for Monogastric Animals. *J Sci Food Agric* **2019**, *99*, 13–24, doi:10.1002/jsfa.9143.

58. Pardilhó, S.; Cotas, J.; Pereira, L.; Oliveira, M.B.; Dias, J.M. Marine Macroalgae in a Circular Economy Context: A Comprehensive Analysis Focused on Residual Biomass. *Biotechnol Adv* **2022**, *60*, doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107987.

59. Evans, F.D.; Critchley, A.T. Seaweeds for Animal Production Use. *J Appl Phycol* **2014**, *26*, 891–899, doi:10.1007/s10811-013-0162-9.

60. Wells, M.L.; Potin, P.; Craigie, J.S.; Raven, J.A.; Merchant, S.S.; Helliwell, K.E.; Smith, A.G.; Camire, M.E.; Brawley, S.H. Algae as Nutritional and Functional Food Sources: Revisiting Our Understanding. *J Appl Phycol* **2017**, *29*, 949–982, doi:10.1007/s10811-016-0974-5.

61. Biris-Dorhoi, E.S.; Michiu, D.; Pop, C.R.; Rotar, A.M.; Tofana, M.; Pop, O.L.; Socaci, S.A.; Farcas, A.C. Macroalgae—A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–23, doi:10.3390/nu12103085.

62. Morais, T.; Inácio, A.; Coutinho, T.; Ministro, M.; Cotas, J.; Pereira, L.; Bahcevandziev, K. Seaweed Potential in the Animal Feed: A Review. *J Mar Sci Eng* **2020**, *8*, 1–24, doi:10.3390/JMSE8080559.

63. Gómez-Ordóñez, E.; Jiménez-Escrig, A.; Rupérez, P. Dietary Fibre and Physicochemical Properties of Several Edible Seaweeds from the Northwestern Spanish Coast. *Food Research International* **2010**, *43*, 2289–2294, doi:10.1016/j.foodres.2010.08.005.

64. Pereira, L. Biological and Therapeutic Properties of the Seaweed Polysaccharides. *Int Biol Rev* **2018**, *2*, 1–50, doi:10.18103/ibr.v2i2.1762.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

65. Hamed, I.; Özogul, F.; Özogul, Y.; Regenstein, J.M. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2015**, *14*, 446–465, doi:10.1111/1541-4337.12136.

66. O'Sullivan, L.; Murphy, B.; McLoughlin, P.; Duggan, P.; Lawlor, P.G.; Hughes, H.; Gardiner, G.E. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. *Mar Drugs* **2010**, *8*, 2038–2064, doi:10.3390/md8072038.

67. De Jesus Raposo, M.F.; De Morais, A.M.M.B.; De Morais, R.M.S.C. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. *Mar Drugs* **2016**, *14*, 1–27, doi:10.3390/md14020027.

68. Cherry, P.; Yadav, S.; Strain, C.R.; Allsopp, P.J.; Mcsorley, E.M.; Ross, R.P.; Stanton, C. Prebiotics from Seaweeds: An Ocean of Opportunity? *Mar Drugs* **2019**, *17*, 1–35, doi:10.3390/md17060327.

69. Patel, S.; Goyal, A. The Current Trends and Future Perspectives of Prebiotics Research: A Review. *3 Biotech* **2012**, *2*, 115–125, doi:10.1007/s13205-012-0044-x.

70. Reilly, P.; O'Doherty, J. V.; Pierce, K.M.; Callan, J.J.; O'Sullivan, J.T.; Sweeney, T. The Effects of Seaweed Extract Inclusion on Gut Morphology, Selected Intestinal Microbiota, Nutrient Digestibility, Volatile Fatty Acid Concentrations and the Immune Status of the Weaned Pig. *Animal* **2008**, *2*, 1465–1473, doi:10.1017/S1751731108002711.

71. Dierick, N.; Ovyn, A.; De Smet, S. Effect of Feeding Intact Brown Seaweed Ascophyllum Nodosum on Some Digestive Parameters and on Iodine Content in Edible Tissues in Pigs. *J Sci Food Agric* **2009**, *89*, 584–594, doi:10.1002/jsfa.3480.

72. McDonnell, P.; Figat, S.; Odoherty, J. V. The Effect of Dietary Laminarin and Fucoidan in the Diet of the Weanling Piglet on Performance, Selected Faecal Microbial Populations and Volatile Fatty Acid Concentrations. *Animal* **2010**, *4*, 579–585, doi:10.1017/S1751731109991376.

73. O'Doherty, J. V.; McDonnell, P.; Figat, S. The Effect of Dietary Laminarin and Fucoidan in the Diet of the Weanling Piglet on Performance and Selected Faecal Microbial Populations. *Livest Sci* **2010**, *134*, 208–210, doi:10.1016/j.livsci.2010.06.143.

74. Leonard, S.G.; Sweeney, T.; Bahar, B.; Lynch, B.P.; O'Doherty, J. V. Effects of Dietary Seaweed Extract Supplementation in Sows and Post-Weaned Pigs on Performance, Intestinal Morphology, Intestinal Microflora and Immune Status. *British Journal of Nutrition* **2011**, *106*, 688–699, doi:10.1017/S0007114511000997.

75. Walsh, A.M.; Sweeney, T.; O'Shea, C.J.; Doyle, D.N.; O'Doherty, J. V. Effect of Dietary Laminarin and Fucoidan on Selected Microbiota, Intestinal Morphology and Immune Status of the Newly Weaned Pig. *Br J Nutr* **2013**, *110*, 1630–1638, doi:10.1017/S0007114513000834.

76. Heim, G.; Walsh, A.M.; Sweeney, T.; Doyle, D.N.; O'Shea, C.J.; Ryan, M.T.; O'Doherty, J. V. Effect of Seaweed-Derived Laminarin and Fucoidan and Zinc Oxide on Gut Morphology, Nutrient Transporters, Nutrient Digestibility, Growth Performance and Selected Microbial Populations in Weaned Pigs. *British Journal of Nutrition* **2014**, *111*, 1577–1585, doi:10.1017/S0007114513004224.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

77. Wan, J.; Zhang, J.; Chen, D.; Yu, B.; He, J. Effects of Alginate Oligosaccharide on the Growth Performance, Antioxidant Capacity and Intestinal Digestion-Absorption Function in Weaned Pigs. *Anim Feed Sci Technol* **2017**, *234*, 118–127, doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.09.006.

78. Sardari, R.R.R.; Nordberg Karlsson, E. Marine Poly- and Oligosaccharides as Prebiotics. *J Agric Food Chem* **2018**, *66*, 11544–11549, doi:10.1021/acs.jafc.8b04418.

79. Al-Soufi, S.; García, J.; Muíños, A.; López-Alonso, M. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming. *Animals* **2022**, *12*, doi:10.3390/ani12182346.

80. El-banna, S.G.; Hassan, A.A.; Okab, A.B.; Koriem, A.A.; Ayoub, M.A. Effect of Feeding Diets Supplemented with Seaweed on Growth Performance and Some Blood Hematological and Biochemical Characteristics of Male Baladi Rabbits. *The 4th Inter. Con. on Rabbit Prod. in Hot Clim.* **2005**, *382*, 373–382.

81. Abu Hafsa, S.H.; Khalel, M.S.; El-Gindy, Y.M.; Hassan, A.A. Nutritional Potential of Marine and Freshwater Algae as Dietary Supplements for Growing Rabbits. *Ital J Anim Sci* **2021**, *20*, 784–793, doi:10.1080/1828051X.2021.1928557.

82. Vizzari, F.; Massányi, M.; Knížatová, N.; Corino, C.; Rossi, R.; Ondruška, Ľ.; Tirpák, F.; Halo, M.; Massányi, P. Effects of Dietary Plant Polyphenols and Seaweed Extract Mixture on Male-Rabbit Semen: Quality Traits and Antioxidant Markers. *Saudi J Biol Sci* **2021**, *28*, 1017–1025, doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.043.

83. Rossi, R.; Vizzarri, F.; Ratti, S.; Palazzo, M.; Casamassima, D.; Corino, C. Effects of Long-Term Supplementation with Brown Seaweeds and Polyphenols in Rabbit on Meat Quality Parameters. *Animals* **2020**, *10*, 14.

84. Rossi, R.; Vizzarri, F.; Chiapparini, S.; Ratti, S.; Casamassima, D.; Palazzo, M.; Corino, C. Effects of Dietary Levels of Brown Seaweeds and Plant Polyphenols on Growth and Meat Quality Parameters in Growing Rabbit. *Meat Sci* **2020**, *161*, 107987, doi:10.1016/j.meatsci.2019.107987.

85. Vizzarri, F.; Chiapparini, S.; Corino, C.; Casamassima, D.; Palazzo, M.; Parkanyi, V.; Ondruska, L.; Rossi, R. Dietary Supplementation with Natural Extracts Mixture: Effects on Reproductive Performances, Blood Biochemical and Antioxidant Parameters in Rabbit Does. *Annals of Animal Science* **2020**, *20*, 565–578, doi:10.2478/aoas-2019-0084.

86. Rochet, V.; Bernalier, A. Utilization of Algal Polysaccharides by Human Colonic Bacteria, in Axenic Culture or in Association with Hydrogenotrophic Microorganisms. *Reproduction Nutrition Develpment* **1997**, *37*, 221–229.

87. Williams, A.G.; Withers, S.; Sutherland, A.D. The Potential of Bacteria Isolated from Ruminal Contents of Seaweed-Eating North Ronaldsay Sheep to Hydrolyse Seaweed Components and Produce Methane by Anaerobic Digestion in Vitro. *Microb Biotechnol* **2012**, *6*, 45–52, doi:10.1111/1751-7915.12000.

88. Güroy, D.; Güroy, B.; Bilen, S.; Terzi, E.; Kenanoğlu, O.N.; García-Suárez, M.; Marzin, D.; Mantoğlu, S.; Karadal, O.; Şahin, İ.; et al. Effects of Dietary Marine Sulphated Polysaccharides (Algimun®) on Growth Performance, Immune Responses and Disease Resistance of Juvenile

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Gilthead Seabream (Sparus Aurata) to Photobacterium Damselae Subsp. Piscicida. *Fish Shellfish Immunol* **2022**, *127*, 1139–1147, doi:10.1016/j.fsi.2022.07.054.

89. Kadam, S.U.; Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P. Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *J Agric Food Chem* 2013, *61*, 4667–4675.

90. Rupérez, P. Mineral Content of Edible Marine Seaweeds. *Food Chem* **2002**, *79*, 23–26, doi:10.1016/S0308-8146(02)00171-1.

91. Circuncisão, A.R.; Catarino, M.D.; Cardoso, S.M.; Silva, A.M.S. Minerals from Macroalgae Origin: Health Benefits and Risks for Consumers. *Mar Drugs* 2018, *16*, 400.

92. Cabrita, A.R.J.; Maia, M.R.G.; Oliveira, H.M.; Sousa-Pinto, I.; Almeida, A.A.; Pinto, E.; Fonseca, A.J.M. Tracing Seaweeds as Mineral Sources for Farm-Animals. *J Appl Phycol* **2016**, *28*, 3135–3150, doi:10.1007/s10811-016-0839-y.

93. Lozano Muñoz, I.; Díaz, N.F. Minerals in Edible Seaweed: Health Benefits and Food Safety Issues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020, *62*, 1592–1607.

94. Rey-Crespo, F.; López-Alonso, M.; Miranda, M. The Use of Seaweed from the Galician Coast as a Mineral Supplement in Organic Dairy Cattle. *Animal* **2014**, *8*, 580–586, doi:10.1017/S1751731113002474.

95. Costa, M.; Cardoso, C.; Afonso, C.; Bandarra, N.M.; Prates, J.A.M. Current Knowledge and Future Perspectives of the Use of Seaweeds for Livestock Production and Meat Quality: A Systematic Review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **2021**, *105*, 1075–1102, doi:10.1111/jpn.13509.

96. Díaz, O.; Tapia, Y.; Muñoz, O.; Montoro, R.; Velez, D.; Almela, C. Total and Inorganic Arsenic Concentrations in Different Species of Economically Important Algae Harvested from Coastal Zones of Chile. *Food and Chemical Toxicology* **2012**, *50*, 744–749, doi:10.1016/j.fct.2011.11.024.

97. Wolle, M.M.; Todorov, T.I.; Conklin, S.D. Arsenic Species in Seaweeds Commercially Available in the United States. *ACS Food Science and Technology* **2021**, *1*, 511–523, doi:10.1021/acsfoodscitech.0c00120.

98. Biancarosa, I.; Belghit, I.; Bruckner, C.G.; Liland, N.S.; Waagbø, R.; Amlund, H.; Heesch, S.; Lock, E.J. Chemical Characterization of 21 Species of Marine Macroalgae Common in Norwegian Waters: Benefits of and Limitations to Their Potential Use in Food and Feed. *J Sci Food Agric* **2018**, *98*, 2035–2042, doi:10.1002/jsfa.8798.

99. Al-Soufi, S.; García, J.; Cegarra, E.; Muíños, A.; Pereira, V.; López-Alonso, M. Seaweeds in Animal Nutrition, a Valuable Source of Minerals but in Need of Fine-Tuning. In Proceedings of the EAAP-74th Annual Meeting; Wageningen Academic: Lyon, France, August 30 2023; p. 718.

100. Stibilj, V.; Vadnjal, R.; Kovač, M.; Holcman, A. The Effect of Dietary Arsenic Additions on the Distribution of Selenium and Iodine in Eggs and Tissues of Laying Hens. *Arch Environ Contam Toxicol* **2004**, *46*, 275–280, doi:10.1007/s00244-003-2276-6.

101. Granby, K.; Amlund, H.; Valente, L.M.P.; Dias, J.; Adoff, G.; Sousa, V.; Marques, A.; Sloth, J.J.; Larsen, B.K. Growth Performance, Bioavailability of Toxic and Essential Elements and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nutrients, and Biofortification of Iodine of Rainbow Trout (Onchorynchus Mykiss) Fed Blends with Sugar Kelp (Saccharina Latissima). *Food and Chemical Toxicology* **2020**, *141*, doi:10.1016/j.fct.2020.111387.

102. Pavlata, L.; Slosarkova, S.; Fleischer, P.; Pechova, A. Effects of Increased Iodine Supply on the Selenium Status of Kids. *Vet. Med. - Czech* **2005**, *50*, 186–194.

103. National Research Council *Mineral Tolerance of Animals*; 2nd Revised Edition.; The National Academies Press: Washington DC, 2005; ISBN 0309096545.

104. Netto, A.S.; Zanetti, M.A.; Correa, L.B.; Claro, G.R. Del; Salles, M.S.V.; Vilela, F.G. Effects of Dietary Selenium, Sulphur and Copper Levels on Selenium Concentration in the Serum and Liver of Lamb. *Asian-Australas J Anim Sci* **2014**, *27*, 1082–1087, doi:10.5713/ajas.2013.13818.

105. Ivancic, J.; Weiss, W.P. Effect of Dietary Sulfur and Selenium Concentrations on Selenium Balance of Lactating Holstein Cows. *J Dairy Sci* **2001**, *84*, 225–232, doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74472-4.

106. Moroney, N.C.; O'Grady, M.N.; Robertson, R.C.; Stanton, C.; O'Doherty, J. V.; Kerry, J.P. Influence of Level and Duration of Feeding Polysaccharide (Laminarin and Fucoidan) Extracts from Brown Seaweed (Laminaria Digitata) on Quality Indices of Fresh Pork. *Meat Sci* **2015**, *99*, 132–141, doi:10.1016/j.meatsci.2014.08.016.

107. Ribeiro, D.M.; Martins, C.F.; Costa, M.; Coelho, D.; Pestana, J.; Alfaia, C.; Lordelo, M.; de Almeida, A.M.; Freire, J.P.B.; Prates, J.A.M. Quality Traits and Nutritional Value of Pork and Poultry Meat from Animals Fed with Seaweeds. *Foods* **2021**, *10*, doi:10.3390/foods10122961.

108. Moroney, N.C.; O'Grady, M.N.; O'Doherty, J. V.; Kerry, J.P. Addition of Seaweed (Laminaria Digitata) Extracts Containing Laminarin and Fucoidan to Porcine Diets: Influence on the Quality and Shelf-Life of Fresh Pork. *Meat Sci* **2012**, *92*, 423–429, doi:10.1016/j.meatsci.2012.05.005.

109. Rajauria, G.; Draper, J.; McDonnell, M.; O'Doherty, J. V. Effect of Dietary Seaweed Extracts, Galactooligosaccharide and Vitamin E Supplementation on Meat Quality Parameters in Finisher Pigs. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2016**, *37*, 269–275, doi:10.1016/j.ifset.2016.09.007.

110. Jerez-Timaure, N.; Sánchez-Hidalgo, M.; Pulido, R.; Mendoza, J. Effect of Dietary Brown Seaweed (Macrocystis Pyrifera) Additive on Meat Quality and Nutrient Composition of Fattening Pigs. *Foods* **2021**, *10*, doi:10.3390/foods10081720.

111. Montgomery, J.L.; Allen, V.G.; Pond, K.R.; Miller, M.F.; Wester, D.B.; Brown, C.P.; Evans, R.; Bagley, C.P.; Ivy, R.L.; Fontenot#, J.P. *Tasco-Forage: IV. Influence of a Seaweed Extract Applied to Tall Fescue Pastures on Sensory Characteristics, Shelf-Life, and Vitamin E Status in Feedlot-Finished Steers 1*; 2001; Vol. 79;.

112. Braden, K.W.; Blanton, J.R.; Montgomery, J.L.; Van Santen, E.; Allen, V.G.; Miller, M.F. Tasco Supplementation: Effects on Carcass Characteristics, Sensory Attributes, and Retail Display Shelf-Life. *J Anim Sci* **2007**, *85*, 754–768, doi:10.2527/jas.2006-294.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

113. Zhu, W.; Li, D.; Wang, J.; Wu, H.; Xia, X.; Bi, W.; Guan, H.; Zhang, L. Effects of Polymannuronate on Performance, Antioxidant Capacity, Immune Status, Cecal Microflora, and Volatile Fatty Acids in Broiler Chickens. *Poult Sci* **2015**, *94*, 345–352, doi:10.3382/ps/pev006.

114. Fike, J.H.; Saker, K.E.; O'Keefe, S.F.; Marriott, N.G.; Ward, D.L.; Fontenot, J.P.; Veit, H.P. Effects of Tasco (a Seaweed Extract) and Heat Stress on N Metabolism and Meat Fatty Acids in Wether Lambs Fed Hays Containing Endophyte-Infected Fescue. *Small Ruminant Research* **2005**, *60*, 237–245, doi:10.1016/j.smallrumres.2004.12.007.

115. Abudabos, A.M.; Okab, A.B.; Aljumaah, R.S.; Samara, E.M.; Abdoun, K.A.; Al-Haidary, A.A. Nutritional Value of Green Seaweed (Ulva Lactuca) for Broiler Chickens. *Ital J Anim Sci* **2013**, *12*, 177–181, doi:10.4081/ijas.2013.e28.

116. Jagtap, A.S.; Meena, S.N. Seaweed Farming: A Perspective of Sustainable Agriculture and Socio-Economic Development. In *Natural Resources Conservation and Advances for Sustainability*; Elsevier Inc., 2021; pp. 493–501.

117. Ferdouse, F.; Løvstad Holdt, S.; Smith, R.; Murúa, P.; Yang, Z. The Global Status of Seaweed Production, Trade and Utilization. *FAO Globefish Research Programme* **2018**, *124*, 120.

118. Van Den Burg, S.W.K.; Dagevos, H.; Helmes, R.J.K. Towards Sustainable European Seaweed Value Chains: A Triple P Perspective. *ICES Journal of Marine Science* **2021**, *78*, 443–450, doi:10.1093/icesjms/fsz183.

119. Manuel García Tasende y César Peteiro Explotación de Las Macroalgas de Estudio Hacia Una Gestión Marinas: Galicia Como Caso Sostenible de Los Recursos. *Ambienta* **2015**, 116–132.

120. Peteiro, C.; Salinas, J.M.; Freire, Ó.; Fuertes, C. Cultivation of the Autoctonous Seaweed'Laminaria Saccharina'off the Galician Coast (NW Spain): Production and Features of the Sporophytes for an Annual and Biennial Harvest. *Thalassas* **2006**, *22*, 45–53.

121. López-Mosquera, M.E.; Fernández-Lema, E.; Villares, R.; Corral, R.; Alonso, B.; Blanco, C. Composting Fish Waste and Seaweed to Produce a Fertilizer for Use in Organic Agriculture. *Procedia Environ Sci* **2011**, *9*, 113–117, doi:10.1016/j.proenv.2011.11.018.

122. Hasselström, L.; Thomas, J.B.; Nordström, J.; Cervin, G.; Nylund, G.M.; Pavia, H.; Gröndahl, F. Socioeconomic Prospects of a Seaweed Bioeconomy in Sweden. *Sci Rep* **2020**, *10*, 1–7, doi:10.1038/s41598-020-58389-6.

123. Yang, Q.; Gao, Y.; Ke, J.; Show, P.L.; Ge, Y.; Liu, Y.; Guo, R.; Chen, J. Antibiotics: An Overview on the Environmental Occurrence, Toxicity, Degradation, and Removal Methods. *Bioengineered* **2021**, *12*, 7376–7416, doi:10.1080/21655979.2021.1974657.

124. Van Boeckel, T.P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B.T.; Levin, S.A.; Robinson, T.P.; Teillant, A.; Laxminarayan, R. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 5649–5654, doi:10.1073/pnas.1503141112.

125. Polianciuc, S.I.; Gurzău, A.E.; Kiss, B.; Georgia Ștefan, M.; Loghin, F. Antibiotics in the Environment: Causes and Consequences. *Med Pharm Rep* **2020**, *93*, 231–240, doi:10.15386/mpr-1742.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

126. Jayalakshmi, K.; Paramasivam, M.; Sasikala, M.; Sumithra, A. Review on Antibiotic Residues in Animal Products and Its Impact on Environments and Human Health. *J Entomol Zool Stud* **2017**, *5*, 1446–1451.

127. Kuppusamy, S.; Kakarla, D.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M.; Yoon, Y.E.; Lee, Y.B. Veterinary Antibiotics (VAs) Contamination as a Global Agro-Ecological Issue: A Critical View. *Agric Ecosyst Environ* 2018, *257*, 47–59.

128. Maertens, L. Possibilities to Reduce the Feed Conversion in Rabbit Production. *Giornate di Coniglicoltura ASIC* **2009**, 57–59.

129. Austin, K.F. Soybean Exports and Deforestation from a World-Systems Perspective: A Cross-National Investigation of Comparative Disadvantage. *Sociological Quarterly* **2010**, *51*, 511–536, doi:10.1111/j.1533-8525.2010.01180.x.

130. Maertens, L.; Cavani, C.; Petracci, M. Nitrogen and Phosphorus Excretion on Commercial Rabbit Farms: Calculations Based on the Input-Output Balance. *World Rabbit Science* **2005**, *13*, 3–16.

131. Krimpen, M.M. Van; Bikker, P.; Van Der Meer, I.M.; van der Peet-Schwering, C.M.C.; Vereijken, J.M. Cultivation, Processing and Nutritional Aspects for Pigs and Poultry of European Protein Sources as Alternatives for Imported Soybean Products. **2013**, 48.

132. Lopez-Santamarina, A.; Cardelle-Cobas, A.; del Carmen Mondragon, A.; Sinisterra-Loaiza, L.; Miranda, J.M.; Cepeda, A. Evaluation of the Potential Prebiotic Effect of Himanthalia Elongata, an Atlantic Brown Seaweed, in an in Vitro Model of the Human Distal Colon. *Food Research International* **2022**, *156*, 111156, doi:10.1016/j.foodres.2022.111156.

133. Wu, H.; Huo, Y.; Hu, M.; Wei, Z.; He, P. Eutrophication Assessment and Bioremediation Strategy Using Seaweeds Co-Cultured with Aquatic Animals in an Enclosed Bay in China. *Mar Pollut Bull* **2015**, *95*, 342–349, doi:10.1016/j.marpolbul.2015.03.016.

134. Nardelli, A.E.; Chiozzini, V.G.; Braga, E.S.; Chow, F. Integrated Multi-Trophic Farming System between the Green Seaweed Ulva Lactuca, Mussel, and Fish: A Production and Bioremediation Solution. *J Appl Phycol* **2019**, *31*, 847–856, doi:10.1007/s10811-018-1581-4.

135. Znad, H.; Awual, M.R.; Martini, S. The Utilization of Algae and Seaweed Biomass for Bioremediation of Heavy Metal-Contaminated Wastewater. *Molecules* **2022**, *27*, 1–21, doi:10.3390/molecules27041275.

136. Fraga-Corral, M.; Ronza, P.; Garcia-Oliveira, P.; Pereira, A.G.; Losada, A.P.; Prieto, M.A.; Quiroga, M.I.; Simal-Gandara, J. Aquaculture as a Circular Bio-Economy Model with Galicia as a Study Case: How to Transform Waste into Revalorized by-Products. *Trends Food Sci Technol* **2022**, *119*, 23–35, doi:10.1016/j.tifs.2021.11.026.

137. Marinho, G.S.; Holdt, S.L.; Birkeland, M.J.; Angelidaki, I. Commercial Cultivation and Bioremediation Potential of Sugar Kelp, Saccharina Latissima, in Danish Waters. *J Appl Phycol* **2015**, *27*, 1963–1973, doi:10.1007/s10811-014-0519-8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

138. Buck, B.H.; Troell, M.F.; Krause, G.; Angel, D.L.; Grote, B.; Chopin, T. State of the Art and Challenges for Offshore Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA). *Front Mar Sci* **2018**, *5*, 1–21, doi:10.3389/fmars.2018.00165.

139. Kleitou, P.; Kletou, D.; David, J. Is Europe Ready for Integrated Multi-Trophic Aquaculture? A Survey on the Perspectives of European Farmers and Scientists with IMTA Experience. *Aquaculture* **2018**, *490*, 136–148, doi:10.1016/j.aquaculture.2018.02.035.

140. Guerrero, S., & Creamades, J. *Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA): A Sustainable, Pioneering Alternative for Marine Cultures in Galicia*; Xunta de G.; Vilanova de Arousa (Pontevedra), 2012;

141. Botana, C.; Novas, M. Invisible Ecoproducers. Galician Family Farming Spaces for Local Self-Consumption. *Astrágalo. Cultura de la Arquitectura y la Ciudad* **2023**, 259–284, doi:10.12795/astragalo.2023.i33-34.14.

142. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, D.G. de P. y M.Agrarios. MAPA (2020). Caracterización Del Sector Cunícola En España.

143. Fernández, S. Culture, Body and Health: An Analysis of the Nutritional Concepts in the Galician Rural Context. *Zainak* **2008**, *30*, 161–176.

144. Alfonzo, R.; Pérez, E.; Al-Soufi, S.; de la Cruz, P.; Silva, V.; Martín, L.; del Pozo, R.; Rybicka, A.; Buján, M.; Domínguez, H.; et al. Efecto de La Inclusión de Productos de Algas Sobre La Digestibilidad Fecal y Otros Parámetros Digestivos En Gazapos En Crecimiento. In Proceedings of the Proceedings of the XLVII Symposium de Cunicultura de ASESCU; León, Spain, 2023; pp. 77–81.

145. Ramos, M.A.; Carabaño, ; Boisen, S.; Ramos, M.A.~ An in Vitro Method for Estimating Digestibility in Rabbits. *Proceedings 5th World Rabbit Congress* **1992**, 938–946.

146. Carabaño, R.; Nicodemus, N.; García, J.; Xiccato, G.; Trocino, A.; Pascual, J.J.; Falcao-e-Cunha, L.; Maertens, L. In Vitro Analysis, an Accurate Tool to Estimate Dry Matter Digestibiity in Rabbits. Intra- and Inter- Laboratory Variability. *World Rabbit Sci* **2008**, *16*, 195–203.

147. Abad, R.; Ibáñez, M.A.; Carabaño, R.; García, J. Quantification of Soluble Fibre in Feedstuffs for Rabbits and Evaluation of the Interference between the Determinations of Soluble Fibre and Intestinal Mucin. *Anim Feed Sci Technol* **2013**, *182*, 61–70, doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.001.

148. Villamide, M.J.; Carabaño, R.; Maertens, L.; Pascual, J.; Gidenne, T.; Falcao-E-Cunha, L.; Xiccato, G. Prediction of the Nutritional Value of European Compound Feeds for Rabbits by Chemical Components and in Vitro Analysis. *Anim Feed Sci Technol* **2009**, *150*, 283–294, doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.09.007.

149. Abad-Guamán, R.; Larrea-Dávalos, J.A.; Carabaño, R.; García, J.; Carro, M.D. Influence of Inoculum Type (Ileal, Caecal and Faecal) on the in Vitro Fermentation of Different Sources of Carbohydrates in Rabbits. *World Rabbit Science* **2018**, *26*, 227–240, doi:10.4995/wrs.2018.9726.

150. Goering, H.K.; Van, P.J. Forage Fiber Analyses. *U.S. Department of Agriculture* **1975**, 387–598.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

151. Ocasio-Vega, C.; Abad-Guamán, R.; Delgado, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; García, J. In Vitro Caecal Fermentation of Carbohydrate-Rich Feedstuffs in Rabbits as Affected by Substrate Pre-Digestion and Donors' Diet. *World Rabbit Science* **2018**, *26*, 15–25, doi:10.4995/wrs.2018.7854.

152. Carro, M.D.; Lebzien, P.; Rohr, K.; Ftir Trererniihnrng, I. Influence of Yeast Culture on the in Vitro Fermentation (Rusitec) of Diets Containing Variable Portions of Concentrates. *Anim Feed Sci Technol* **1992**, *37*, 209–220.

153. Clsi Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—9º Ed, M07-A9 *32*, 1–88.

154. Clsi *M02-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*;

155. Möller, J.J.; Boonnayanont, ; K; Danier, ; J; Egert, ; M; Fütö, ; K; Horst, ; H; Hüther, ; L; Janjira, ; S; Kongchuensin, ; R; Korol, ; W; et al. Gravimetric Determination of Acid Detergent Fiber and Lignin in Feed: Interlaboratory Study. *J AOAC Int* **2009**, *92*, 74–90.

156. Mertens, D.R.; Allen, M.; Main, D.; Thiex, N.J. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study Guidance on Obtaining Defensible Test Portions View Project Databases View Project. *J AOAC Int* **2002**, *2*, 540.

157. Lourenço, S.O.; Barbarino, E.; De-Paula, J.C.; Otávio, L.; Pereira, S.; Lanfer Marquez, U.M. Amino Acid Composition, Protein Content and Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for 19 Tropical Seaweeds. *Phycological Res* **2002**, *50*, 233–241.

158. Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammerman, C.B. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures 1,2. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 1216–1231.

159. Garcia-Vaquero, M.; Rajauria, G.; Miranda, M.; Sweeney, T.; Lopez-Alonso, M.; O'doherty, J. Seasonal Variation of the Proximate Composition, Mineral Content, Fatty Acid Profiles and Other Phytochemical Constituents of Selected Brown Macroalgae. *Mar Drugs* **2021**, *19*, doi:10.3390/MD19040204.

160. de Oliveira Filho, E.F.; Miranda, M.; Ferreiro, T.; Herrero-Latorre, C.; Castro Soares, P.; López-Alonso, M. Concentrations of Essential Trace and Toxic Elements Associated with Production and Manufacturing Processes in Galician Cheese. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27154938.

161. Foster, S.; Maher, W.; Krikowa, F.; Apte, S. A Microwave-Assisted Sequential Extraction of Water and Dilute Acid Soluble Arsenic Species from Marine Plant and Animal Tissues. *Talanta* **2007**, *71*, 537–549, doi:10.1016/j.talanta.2006.04.027.

162. Juskelis, R.; Li, W.; Nelson, J.; Cappozzo, J.C. Arsenic Speciation in Rice Cereals for Infants. *J Agric Food Chem* **2013**, *61*, 10670–10676, doi:10.1021/jf401873z.

163. Marschner, K.; Musil, S.; Mikšík, I.; Dědina, J. Investigation of Hydride Generation from Arsenosugars - Is It Feasible for Speciation Analysis? *Anal Chim Acta* **2018**, *1008*, 8–17, doi:10.1016/j.aca.2018.01.009.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

164. Morales-Rodríguez, A.; Pérez-López, M.; Puigpelat, E.; Sahuquillo, À.; Barrón, D.; López-Sánchez, J.F. Arsenosugar Extracted from Algae: Isolation by Anionic Exchange Solid-phase Extraction. *J Chromatogr A* **2022**, *1684*, doi:10.1016/j.chroma.2022.463549.

165. Van Paemel, M.; Dierick, N.; Janssens, G.; Fievez, V.; De Smet, S. Selected Trace and Ultratrace Elements: Biological Role, Content in Feed and Requirements in Animal Nutrition – Elements for Risk Assessment. *EFSA Supporting Publications* **2010**, *7*, 1–1132, doi:10.2903/sp.efsa.2010.en-68.

166. de Blas, C.; Mateos, G.G. Feed Formulation. In *Nutrition of the rabbit*; CABI, 2020.

167. Ocasio-Vega, C.; Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; Menoyo, D.; García, J. The Effect of Cellobiose on the Health Status of Growing Rabbits Depends on the Dietary Level of Soluble Fiber. *J Anim Sci* **2018**, *96*, 1806–1817, doi:10.1093/jas/sky106.

168. Heim, G.; Walsh, A.M.; Sweeney, T.; Doyle, D.N.; O'Shea, C.J.; Ryan, M.T.; O'Doherty, J. V. Effect of Seaweed-Derived Laminarin and Fucoidan and Zinc Oxide on Gut Morphology, Nutrient Transporters, Nutrient Digestibility, Growth Performance and Selected Microbial Populations in Weaned Pigs. *British Journal of Nutrition* **2014**, *111*, 1577–1585, doi:10.1017/S0007114513004224.

169. MAFF Manual de Técnicas de Laboratorio Parasitolóxico Veterinario. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Boletín Técnico Nº18* 1986, 2–67.

170. Li, S.; Liu, T.; Wang, K.; Li, C.; Wu, F.; Yang, X.; Zhao, M.; Chen, B.; Chen, X. The Ratios of Dietary Non-Fibrous Carbohydrate (NFC) to Neutral Detergent Fiber (NDF) Influence Intestinal Immunity of Rabbits by Regulating Gut Microbiota Composition and Metabolites. *Front Microbiol* **2023**, *14*, doi:10.3389/fmicb.2023.1146787.

171. Leterme, P.; Froidmont, E.; Rossi, F.; Théwis, A. The High Water-Holding Capacity of Pea Inner Fibers Affects the Ileal Flow of Endogenous Amino Acids in Pigs †. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1927–1934.

172. Romero, C.; Nicodemus, N.; Rodríguez, J.D.; García, A.I.; de Blas, C.D. Effect of Type of Grinding of Barley and Dehydrated Alfalfa on Performance, Digestion, and Crude Mucin Ileal Concentration in Growing Rabbits. *J Anim Sci* **2011**, *89*, 2472–2484, doi:10.2527/jas.2010-3226.

173. Khalid, A.R.; Yasoob, T.B.; Zhang, Z.; Zhu, X.; Hang, S. Dietary Moringa Oleifera Leaf Powder Improves Jejunal Permeability and Digestive Function by Modulating the Microbiota Composition and Mucosal Immunity in Heat Stressed Rabbits. *Environmental Science and Pollution Research* **2022**, *29*, 80952–80967, doi:10.1007/s11356-022-20737-6.

174. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **2019**, *37*, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.

175. Parks, D.H.; Tyson, G.W.; Hugenholtz, P.; Beiko, R.G. STAMP: Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3123–3124, doi:10.1093/bioinformatics/btu494.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

176. Blasco, A.; Ouhayoun, J. Harmonization of Criteria and Terminology in Rabbit Meat Research. Revised Proposal. *World Rabbit Science* **1993**, *4*, 93–99.

177. Lorenzo, J.M.; Munekata, P.E.S.; Pateiro, M.; Campagnol, P.C.B.; Domínguez, R. Healthy Spanish Salchichón Enriched with Encapsulated n − 3 Long Chain Fatty Acids in Konjac Glucomannan Matrix. *Food Research International* **2016**, *89*, 289–295, doi:10.1016/j.foodres.2016.08.012.

178. de Carvalho, F.A.L.; Munekata, P.E.S.; Lopes de Oliveira, A.; Pateiro, M.; Domínguez, R.; Trindade, M.A.; Lorenzo, J.M. Turmeric (Curcuma Longa L.) Extract on Oxidative Stability, Physicochemical and Sensory Properties of Fresh Lamb Sausage with Fat Replacement by Tiger Nut (Cyperus Esculentus L.) Oil. *Food Research International* **2020**, *136*, doi:10.1016/j.foodres.2020.109487.

179. Tarladgis, B.G.; Watts, B.M.; Younathan, M.T.; Dugan, L. A Distillation Method for Malonaldehyde in Rancid the Quantitative Foods * Determination Of. *The Journal of the American Oil Chemists´ Society* **1960**, *37*, 44–48.

180. Domínguez, R.; Crecente, S.; Borrajo, P.; Agregán, R.; Lorenzo, J.M. Effect of Slaughter Age on Foal Carcass Traits and Meat Quality. *Animal* **2015**, *9*, 1713–1720, doi:10.1017/S1751731115000671.

181. Cittadini, A.; Domínguez, R.; E. S. Munekata, P.; Pateiro, M.; Sarriés, M. V.; Manuel Lorenzo, J. Use of Oil Mixture Emulsion Hydrogels as Partial Animal Fat Replacers in Dry-Fermented Foal Sausages. *Food Research International* **2022**, *161*, doi:10.1016/j.foodres.2022.111881.

182. Macfie, H.J.; Bratchell, N.; Greenhoff, K. Designs to Balance the Effect of Order of Presentation and First-Order Carry-over Effects in Hall Tests. *J Sens Stud* **1989**, *4*, 129–148.

183. Jollife, I.T.; Cadima, J. Principal Component Analysis: A Review and Recent Developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2016, *374*.

184. Mulaik, S.A. *Foundations of Factor Analysis.*; Chapman & Hall, Ed.; 2nd ed.; CRC Press. : Boca Raton, FL, USA. , 2009;

185. Holdt, S.L.; Kraan, S. Bioactive Compounds in Seaweed: Functional Food Applications and Legislation. *J Appl Phycol* **2011**, *23*, 543–597, doi:10.1007/s10811-010-9632-5.

186. Bikker, P.; Stokvis, L.; van Krimpen, M.M.; van Wikselaar, P.G.; Cone, J.W. Evaluation of Seaweeds from Marine Waters in Northwestern Europe for Application in Animal Nutrition. *Anim Feed Sci Technol* **2020**, *263*, doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114460.

187. Al-Soufi, S.; Nicodemus, N.; Carro, M.D.; López-Alonso, M.; Miranda, M.; Muíños, A.; Cegarra, E.; Vázquez-Belda, B.; Domínguez, H.; Torres, M.D.; et al. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition: In Vitro Digestibility, Caecal Fermentability, and Microbial Inhibitory Activity of Seven Macroalgae Species from Galicia (NW Spain). *Agriculture* **2023**, *13*, doi:10.3390/agriculture13101995.

188. Taboada, C.; Millan, R.; Miguez, I. Evaluation of Marine Algae Undaria Pinnatifida and Porphyra Purpurea as a Food Supplement: Composition, Nutritional Value and Effect of Intake on

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Intestinal, Hepatic and Renal Enzyme Activities in Rats. *J Sci Food Agric* **2013**, *93*, 1863–1868, doi:10.1002/jsfa.5981.

189. Laramore, S.E.; Wills, P.S.; Hanisak, M.D. Seasonal Variation in the Nutritional Profile of Ulva Lactuca Produced in a Land-Based IMTA System. *Aquaculture International* **2022**, *30*, 3067–3079, doi:10.1007/s10499-022-00950-3.

190. Martone, P.T.; Estevez, J.M.; Lu, F.; Ruel, K.; Denny, M.W.; Somerville, C.; Ralph, J. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology* **2009**, *19*, 169–175, doi:10.1016/j.cub.2008.12.031.

191. Fernández-Segovia, I.; Lerma-García, M.J.; Fuentes, A.; Barat, J.M. Characterization of Spanish Powdered Seaweeds: Composition, Antioxidant Capacity and Technological Properties. *Food Research International* **2018**, *111*, 212–219, doi:10.1016/j.foodres.2018.05.037.

192. Rouxel, C.; Crouan, K. Variations de La Composition Chimique de l'algue Brune Himanthalia Elongata (L.) Gray Durant Le Printemps. *Acta Botanica Gallica* **1995**, *142*, 109–118, doi:10.1080/12538078.1995.10515696.

193. Gudiel Urbano, M.; Goñi, I. Bioavailability of Nutrients in Rats Fed on Edible Seaweeds, Nori (Porphyra Tenera) and Wakame (Undaria Pinnatifida), as a Source of Dietary Fibre. *Food Chem* **2002**, *76*, 281–286.

194. Neto, R.T.; Marçal, C.; Queirós, A.S.; Abreu, H.; Silva, A.M.S.; Cardoso, S.M. Screening of Ulva Rigida, Gracilaria Sp., Fucus Vesiculosus and Saccharina Latissima as Functional Ingredients. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19102987.

195. Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. Dietary Fibre and Physicochemical Properties of Edible Spanish Seaweeds. *Eur Food Res Technol* **2001**, *212*, 349–354.

196. Rupérez, P.; Ahrazem, O.; Leal, J.A. Potential Antioxidant Capacity of Sulfated Polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed Fucus Vesiculosus. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 840–845, doi:10.1021/jf010908o.

197. Lopez-Santamarina, A.; Miranda, J.M.; Del Carmen Mondragon, A.; Lamas, A.; Cardelle-Cobas, A.; Franco, C.M.; Cepeda, A. Potential Use of Marine Seaweeds as Prebiotics: A Review. *Molecules* **2020**, *25*, 1–26, doi:10.3390/molecules25041004.

198. Zheng, L.X.; Chen, X.Q.; Cheong, K.L. Current Trends in Marine Algae Polysaccharides: The Digestive Tract, Microbial Catabolism, and Prebiotic Potential. *Int J Biol Macromol* 2020, *151*, 344–354.

199. Juul, L.; Stødkilde, L.; Ingerslev, A.K.; Bruhn, A.; Jensen, S.K.; Dalsgaard, T.K. Digestibility of Seaweed Protein from Ulva Sp. and Saccharina Latissima in Rats. *Algal Res* **2022**, *63*, doi:10.1016/j.algal.2022.102644.

200. Kazir, M.; Abuhassira, Y.; Robin, A.; Nahor, O.; Luo, J.; Israel, A.; Golberg, A.; Livney, Y.D. Extraction of Proteins from Two Marine Macroalgae, Ulva Sp. and Gracilaria Sp., for Food Application, and Evaluating Digestibility, Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of the Protein Concentrates. *Food Hydrocoll* **2019**, *87*, 194–203, doi:10.1016/j.foodhyd.2018.07.047.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

201. Schiener, P.; Black, K.D.; Stanley, M.S.; Green, D.H. The Seasonal Variation in the Chemical Composition of the Kelp Species Laminaria Digitata, Laminaria Hyperborea, Saccharina Latissima and Alaria Esculenta. *J Appl Phycol* **2015**, *27*, 363–373, doi:10.1007/s10811-014-0327-1.

202. Sharma, S.; Horn, S.J. Enzymatic Saccharification of Brown Seaweed for Production of Fermentable Sugars. *Bioresour Technol* **2016**, *213*, 155–161, doi:10.1016/j.biortech.2016.02.090.

203. Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Gómez-Conde, M.S.; García, J. Effect of Type of Fiber, Site of Fermentation, and Method of Analysis on Digestibility of Soluble and Insoluble Fiber in Rabbits. *J Anim Sci* **2015**, *93*, 2860–2871, doi:10.2527/jas.2014-8767.

204. Kellogg, J.; Grace, M.H.; Lila, M.A. Phlorotannins from Alaskan Seaweed Inhibit Carbolytic Enzyme Activity. *Mar Drugs* **2014**, *12*, 5277–5294, doi:10.3390/md12105277.

205. de la Moneda, A.; Carro, M.D.; Weisbjerg, M.R.; Roleda, M.Y.; Lind, V.; Novoa-Garrido, M.; Molina-Alcaide, E. Variability and Potential of Seaweeds as Ingredients of Ruminant Diets: An in Vitro Study. *Animals* **2019**, *9*, doi:10.3390/ani9100851.

206. Pandey, D.; Hansen, H.H.; Dhakal, R.; Aryal, N.; Rai, S.P.; Sapkota, R.; Nielsen, M.O.; Novoa-Garrido, M.; Khanal, P. Interspecies and Seasonal Variations in Macroalgae from the Nordic Region: Chemical Composition and Impacts on Rumen Fermentation and Microbiome Assembly. *J Clean Prod* **2022**, *363*, doi:10.1016/j.jclepro.2022.132456.

207. Sweeney, T.; Dillon, S.; Fanning, J.; Egan, J.; O'Shea, C.J.; Figat, S.; Gutierrez, J.J.M.; Mannion, C.; Leonard, F.; O'Doherty, J. V. Evaluation of Seaweed-Derived Polysaccharides on Indices of Gastrointestinal Fermentation and Selected Populations of Microbiota in Newly Weaned Pigs Challenged with Salmonella Typhimurium. *Anim Feed Sci Technol* **2011**, *165*, 85–94, doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.02.010.

208. Guilloteau, P.; Martin, L.; Eeckhaut, V.; Ducatelle, R.; Zabielski, R.; Van Immerseel, F. From the Gut to the Peripheral Tissues: The Multiple Effects of Butyrate. *Nutr Res Rev* **2010**, *23*, 366–384, doi:10.1017/S0954422410000247.

209. Jiménez-Escrig, A.; Gómez-Ordóñez, E.; Tenorio, M.D.; Rupérez, P. Antioxidant and Prebiotic Effects of Dietary Fiber Co-Travelers from Sugar Kombu in Healthy Rats. *J Appl Phycol* **2013**, *25*, 503–512, doi:10.1007/s10811-012-9884-3.

210. Seong, H.; Bae, J.H.; Seo, J.S.; Kim, S.A.; Kim, T.J.; Han, N.S. Comparative Analysis of Prebiotic Effects of Seaweed Polysaccharides Laminaran, Porphyran, and Ulvan Using in Vitro Human Fecal Fermentation. *J Funct Foods* **2019**, *57*, 408–416, doi:10.1016/j.jff.2019.04.014.

211. Lynch, M.B.; Sweeney, T.; Callan, J.J.; O'Sullivan, J.T.; O'Doherty, J. V. The Effect of Dietary Laminaria Derived Laminarin and Fucoidan on Intestinal Microflora and Volatile Fatty Acid Concentration in Pigs. *Livest Sci* **2010**, *133*, 157–160, doi:10.1016/j.livsci.2010.06.052.

212. Devillé, C.; Gharbi, M.; Dandrifosse, G.; Peulen, O. Study on the Effects of Laminarin, a Polysaccharide from Seaweed, on Gut Characteristics. *J Sci Food Agric* **2007**, *87*, 1717–1725, doi:10.1002/jsfa.2901.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

213. Ibtissam, C.; Hassane, R.; José, M.L.; Francisco, D.S.J.; Antonio, G.V.J.; Hassan, B.; Mohamed, K. Screening of Antibacterial Activity in Marine Green and Brown Macroalgae from the Coast of Morocco. *Afr J Biotechnol* **2009**, *8*, 1258–1262.

214. Silva, A.; Rodrigues, C.; Garcia-Oliveira, P.; Lourenço-Lopes, C.; Silva, S.A.; Garcia-Perez, P.; Carvalho, A.P.; Domingues, V.F.; Barroso, M.F.; Delerue-Matos, C.; et al. Screening of Bioactive Properties in Brown Algae from the Northwest Iberian Peninsula. *Foods* **2021**, *10*, 1–14, doi:10.3390/foods10081915.

215. Muñoz, R.A.; Santome, S.; León, J.Q. Antibacterial Activity of Hexane and Ethanolic Extracts of Marine Macroalgae of the Bay of Ancón, Lima – Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* **2020**, *31*, 1–14, doi:10.15381/rivep.v31i2.17829.

216. INRA-CIRAC-AFZ Feed Tables (2017-2021).

217. Bhanderi, B.M.; Goswami, A.; Garg, M.R.; Samanta, S. Study on Minerals Status of Dairy Cows and Their Supplementation through Area Specific Mineral Mixture in the State of Jharkhand. *J Anim Sci Technol* **2016**, *58*, doi:10.1186/s40781-016-0124-2.

218. Romarís-Hortas, V.; García-Sartal, C.; Barciela-Alonso, M. del C.; Domínguez-González, R.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, P. Bioavailability Study Using an In-Vitro Method of Iodine and Bromine in Edible Seaweed. *Food Chem* **2011**, *124*, 1747–1752, doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.117.

219. López-Alonso, M. Animal Feed Contamination by Toxic Metals. In *Animal Feed Contamination: Effects on Livestock and Food Safety*; Woodhead Publishing, 2012; pp. 183–204 ISBN 9781845697259.

220. Almela, C.; Algora, S.; Benito, V.; Clemente, M.J.; Devesa, V.; Súñer, M.A.; Vélez, D.; Montoro, R. Heavy Metal, Total Arsenic, and Inorganic Arsenic Contents of Algae Food Products. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 918–923, doi:10.1021/jf0110250.

221. Almela, C.; Jesús Clemente, M.; Vélez, D.; Montoro, R. Total Arsenic, Inorganic Arsenic, Lead and Cadmium Contents in Edible Seaweed Sold in Spain. *Food and Chemical Toxicology* **2006**, *44*, 1901–1908, doi:10.1016/j.fct.2006.06.011.

222. Rose, M.; Lewis, J.; Langford, N.; Baxter, M.; Origgi, S.; Barber, M.; MacBain, H.; Thomas, K. Arsenic in Seaweed-Forms, Concentration and Dietary Exposure. *Food and Chemical Toxicology* **2007**, *45*, 1263–1267, doi:10.1016/j.fct.2007.01.007.

223. Camurati, J.R.; Salomone, V.N. Arsenic in Edible Macroalgae: An Integrated Approach. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **2020**, *23*, 1–12, doi:10.1080/10937404.2019.1672364.

224. Suttle, N.F. *Mineral Nutrition of Livestock*; 4th Edition.; CABI: Cambridge, UK, 2010;

225. Walsh, A.M.; Sweeney, T.; O'Shea, C.J.; Doyle, D.N.; O'Doherty, J. V. Effect of Supplementing Varying Inclusion Levels of Laminarin and Fucoidan on Growth Performance, Digestibility of Diet Components, Selected Faecal Microbial Populations and Volatile Fatty Acid Concentrations in Weaned Pigs. *Anim Feed Sci Technol* **2013**, *183*, 151–159, doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.013.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

226. Coudert, P.; Jobert, J.L.; Larour, G.; Guittet, M. Relation Entre l' Entéropathie Épizootique Du Lapin (EEL) et l'infestation Par Les Coccidies : Enquête Épidémiologique. In Proceedings of the 10émes Journées de la Recherche Cunicole; Paris, November 19 2003; pp. 239–242.

227. Percy, D.H.; Barthold, S.W. Chapter 6. Rabbit. In *Pathology of laboratory rodents and rabbits*; John Wiley & Sons, 2013; pp. 253–307.

228. Maxie, M.G. Chapter 1: Alimentary System. In *Jubb, Kennedy & Palmer´s pathology of domestic animals*; Elsevier Health Sciences, 2015; Vol. 2, pp. 60–242.

229. Choi, Y.; Hosseindoust, A.; Goel, A.; Lee, S.; Jha, P.K.; Kwon, I.K.; Chae, B.J. Effects of Ecklonia Cava as Fucoidan-Rich Algae on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Intestinal Morphology and Caecal Microflora in Weanling Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci* **2017**, *30*, 64–70, doi:10.5713/ajas.16.0102.

230. Sweeney, T.; O'Doherty, J. V. Marine Macroalgal Extracts to Maintain Gut Homeostasis in the Weaning Piglet. *Domest Anim Endocrinol* **2016**, *56*, S84–S89, doi:10.1016/j.domaniend.2016.02.002.

231. Chen, S.; Luo, S.; Yan, C. Gut Microbiota Implications for Health and Welfare in Farm Animals: A Review. *Animals* **2022**, *12*, doi:10.3390/ani12010093.

232. Hu, X.; Wang, F.; Yang, S.; Yuan, X.; Yang, T.; Zhou, Y.; Li, Y. Rabbit Microbiota across the Whole Body Revealed by 16S RRNA Gene Amplicon Sequencing. *BMC Microbiol* **2021**, *21*, doi:10.1186/s12866-021-02377-x.

233. Combes, S.; Michelland, R.J.; Monteils, V.; Cauquil, L.; Soulié, V.; Tran, N.U.; Gidenne, T.; Fortun-Lamothe, L. Postnatal Development of the Rabbit Caecal Microbiota Composition and Activity. *FEMS Microbiol Ecol* **2011**, *77*, 680–689, doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01148.x.

234. Brinig, M.M.; Lepp, P.W.; Ouverney, C.C.; Armitage, G.C.; Relman, D.A. Prevalence of Bacteria of Division TM7 in Human Subgingival Plaque and Their Association with Disease. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 1687–1694, doi:10.1128/AEM.69.3.1687-1694.2003.

235. Hugenholtz, P.; Tyson, G.W.; Webb, R.I.; Wagner, A.M.; Blackall, L.L. Investigation of Candidate Division TM7, a Recently Recognized Major Lineage of the Domain Bacteria, with No Known Pure-Culture Representatives. *Appl Environ Microbiol* **2001**, *67*, 411–419, doi:10.1128/AEM.67.1.411-419.2001.

236. Kumar, P.S.; Griffen, A.L.; Barton, J.A.; Paster, B.J.; Moeschberger, M.L.; Leys, E.J. New Bacterial Species Associated with Chronic Periodontitis. *J Dent Res* **2003**, *82*, 338–344, doi:10.1177/154405910308200503.

237. Ouverney, C.C.; Armitage, G.C.; Relman, D.A. Single-Cell Enumeration of an Uncultivated TM7 Subgroup in the Human Subgingival Crevice. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 6294–6298, doi:10.1128/AEM.69.10.6294-6298.2003.

238. Kuehbacher, T.; Rehman, A.; Lepage, P.; Hellmig, S.; Fölsch, U.R.; Schreiber, S.; Ott, S.J. Intestinal TM7 Bacterial Phylogenies in Active Inflammatory Bowel Disease. *J Med Microbiol* **2008**, *57*, 1569–1576, doi:10.1099/jmm.0.47719-0.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

239. Hu, C.; Rzymski, P. Non-Photosynthetic Melainabacteria (Cyanobacteria) in Human Gut: Characteristics and Association with Health. *Life* **2022**, *12*, doi:10.3390/life12040476.

240. Cox, P.A.; Banack, S.A.; Murch, S.J.; Rasmussen, U.; Tien, G.; Bidigare, R.R.; Metcalf, J.S.; Morrison, L.F.; Codd, G.A.; Bergman, B. Diverse Taxa of Cyanobacteria Produce-N-Methylamino-L-Alanine, a Neurotoxic Amino Acid. *PNAS* **2005**, *102*, 5074–5078.

241. Zhang, X.Y.; Sukhchuluun, G.; Bo, T.B.; Chi, Q.S.; Yang, J.J.; Chen, B.; Zhang, L.; Wang, D.H. Huddling Remodels Gut Microbiota to Reduce Energy Requirements in a Small Mammal Species during Cold Exposure. *Microbiome* **2018**, *6*, doi:10.1186/s40168-018-0473-9.

242. Shi, T.T.; Xin, Z.; Hua, L.; Wang, H.; Zhao, R.X.; Yang, Y.L.; Xie, R.R.; Liu, H.Y.; Yang, J.K. Comparative Assessment of Gut Microbial Composition and Function in Patients with Graves' Disease and Graves' Orbitopathy. *J Endocrinol Invest* **2021**, *44*, 297–310, doi:10.1007/s40618-020-01298-2.

243. Palmas, V.; Pisanu, S.; Madau, V.; Casula, E.; Deledda, A.; Cusano, R.; Uva, P.; Vascellari, S.; Loviselli, A.; Manzin, A.; et al. Gut Microbiota Markers Associated with Obesity and Overweight in Italian Adults. *Sci Rep* **2021**, *11*, doi:10.1038/s41598-021-84928-w.

244. Ulluwishewa, D.; Anderson, R.C.; McNabb, W.C.; Moughan, P.J.; Wells, J.M.; Roy, N.C. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *Journal of Nutrition* **2011**, *141*, 769–776, doi:10.3945/jn.110.135657.

245. Wang, Z.; Zeng, B.; Xue, H.; Liu, C.; Song, W. Blidingia Sp. Extracts Improve Intestinal Health and Reduce Diarrhoea in Weanling Piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **2023**, *107*, 1198–1205, doi:10.1111/jpn.13832.

246. Al-Soufi, S.; Cegarra, E.; Buján, M.; Sevilla, L.; Muiños, A.; Nicodemus, N.; López-Alonso, M.; García, J. Efecto de La Inclusión En El Pienso de Saccharina Latissima, Ulva Lactuca y Su Extracto Sobre Los Rendimientos Productivos de Gazapos En Crecimiento. In Proceedings of the Proceedings of the 48 Symposium de Cunicultura de ASESCU. ; Córdoba, Spain, 2024.

247. Hernández, P.; Dalle Zotte, A. Influence of Diet on Rabbit Meat Quality . In *Nutrition of the rabbit*; De Blas, C., Wiseman, J., Eds.; CABI publishing: Wallingford, United Kingdom, 2020; pp. 172–192.

248. Combes, S. Nutritional Value of Rabbit Meat. *Productions Animales* **2004**, *17*, 373–383.

249. Gondret, F.; Mourot, J.; Lebas, F.; Bonneau, M. Effects of Dietary Fatty Acids on Lipogenesis and Lipid Traits in Muscle, Adipose Tissue and Liver of Growing Rabbits. *Animal Science* **1998**, *66*, 483–489, doi:10.1017/S1357729800009656.

250. Cavani, C.; Bianchi, M.; Lazzaroni, C.; Luzi, F.; Minelli, G.; Petracci, M. Influence of Type of Rearing, Slaughter Age and Sex on Fattening Rabbit: II Meat Quality. *World Rabbit Science* **2000**, *8*, 567–572.

251. Gondret, F.; Mourot, J.; Bonneau, M. *Developmental Changes in Lipogenic Enzymes in Muscle Compared to Liver and Extramuscular Adipose Tissues in the Rabbit (Oryctolagus Cuniculus)*; 1997; Vol. 117;.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

252. Dalle Zotte, A. Main Factors Influencing the Rabbit Carcass and Meat Quality. *World Rabbit Science* **2000**, *8*, 507–537.

253. Madeira, M.S.; Lopes, P.A.; Costa, P.; Coelho, D.; Alfaia, C.M.; Prates, J.A.M. Reduced Protein Diets Increase Intramuscular Fat of Psoas Major, a Red Muscle, in Lean and Fatty Pig Genotypes. *Animal* **2017**, *11*, 2094–2102, doi:10.1017/S1751731117000921.

254. Madeira, M.S.; Costa, P.; Alfaia, C.M.; Lopes, P.A.; Bessa, R.J.B.; Lemos, J.P.C.; Prates, J.A.M. The Increased Intramuscular Fat Promoted by Dietary Lysine Restriction in Lean but Not in Fatty Pig Genotypes Improves Pork Sensory Attributes. *J Anim Sci* **2013**, *91*, 3177–3187, doi:10.2527/jas.2012-5424.

255. Pla, M. A Comparison of the Carcass Traits and Meat Quality of Conventionally and Organically Produced Rabbits. *Livest Sci* **2008**, *115*, 1–12, doi:10.1016/j.livsci.2007.06.001.

256. Trombetti, F.; Minardi, P.; Mordenti, A.L.; Badiani, A.; Ventrella, V.; Albonetti, S. The Evaluation of the Effects of Dietary Vitamin E or Selenium on Lipid Oxidation in Rabbit Hamburgers: Comparing TBARS and Hexanal SPME-GC Analyses. *Foods* **2022**, *11*, doi:10.3390/foods11131911.

257. Lo Fiego, D.P.; Santoro, P.; Macchioni, P.; Mazzoni, D.; Piattoni, F.; Tassone, F.; De Leonibus, E. The Effect of Dietary Supplementation of Vitamins C and E on the α-Tocopherol Content of Muscles, Liver and Kidney, on the Stability of Lipids, and on Certain Meat Quality Parameters of the Longissimus Dorsi of Rabbits. *Meat Sci* **2004**, *67*, 319–327, doi:10.1016/j.meatsci.2003.11.004.

258. Mattioli, S.; Dal Bosco, A.; Szendrő, Z.; Cullere, M.; Gerencsér, Z.; Matics, Z.; Castellini, C.; Dalle Zotte, A. The Effect of Dietary Digestarom® Herbal Supplementation on Rabbit Meat Fatty Acid Profile, Lipid Oxidation and Antioxidant Content. *Meat Sci* **2016**, *121*, 238–242, doi:10.1016/j.meatsci.2016.06.024.

259. Mattioli, S.; Dal Bosco, A.; Duarte, J.M.M.; D'Amato, R.; Castellini, C.; Beone, G.M.; Fontanella, M.C.; Beghelli, D.; Regni, L.; Businelli, D.; et al. Use of Selenium-Enriched Olive Leaves in the Feed of Growing Rabbits: Effect on Oxidative Status, Mineral Profile and Selenium Speciation of Longissimus Dorsi Meat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2019**, *51*, 98–105, doi:10.1016/j.jtemb.2018.10.004.

260. Liu, H.W.; Gai, F.; Gasco, L.; Brugiapaglia, A.; Lussiana, C.; Guo, K.J.; Tong, J.M.; Zoccarato, I. Effects of Chestnut Tannins on Carcass Characteristics, Meat Quality, Lipid Oxidation and Fatty Acid Composition of Rabbits. *Meat Sci* **2009**, *83*, 678–683, doi:10.1016/j.meatsci.2009.08.003.

261. Dabbou, S.; Gai, F.; Renna, M.; Rotolo, L.; Dabbou, S.; Lussiana, C.; Kovitvadhi, A.; Brugiapaglia, A.; De Marco, M.; Helal, A.N.; et al. Inclusion of Bilberry Pomace in Rabbit Diets: Effects on Carcass Characteristics and Meat Quality. *Meat Sci* **2017**, *124*, 77–83, doi:10.1016/j.meatsci.2016.10.013.

262. Michalak, I.; Tiwari, R.; Dhawan, M.; Alagawany, M.; Farag, M.R.; Sharun, K.; Emran, T. Bin; Dhama, K. Antioxidant Effects of Seaweeds and Their Active Compounds on Animal Health and Production–a Review. *Veterinary Quarterly* **2022**, *42*, 48–67, doi:10.1080/01652176.2022.2061744.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

263. Dalle Zotte, A. Perception of Rabbit Meat Quality and Major Factors Influencing the Rabbit Carcass and Meat Quality. *Livest Prod Sci* **2002**, *75*, 11–32, doi:10.1016/S0301-6226(01)00308-6.

264. Nutautaitė, M.; Racevičiūtė-Stupelienė, A.; Bliznikas, S.; Vilienė, V. Enhancement of Rabbit Meat Functionality by Replacing Traditional Feed Raw Materials with Alternative and More Sustainable Freshwater Cladophora Glomerata Macroalgal Biomass in Their Diets. *Foods* **2023**, *12*, doi:10.3390/foods12040744.

265. D'Arco, G.; Blasi, F.; Cossignani, L.; Di Giacomo, F.; Ciavardelli, D.; Ventura, F.; Scipioni, S.; Simonetti, M.S.; Damiani, P. Composition of Meat and Offal from Weaned and Fattened Rabbits and Results of Stereospecific Analysis of Triacylglycerols and Phosphatidylcholines. *J Sci Food Agric* **2012**, *92*, 952–959, doi:10.1002/jsfa.4676.

266. Peiretti, P.G.; Meineri, G. Effects of Diets with Increasing Levels of Spirulina Platensis on the Carcass Characteristics, Meat Quality and Fatty Acid Composition of Growing Rabbits. *Livest Sci* **2011**, *140*, 218–224, doi:10.1016/j.livsci.2011.03.031.

267. Vlaeminck, B.; Fievez, V.; Cabrita, A.R.J.; Fonseca, A.J.M.; Dewhurst, R.J. Factors Affecting Odd- and Branched-Chain Fatty Acids in Milk: A Review. *Anim Feed Sci Technol* 2006, *131*, 389–417.

268. Papadomichelakis, G.; Karagiannidou, A.; Anastasopoulos, V.; Fegeros, K. Effect of Dietary Soybean Oil Addition on the Odd-Numbered and Branched-Chain Fatty Acids in Rabbit Meat. *Meat Sci* **2010**, *86*, 264–269, doi:10.1016/j.meatsci.2010.04.012.

269. Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Nicodemus, N.; Villamide, M.J.; Ruiz-López, N.; Carabaño, R.; Menoyo, D.; García, J. Effect of Level of Soluble Fiber and N-6/n-3 Fatty Acid Ratio on Performance of Rabbit Does and Their Litters. *J Anim Sci* **2018**, *96*, 1084–1100, doi:10.1093/jas/sky019.

270. Hermida, M.; Gonzalez, M.; Miranda, M.; Rodríguez-Otero, J.L. Mineral Analysis in Rabbit Meat from Galicia (NW Spain). *Meat Sci* **2006**, *73*, 635–639, doi:10.1016/j.meatsci.2006.03.004.

271. Suttle, N.F. *Mineral Nutrition of Livestock*; 5th Edition.; CABI: Cambridge, UK, 2022;

272. Van Ryssen, J.B.J.; Van Malsen, P.S.M.; Hartmann, F. Contribution of Dietary Sulphur to the Interaction between Selenium and Copper in Sheep. *Journal of Agricultural Science* **1998**, *130*, 107–114, doi:10.1017/S0021859697005030.

273. Sánchez-Moya, T.; Martínez-Hernández, V.M.; López-Nicolás, R.; González-Bermúdez, C.A.; Ros-Berruezo, G.; Frontela-Saseta, C. Effect of Soaking and Inositol Phosphate Content on in Vitro Mineral Availability in Edible Seaweeds. *J Appl Phycol* **2019**, *31*, 1981–1989, doi:10.1007/s10811-018-1677-x.

274. García-Casal, M.N.; Pereira, A.C.; Leets, I.; Ramírez, J.; Quiroga, M.F. High Iron Content and Bioavailability in Humans from Four Species of Marine Algae. *J. Nutr* **2007**, *137*, 2691–2695.

275. Oliveira, M.N. de; Freitas, A.L.P.; Carvalho, A.F.U.; Sampaio, T.M.T.; Farias, D.F.; Alves Teixeira, D.I.; Gouveia, S.T.; Pereira, J.G.; Sena, M.M. de C.C. de Nutritive and Non-Nutritive Attributes of Washed-up Seaweeds from the Coast of Ceará, Brazil. *Food Chem* **2009**, *115*, 254–259, doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.004.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

276. Lu, L.; Liao, X. dong; Luo, X. gang Nutritional Strategies for Reducing Nitrogen, Phosphorus and Trace Mineral Excretions of Livestock and Poultry. *J Integr Agric* 2017, *16*, 2815–2833.

277. Valenzuela, C.; De Romaña, D.L.; Schmiede, C.; Morales, M.S.; Olivares, M.; Pizarro, F. Total Iron, Heme Iron, Zinc, and Copper Content in Rabbit Meat and Viscera. *Biol Trace Elem Res* **2011**, *143*, 1489–1496, doi:10.1007/s12011-011-8989-x.

278. Windisch, W. Interaction of Chemical Species with Biological Regulation of the Metabolism of Essential Trace Elements. In Proceedings of the Fresenius' Journal of Analytical Chemistry; Springer Verlag, 2002; Vol. 372, pp. 421–425.

279. He, M.L.; Hollwich, W.; Rambeck, W.A. Supplementation of Algae to the Diet of Pigs: A New Possibility to Improve the Iodine Content in the Meat. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **2002**, *86*, 97–104, doi:10.1046/j.1439-0396.2002.00363.x.

280. Pestana, J.M.; Alfaia, C.M.; Ribeiro, D.M.; Costa, M.M.; Carvalho, D.F.P.; Martins, C.F.; Alves, V.M.D.; Lemos, J.P.C.; Mourato, M.; Delgado, I.; et al. Enhancing Meat Quality of Weaned Piglets with the Dietary Incorporation of Ulva Lactuca and Carbohydrases Supplementation. *Meat Sci* **2023**, *205*, doi:10.1016/j.meatsci.2023.109306.

281. Ramalho Ribeiro, A.; Gonçalves, A.; Bandarra, N.; Nunes, M.L.; Dinis, M.T.; Dias, J.; Rema, P. Natural Fortification of Trout with Dietary Macroalgae and Selenised-Yeast Increases the Nutritional Contribution in Iodine and Selenium. *Food Research International* **2017**, *99*, 1103–1109, doi:10.1016/j.foodres.2016.10.030.

282. Grabež, V.; Devle, H.; Kidane, A.; Mydland, L.T.; Øverland, M.; Ottestad, S.; Berg, P.; Kåsin, K.; Ruud, L.; Karlsen, V.; et al. Sugar Kelp (Saccharina Latissima) Seaweed Added to a Growing-Finishing Lamb Diet Has a Positive Effect on Quality Traits and on Mineral Content of Meat. *Foods* **2023**, *12*, doi:10.3390/foods12112131.

283. Moreda-Piñeiro, J.; Moreda-Piñeiro, A.; Romarís-Hortas, V.; Domínguez-González, R.; Alonso-Rodríguez, E.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D.; Bermejo-Barrera, P. Trace Metals in Marine Foodstuff: Bioavailability Estimation and Effect of Major Food Constituents. *Food Chem* **2012**, *134*, 339–345, doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.165.

284. Gailer, J.; George, G.N.; Pickering, I.J.; Prince, R.C.; Ringwald, S.C.; Pemberton, J.E.; Glass, R.S.; Younis, H.S.; DeYoung, D.W.; Aposhian, H.V. A Metabolic Link between Arsenite and Selenite: The Seleno-Bis(S- Glutathionyl) Arsinium Ion. *J Am Chem Soc* **2000**, *122*, 4637–4639, doi:10.1021/ja993064m.

285. Barbosa, V.; Maulvault, A.L.; Anacleto, P.; Santos, M.; Mai, M.; Oliveira, H.; Delgado, I.; Coelho, I.; Barata, M.; Araújo-Luna, R.; et al. Enriched Feeds with Iodine and Selenium from Natural and Sustainable Sources to Modulate Farmed Gilthead Seabream (Sparus Aurata) and Common Carp (Cyprinus Carpio) Fillets Elemental Nutritional Value. *Food and Chemical Toxicology* **2020**, *140*, doi:10.1016/j.fct.2020.111330.

286. Papadomichelakis, G.; Zoidis, E.; Pappas, A.C.; Danezis, G.; Georgiou, C.A.; Fegeros, K. Dietary Organic Selenium Addition and Accumulation of Toxic and Essential Trace Elements in Liver and Meat of Growing Rabbits. *Meat Sci* **2018**, *145*, 383–388, doi:10.1016/j.meatsci.2018.07.022.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

287. López-Alonso, M.; Benedito, J.L.; Miranda, M.; Castillo, C.; Hernandez, J.; Shore, R.F. Toxic and Trace Elements in Liver, Kidney and Meat from Cattle Slaughtered in Galicia (NW Spain). *Food Addit Contam* **2000**, *17*, 447–457, doi:10.1080/02652030050034028.

288. López-Alonso, M.; Miranda, M.; Castillo, C.; Hernández, J.; García-Vaquero, M.; Benedito, J.L. Toxic and Essential Metals in Liver, Kidney and Muscle of Pigs at Slaughter in Galicia, North-West Spain. *Food Addit Contam* **2007**, *24*, 943–954, doi:10.1080/02652030701216719.

289. EFSA CONTAM Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal* **2009**, *7*, doi:10.2903/j.efsa.2009.1351.

290. Pecoraro, B.M.; Leal, D.F.; Frias-De-Diego, A.; Browning, M.; Odle, J.; Crisci, E. The Health Benefits of Selenium in Food Animals: A Review. *J Anim Sci Biotechnol* 2022, *13*.

291. Trabazo, R.L.; Pérez, C. de L.; Castro Pérez, X.; Solla, P. Atlantic Diet. Nutrition and Gastronomy in Galicia. *Nutr Hosp* **2019**, *36*, 7–13, doi:10.20960/nh.02686.

292. Escriba-Perez, C.; Baviera-Puig, A.; Buitrago-Vera, J.; Montero-Vicente, L. Consumer Profile Analysis for Different Types of Meat in Spain. *Meat Sci* **2017**, *129*, 120–126, doi:10.1016/j.meatsci.2017.02.015.

293. Buitrago-Vera, J.; Escribá-Pérez, C.; Baviera-Puig, A.; Montero-Vicente, L. Consumer Segmentation Based on Food-Related Lifestyles and Analysis of Rabbit Meat Consumption. *World Rabbit Science* **2016**, *24*, 169–182, doi:10.4995/wrs.2016.4229.

294. Montero-Vicente, L.; Escribá-Pérez, C.; Baviera-Puig, A.; Buitrago-Vera, J. Analysis of the Commercial Value of Rabbit Meat Based on Positioning of the Different Types of Fresh Meat. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2018**, *16*, doi:10.5424/sjar/2018163-13407.

295. Gomant, F.; Beddiar, A. Etude Sur l'image de La Viande de Lapin et de La Filière Cunicole En 2018. *Cuniculture magazine* **2018**, *45*, 27–30.

296. Petrescu, D.C.; Petrescu-Mag, R.M. Consumer Behaviour Related to Rabbit Meat as Functional Food. *World Rabbit Science* **2018**, *26*, 321–333, doi:10.4995/wrs.2018.10435.

297. Bodnar, K.; Horvath, J. Consumers Opinion about Rabbit Meat Consumption in Hungary. In Proceedings of the 9th World Rabbit Congress; Verona, Italy, June 2008; pp. 1519–1522.

298. Ministerio de Agricultura, P. y Alimentación. MAPA (2022). Encuesta Sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE).

299. Petraci, M.; Cavani, C. Rabbit Meat Processing: Historical Perspective to Future Directions. *World Rabbit Science* **2013**, *21*, 217–226, doi:10.4995/wrs.2013.1329.

300. Camps, J. *Boletín de Cunicultura*. 1996, pp. 44–50.

301. Young, M.; Paul, N.; Birch, D.; Swanepoel, L. Factors Influencing the Consumption of Seaweed amongst Young Adults. *Foods* **2022**, *11*, doi:10.3390/foods11193052.

302. Losada-Lopez, C.; Dopico, D.C.; Faína-Medín, J.A. Neophobia and Seaweed Consumption: Effects on Consumer Attitude and Willingness to Consume Seaweed. *Int J Gastron Food Sci* **2021**, *24*, doi:10.1016/j.ijgfs.2021.100338.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

303. Kallas, Z.; Gil, J.M. A Dual Response Choice Experiments (DRCE) Design to Assess Rabbit Meat Preference in Catalonia: A Heteroscedastic Extreme-Value Model. *British Food Journal* **2012**, *114*, 1394–1413, doi:10.1108/00070701211262984.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# ANEXOS

## ANEXO I: Aprobación do Comité de Bioética e Certificados de Capacitación.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**INFORME QUE EMITE EL COMITÉ DE ÉTICA**

**DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

A petición de la Vicerrectora de Investigación, Innovación y Doctorado de la Universidad Politécnica de Madrid,

Dª Asunción Gómez Pérez, de un dictamen sobre los aspectos éticos del

Proyecto **"Técnicas Innovadoras para la Reducción de Antibióticos en Cunicultura"**, cuyo investigador principal es D. Javier García Alonso, del Laboratorio Producción Animal, en el Departamento de Producción Agraria El Comité emite el siguiente informe:

***El solicitante declara conocer los principios éticos y las normas legales que rigen las actividades de investigación y se compromete a respetar estos principios y normas en el desarrollo del estudio propuesto. Igualmente, se compromete a no modificar los protocolos de investigación y a solicitar una nueva autorización en caso de modificación.***

***El solicitante declara conocer la legislación vigente relativa a la experimentación con animales y se compromete a su cumplimiento.***

***El solicitante declara conocer y atenerse a lo dispuesto en la normativa legal vigente y en particular en la Ley 32/2007 de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, así como en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.***

Por lo tanto, no hay inconveniente en **informar favorablemente la propuesta**, recomendando el efectivo cumplimiento de los compromisos declarados.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Madrid a 24 de febrero de dos mil veintiuno.

La Presidenta del Comité

08821929A ASUNCION DE MARIA GOMEZ (R: Q2818015F)

Asunción Gómez Pérez

El Secretario del Comité

Firmado por DUEÑAS LOPEZ JUAN CARLOS - DNI 11802902S el día

Juan Carlos Dueñas López

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Doctorado
Ramiro de Maeztu, 7. 28040 Madrid Tel +34 91 06 70175 secretaria.adjunto.vinvestigacion@upm.es

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21·22

**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e otros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

| **1. IDENTIFICACIÓN** | | |
|---|---|---|
| 1.1. Apelidos / *Apellidos / Surname:* **AL-SOUFI NOVO** | | |
| 1.2. Nome / *Nombre / First names:* **SABELA** | | DNI /*DNI / Identity card number:* **34280597V** |
| 1.3. Categoría/*Categoría/Category:* **"a"** | 1.4. Especies/*Especies/Species* **Roedores y lagomorfos** | 1.5. Válido ata/ *válido hasta/expires:* **30/11/2029** |
| **2. Nº DO CERTIFICADO / *Nº DEL CE/R/IFICADO / CERTIFICATE NUMBER*** | | |
| **a337** | | |
| **3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / *ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:*** | | |
| 3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:* **AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA**<br>**CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA**<br>Rúa do Camiño Francés, 10 baixo<br>15781 Santiago de Compostela<br>A Coruña (España) | | |
| 3.2. Teléfono / *Teléfono / Telephone:* 981 546 657 | 3.3. Fax / *Fax / Fax:* 981 546 651 | 3.4. Correo electrónico / *Correo electrónico / Email:* formacion.cmrm@xunta.es |
| 3.5. Data / *Fecha / Date:* | 3.6. Lugar / *Lugar / Place:* **Santiago de Compostela** | |
| 3.7. Nome e sinatura / *Nombre y firma / Name and signature*<br>Santiago de Compostela, data da sinatura dixital<br><br>O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria<br>Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)<br>O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria<br><br>Manuel López Luaces | | |

Asinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe da Área
Data e hora: 23/02/2022 12:40:01

...ede.xunta.gal/cve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21-22

**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e otros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

| **1. IDENTIFICACIÓN** | | |
|---|---|---|
| 1.1. Apelidos/ *Apellidos / Surname:* **AL-SOUFI NOVO** | | |
| 1.2.Nome / *NoCmbre / First names:* **SABELA** | | DNI/*DNI / Identity card number:* **34280597V** |
| 1.3. Categoría/*Categoría/Category:* **"b"** | 1.4. Especies/*Especies/Species:* **Roedores y lagomorfos** | 1.5. Válido ata/ *válido hasta/expires:* **15/12/2029** |

| **2. Nº DO CERTIFICADO / *Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER*** |
|---|
| **b620** |

| **3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / *ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:*** | | |
|---|---|---|
| 3.1Nome e enderezo do organismo que expide o certificado/ *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:* **CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA**<br>**AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA**<br>Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo<br>15781 Santiago de Compostela<br>A Coruña (España) | | |
| 3.2.Teléfono / *Teléfono / Telephone:* 981 546 657 | 3.3.Fax / *Fax / Fax:* 981 546 651 | 3.4.Correo electrónico/ *Correo electrónico / Email:* formacion.cmrm@xunta.es |
| 3.5.Data / *Fecha / Date:* | 3.6.Lugar / *Lugar / Place:* **Santiago de Compostela** | |

Santiago de Compostela, data da sinatura dixital

O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria

Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)

O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria

Manuel López Luaces

Asinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe da Área
Data e hora: 22/02/2022 17:07:49

ón: https://sede.xunta.gal/cve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21·22

**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e otros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

| **1. IDENTIFICACIÓN** | | |
|---|---|---|
| 1.1 Apelidos/ *Apellidos / Surname:* **AL-SOUFI NOVO** | | |
| 1.2.Nome/ *Nombre / First names:* **SABELA** | | DNI/*DNI / Identity card number:* **34280597V** |
| 1.3.Categoría/*Categoría/Category:* **"C"** | 1.4. Especies/*Especies/Species:* **Roedores y lagomorfos** | 1.5. Válido ata/ *válido hasta/expires:* **22/12/2029** |
| **2. Nº DO CERTIFICADO /** ***Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER*** | | |
| **c662** | | |
| **3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO /** ***ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:*** | | |
| 3.1.Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:* **CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA**<br>**AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA**<br>Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo<br>15781 Santiago de Compostela<br>A Coruña (España) | | |
| 3.2.Teléfono / *Teléfono / Telephone:* 981 546 657 | 3.3.Fax / *Fax / Fax:* 981 546 651 | 3.4.Correo electrónico/ *Correo electrónico / Email:* formacion.cmrm@xunta.es |
| 3.5.Data / *Fecha / Date:* | 3.6.Lugar / *Lugar / Place:* **Santiago de Compostela** | |

Santiago de Compostela, data da sinatura dixital

O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria

Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)

O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria

Manuel López Luaces.

Ch1
https://rede.xunta.gal/cve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## ANEXO II: Lista de Verificación ARRIVE para experimentación animal.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Lista de verificación para Tese con animais de experimentación. **EXPERIMENTACIÓN ANIMAL ARRIVE**

| Si/non/NA | | páxina |
|---|---|---|
| | **Título** | |
| Si | Proporcionar unha descrición tan exacta e concisa como sexa posible sobre o contido do traballo. | Portada |
| | **Resumo** | |
| Si | Proporcionar un resumo preciso dos antecedentes, os obxectivos da investigación, incluíndo detalles da especie e cepa dos animais utilizados, métodos relevantes, achados principais e conclusións do estudo. | 14-15 |
| | **Antecedentes** | |
| Si | Incluír suficientes antecedentes científicos (incluíndo as referencias pertinentes ao traballo anterior) a fin de comprender a motivación e o contexto para o estudo, e explicar as bases e o enfoque experimental. | 24-37 |
| NA | Explicar como e por que a especie e o modelo animal utilizados permiten abordar os obxectivos científicos e, cando sexa apropiado, a relevancia do estudo para a bioloxía humana. | |
| | **Obxectivos** | |
| Si | Describir claramente os obxectivos primarios e secundarios do estudo, ou as hipóteses específicas que se van a probar. | 39-40 |
| | Declaración Ética | |
| Si | Indicar o permiso do comité ético, e as leis ou decretos pertinentes para o coidado e uso de animais, baixo as que se realiza a investigación. | 3, 173 |
| | Deseño do estudo | |
| Si | Número de grupos experimentais e control. | 43-67 |
| Si | Calquera medida adoptada para minimizar os efectos de sesgo subxectivo ao asignar os animais aos grupos de tratamento (por ex., procedemento aleatorio) e ao avaliar os resultados (por ex., si faise, describir quen eran cegos e cando). | 43-67 |
| Si | A unidade experimental (por ex., un só animal, grupos ou gaiolas de animais). Un diagrama cronolóxico ou de fluxo poden ser útiles para ilustrar como se realizaron os deseños de estudo complexos. | 43-67 |
| | Procedementos experimentais | |
| Si | Como (por ex., formulación e dose do tratamento, o sitio e a vía de administración, anestesia e analxesia utilizadas [incluíndo a monitorización], procedemento cirúrxico, o método de eutanasia). Proporcionar detalles de calquera equipo especializado utilizado, incluíndo provedor(é). | 43-67 |
| NA | Cando (por ex., a hora do día). | |
| NA | Onde (por ex., gaiola de aloxamento, laboratorio, proba do labirinto acuático). | |
| NA | Por que (por ex., fundamentos para a elección do anestésico específico, a vía de administración, dose do fármaco utilizado). | |
| | Animais de experimentación | |
| Si | Proporcionar detalles dos animais utilizados, incluíndo especie, cepa, sexo, etapa de desenvolvemento (por ej., idade media ou mediana de idade e rango) e peso (por ex., media ou mediana máis rango de peso). | 43-67 |

| | | |
|---|---|---|
| Si | Proporcionar outra información pertinente, como a procedencia dos animais, nomenclatura internacional da cepa, modificación xenética (por ex., animal deficiente ou transxénico), xenotipo, estado de saúde/inmune, si os animais foron incluídos en estudos ou recibido tratamentos anteriormente, procedementos previos, etc. | 43-67 |
| | Animais | |
| Si | Aloxamento (tipo de instalación por ex., libre de patóxenos específicos [SPF], tipo de gaiola ou habitáculo, material do leito, número de animais por gaiola, forma e material do tanque, etc. para peces). | 43-67 |
| Si | Condicións de cría (por ex., programa de reprodución, ciclo de luz/escuridade, temperatura, calidade de auga, etc. para peixes, o tipo de alimentación, o acceso aos alimentos e ao auga, enriquecemento ambiental). | 43-67 |
| NA | Avaliacións e intervencións relacionadas co benestar que se levaron a cabo antes, durante ou despois do experimento | |
| | Tamaño da mostra | |
| Si | Especificar o número total de animais utilizados en cada experimento, e o número de animais en cada grupo experimental. | 43-67 |
| Si | Explicar como se determinou o número de animais. Proporcionar detalles do cálculo do tamaño da mostra utilizado. | 43-67 |
| Si | Indicar o número de repeticións independentes de cada experimento, si é pertinente. | 43-67 |
| | Asignación de animais a grupos experimentais | |
| Si | Proporcionar detalles completos da forma en que os animais foron asignados a grupos experimentais, incluíndo distribución aleatoria ou asignación específica, si así se fixo. | 43-67 |
| NA | Describir a orde no que os animais nos diferentes grupos experimentais foron tratados e avaliados. | |
| NA | Resultados experimentais | |
| NA | Definir claramente os resultados primarios e secundarios avaliados (por ex., morte celular, marcadores moleculares, cambios de comportamento). | |
| | Métodos estatísticos | |
| Si | Proporcionar detalles sobre os métodos estatísticos utilizados para cada análise. | 59-67 |
| Si | Especificar a unidade de análise para cada grupo de datos (por ex., un só animal, grupo de animais, neurona individual). | 59-67 |
| SI | Describir os métodos utilizados para avaliar si os datos corroboran as suposicións do método estatístico. | 59-67 |
| | Datos basais | |
| Si | Para cada grupo experimental, indicar as características relevantes e estado de saúde dos animais (por ex., peso, estado microbiolóxico, se os animais foron incluídos en estudos ou recibido drogas anteriormente) antes de iniciar o tratamento ou proba. (Esta información pode ser a miúdo tabulada). | 59-67 |
| | Cantidades analizadas | |
| Si | Indicar o número de animais en cada grupo incluído en cada análise. Presentar números absolutos (por ex., 10/20, non 50 %). | 43-67 |
| NA | Se algún dos animais ou datos non foi incluído na análise, explicar por que. | |
| | **Resultados e Discusión** | |
| Si | Indicar os resultados de cada análise levada a cabo, cunha medida de precisión (por ex., erro estándar ou intervalo de confianza). | 72-127 |
| | Eventos adversos | |
| NA | Dar detalles de todos os eventos adversos importantes en cada grupo experimental. | |

| | | |
|---|---|---|
| NA | Describir as modificacións aos protocolos experimentais realizadas para reducir os eventos adversos. | |
| | Interpretación /implicacións científicas | |
| Si | Interpretar os resultados, tendo en conta os obxectivos e as hipóteses do estudo, a teoría actual e outros estudos pertinentes na literatura. | 72-127 |
| Si | Comentar as limitacións do estudo incluíndo calquera fonte potencial de sesgo, calquera limitación do modelo animal e a imprecisión asociada cos resultados | 72-127 |
| NA | Describir calquera implicación dos métodos experimentais ou achados para o remplazo, refinamento ou redución (as 3 R) do uso dos animais en investigación. | |
| | Capacidade de xeneralización/aplicabilidade | |
| Si | Comentar se, e de que forma, os achados deste estudo son aplicables a outras especies ou sistemas, incluíndo calquera relevancia para a bioloxía humana. | 72-127 |
| | Financiamento | |
| Si | Listar todas as fontes de financiamento (incluíndo o número do proxecto) e o papel da fonte(s) de financiamento no estudo. | 8 |

Baseado en The ARRIVE guidelines: Animal Research: Reporting of In vivo Experiments.

Sinatura Doutorando

Sabela Al-Soufi Novo

## ANEXO III: Permisos para reproducir contidos publicados

### Introdución e Capítulo I:

MDPI Open Access Information and Policy. All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of all articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low Article Processing Charge (APC) for accepted articles.

Permissions. No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

### Capítulo VI:

World Rabbit Science: Open Access Policy

This is an open access journal which means that all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles in this journal without asking prior permission from the publisher or the author. This is in accordance with the BOAI definition of open access.

Immediately after a manuscript is accepted and is ready to be published, the paper will be assigned a DOI number, and will be available in an open access format.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## ANEXO IV: Publicacións derivadas da Tese de Doutoramento

A continuación, achéganse as publicacións derivadas da presente Tese Doutoral, aquelas que foron aceptadas ou publicadas no momento do depósito. As publicacións mencionadas corresponden aos seguintes apartados da presente Tese Doutoral.

Publicación 1: Introdución.

Publicación 2: Capítulo I.

Publicación 3: Capítulo VI.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Publicación 1.**

Al-Soufi, S.; García, J.; Muíños, A.; López-Alonso, M. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming. Animals 2022, 12, 2346. https://doi.org/10.3390/ani12182346

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

animals

MDPI

*Review*

# Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming

**Sabela Al-Soufi [1,*], Javier García [2], Antonio Muíños [3] and Marta López-Alonso [1]**

[1] Departmento de Patoloxía Animal, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
[2] Departamento de Producción Agraria, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Agroalimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, C/Senda del Rey 18, 28040 Madrid, Spain
[3] Porto Muiños S.L., 15185 Cerceda, Spain
* Correspondence: sabelaalsoufi.novo@usc.es

**Simple Summary:** Commercial rabbit farming has faced critical challenges in the last few years, during which the ban on the prophylactic use of antibiotics in animal feed has added to the weakness of the production system and a decrease in consumption of rabbit meat. Considering the potential role of macroalgae as an alternative to the use of antibiotics in animal nutrition, this review paper aims to evaluate the use of macroalgae in rabbit farming. It specifically focuses on how macroalgae can be used sustainably to improve rabbit health as an economically viable alternative that could help guarantee the future of this high-value sector.

**Abstract:** The rabbit meat industry has faced critical challenges in the last few years, during which the ban on the prophylactic use of antibiotics in animal feed has added to the weakness of the production system and a decrease in consumption of rabbit meat. This review paper highlights the potential value of macroalgae in the rabbit farming sector as an alternative to the use of antibiotics to improve rabbit health. In line with sustainable agriculture programmes, the use of seaweed in rabbit nutrition may improve gut health according to the One Health approach, whereby consumers and the environment could receive tangible benefits. The inclusion of algae in animal feed has experimentally proven to help to reduce intestinal dysbiosis. However, further studies evaluating the prebiotic effects of algal components on gut health and also identifying the compounds directly responsible for the antimicrobial, antiviral, antioxidative and anti-inflammatory properties of algae are still needed. Furthermore, the inclusion of marine algae in rabbit food could potentially become a commercial marketing strategy that could attract new consumers who are concerned about environmental sustainability and who are looking for different, high-quality foods.

**Keywords:** macroalgae; seaweed; rabbit nutrition; alternative to antibiotics

check for updates

**Citation:** Al-Soufi, S.; García, J.; Muíños, A.; López-Alonso, M. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming. *Animals* **2022**, *12*, 2346. https://doi.org/10.3390/ani12182346

Academic Editor: Manuel Gonzalez-Ronquillo

Received: 5 August 2022
Accepted: 6 September 2022
Published: 8 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

Rabbit meat is less common than other types of meat (such as chicken, beef and pork) but is a valuable product in Mediterranean countries, where it was consumed by ancient civilizations and is still consumed in traditional gastronomy today [1]. The EU is the second world producer of rabbit meat (after China), with most production being concentrated in Spain, France and Italy [2]. Intensive rabbit farming became popular in these countries in the 1980s and led to a highly specialized industry, although there remain small farms still in need of modernization [2,3].

The rabbit farming industry is facing a critical, complex and challenging period characterised by structural weaknesses in the production systems and a gradual reduction in the consumption of meat (Figure 1) [2]. Within the farming systems, the main challenge is possibly to comply with the EU ban on the prophylactic use of antibiotics in animal production (Regulation (EC) No. 1831/2003). Similar to pig farming, rabbit production is

highly dependent on the use of medicated feed to control the high mortality rates caused by Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE), which is characterized by intestinal dysbiosis that severely affects rabbits in the post-weaning period [4,5]. In 2006, the EU banned the use of antibiotics as prophylactics and growth promoters and limited their indiscriminate use, in order to fight the emergence of antibiotic resistance (Regulation (EC) No. 1831/2003). However, the lack of alternatives to antibiotic-medicated feed is currently causing huge losses in farms, making production almost economically unsustainable [6,7]. Moreover, rabbit meat is mostly marketed as the whole carcass (with the head), and there are almost no processed products available for other more modern types of consumption. This presentation conflicts with the increasing perception of rabbits as pets and with the lack of habitual consumption of this meat by the younger population. In addition, rabbit meat is more expensive than other white meat, because of the higher production costs [1,2]. Finally, as with other intensive systems, consumers are increasingly concerned about the welfare of caged animals and about the environmental impact of farming practices, which are highly dependent on external outputs [8].

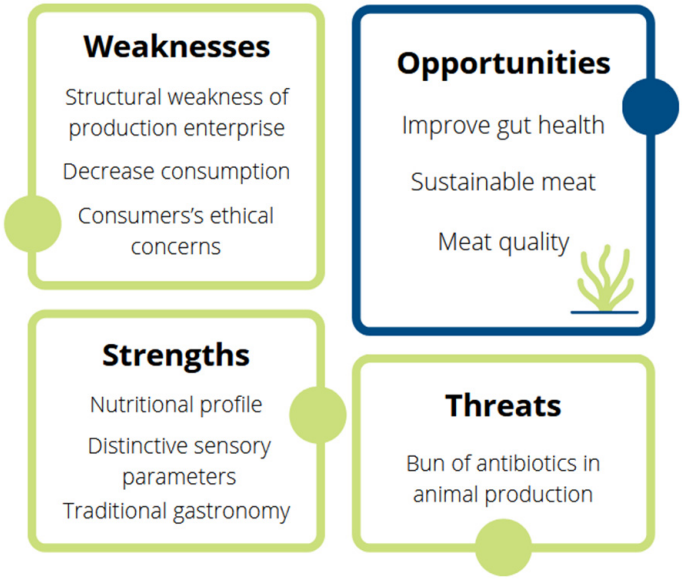



**Figure 1.** SWOT analysis of rabbit farming.

Overall, the rabbit farming sector urgently needs a comprehensive plan to respond to all of these challenges and thus to search for alternative and economically sustainable production systems in accordance with the emerging welfare standards, incorporating dietary strategies that can improve the intestinal health of rabbits after weaning to prevent serious mortalities due to ERE.

Including marine macroalgae in the rabbit diet may be an appropriate strategy in response to the aforementioned problems. Although scarcely used in this sector, algae have been experimentally tested in the diets of other livestock species (particularly pigs after weaning). The inclusion of algae in feed has experimentally proven to help to reduce intestinal dysbiosis in pigs and could potentially be an alternative in rabbit farming. Furthermore, the inclusion of marine algae in rabbit food could potentially become a commercial marketing strategy that could attract new consumers who are concerned about environmental sustainability and who are looking for different, high-quality foods; in this sense, it has already been demonstrated that the inclusion of algae in animal feed improves the quality of meat [9–12].

This review study aimed to evaluate the potential use of macroalgae in rabbit farming, particularly focusing on how including macroalgae in the rabbit diet could be a sustainable means for improving the health of rabbits via economically viable practices that could help to guarantee the future of this high-value sector.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 2. The Post-Weaning Period Is Critical in Rabbit Production

One of the critical stages in rabbit production is the post-weaning period, because of the numerous changes that animals undergo and the associated sensitivity at this point [13]. Weaning takes place usually around 35 days of age, but solid food intake increases gradually from day 15. During this period, important physiological changes occur due to the rapid change from a diet exclusively based on milk to the ingestion of large amounts of solid food and water. This transition is accompanied by several physiological adaptations of the digestive and immune system, which must respond to this new diet [14]. The digestive system transforms at many levels, i.e., gastric pH falls sharply from >5 to 1.6 around weaning; caecotrophy begins to develop at 3 weeks of age; the intestinal microbiota evolves continuously from the first days after birth [15]; therefore, fermentation starts in the caecum. The enzymatic system and thus the digestive capacity develop gradually, reaching optimal levels at 45–50 days of age. Microbial fermentative activity produces volatile fatty acids (VFAs), which contribute to changing the digestive conditions [14,16].

Gut microflora and gut mucosa, i.e., epithelial cells and gut-associated lymphoid tissues (GALTs), maintain a dynamic equilibrium that is particularly fragile in young rabbits. Microbiota stabilises after 30–40 days of age and is highly influenced by the diet [13]. The endogenous microbiota provides many benefits for the animal beyond the supply of a good profile of amino acids and VFAs. It acts as a barrier to pathogens by preventing their entry into epithelial cells, competing for resources and producing substances that maintain an unfavourable environment, such as VFAs and antimicrobial substances. It is also decisive for the development of digestive immunity, as it determines the primary antibody repertoire in GALTs at 4–8 weeks of age [13,17].

At this stage, rabbits are very susceptible to suffering from digestive dysbiosis, which is commonly caused by Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE), a syndrome already described many decades ago [18]. More recently, ERE appeared in France in 1996 and rapidly spread to other regions of Europe [4,19], currently being one of the most important pathologies in rabbit farm systems [6,20]. It causes morbidity up to 90% and high mortality rates (30–80%), mainly affecting young rabbits in the fattening period, between 6–8 weeks of age [4,21,22]. Rabbits are infected horizontally via oral–faecal and oral–oral contact [22]. Affected animals reduce their feed and water intake and present with a distended abdomen and mild diarrhoea [4,5,21,22]. Necropsy shows caecal impaction and the distension of the stomach and small intestine, which are filled with liquid and gas. Histologically, there are signs of inflammation and congestion [22], which are not observed macroscopically in any organ [4,21]. To date, no single species has been identified as the sole cause of the disease, but in most cases, specific strains of *Clostridium perfringens* are implicated, while others might participate in the control of the negative effects of ERE, such as specific strains of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides dorei* [5]. Nowadays, the aetiology of this syndrome is still not completely defined, and the participation or co-infection of different bacterial species is not discarded [6].

The high mortality and reduction in animal performance associated with ERE cause major losses in rabbit farm systems [6,19,20,23]. The disease has been controlled in the last few decades via treatment with antibiotics, mostly in the form of medicated feed [5]. However, antibiotics affect not only the pathogens but also the whole intestinal flora, causing imbalance and dysbiosis [22,24]. Reducing the use of antibiotics to prevent the emergence of resistance has become a priority strategy in the EU [25]. Research aimed at finding alternatives to antibiotics in rabbit farming is scarce compared with research involving other major sectors such as pigs or poultry. Consequently, rabbit breeding faces a major challenge in finding ways for maintaining production without using antibiotics. It is, therefore, necessary to be aware of the dietary and management requirements of rabbits in the post-weaning period to ensure intestinal balance [14,26].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## 3. Key Point: To Improve Gut Health

The limitations of the use of antibiotics in livestock feed has forced the animal feed industry to search for nutritional strategies, such as the inclusion of bioactive substances in the diet to improve animal health. The improvement of gut health has been shown to have the greatest potential to reduce the negative economic impact of reducing the administration of antibiotics during the post-weaning period. Thus, feed must be designed that is better adapted to the digestive physiology of the recently weaned rabbit with a digestive tract that is still developing, with great changes taking place in the intestinal microbiota.

Digestive development and capacity depend on the diet given to the young rabbit around weaning. At this time, young rabbits have special needs that differ from those of the mother [14,27]. Diet has a strong effect on gut environment and microflora [22], because it influences the establishment of flora and fermentation parameters, as well as the development of pathogens [14].

In recent years, studies involving different ingredients/nutrients and the effect they have on the gut barrier function, rabbit performance and mortality rate caused by digestive disorders have shown that different nutritional strategies have a positive effect in limiting ERE incidence. These nutritional strategies are related to the following: (a) minimal and maximal levels of insoluble fibre (30–36% neutral detergent fibre) with specific characteristics (>3.5% acid detergent lignin) [28–31]; (b) a minimum level of 12% of inclusion of soluble fibre [32–34]; (c) the type and level of protein included in the diet (14–16% crude protein, 0.5–1% glutamine; preference for sunflower and animal plasma proteins over soya, pea and potato proteins) [23,35–43]; (d) limiting the amount of calcium in the diet [44]; and (e) the use of some prebiotics such as cellobiose combined with a low level of soluble-fibre diet [45,46].

The positive effect of soluble fibre is usually obtained using sugar-beet pulp. The combination of both soluble and insoluble fermentable fibre of sugar-beet pulp has some beneficial effects on the intestinal mucosa in the post-weaning period, such increases in (i) the ratio between the villous height and crypt depth, (ii) the number of goblet cells per villus, (iii) sucrose activity in the jejunal mucosa and digestibility of starch in the ileum, and (iv) ileal flow of mucin [43,47–49]. However, it has not yet been confirmed whether these effects could also be obtained with other ingredients rich in soluble/fermentable fibre.

Another strategy related to feed management that usually has positive effects on rabbit health is feed restriction after weaning [50–53]. However, all of these strategies cannot completely protect rabbits against outbreaks of ERE and might require to be combined with others such as the use of new bioactive compounds with prebiotic activity [13].

The term prebiotic is very broad and includes "any substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit" [54]. Dietary prebiotics are selectively fermented ingredients that result in specific changes in the composition and/or activity of the gastrointestinal microbiota, thus conferring benefits to host health [55]. These ingredients must fulfil three criteria to be classified as prebiotics [56]: (1) they must resist gastric acidity, hydrolysis by mammalian enzymes and gastrointestinal absorption; (2) they must be fermented by the intestinal microflora; and (3) they must selectively stimulate the growth and/or activity of intestinal bacteria associated with health and wellbeing. The stimulation of these beneficial microbes enhances competition against undesirable microbes, prevents the adhesion of pathogens to the mucosa and directly stimulates the gut immune system [57]. Anyway, the potential symbiotic microbiota is not identified in rabbits, and this is an important drawback to find prebiotics that may improve intestinal health.

During the last decades, a great effort has been made to identify prebiotic compounds for routine use in the feed industry. Most of this work has been performed in the main livestock species, namely, pigs and poultry (for a review, see [24,58,59]), although great effort has also been made in the minority rabbit sector (for a review, see [57]). The most studied and well-known prebiotics are oligosaccharides (namely, mannan-oligosaccharides (MOS), fructo-oligosaccharides (FOS), a-galactooligosaccharides (GOS), cellobiose and xilo-oligosaccharides (XOS)), inulin and yeast cell products, although there are also other

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

candidates, such as polyunsaturated fatty acids (PUFAs). Some soluble fermentable fibres and other types of dietary fibre have been also tested [24,54,57,58]. Although numerous positive effects of different types of prebiotics have been reported to reduce the incidence of diarrhoea in piglets during the post-weaning period, further research is needed to understand the influence of these compounds in gut health and consequently to enable their widespread use in animal husbandry practice [58]. This also applies to rabbit farming, and although some positive results have been observed, the lack of consistent findings precludes robust conclusions from being reached, which may be accounted for by the differences in intestinal microbiota and gut physiology among species.

## 4. Seaweed and Gut Health

Seaweed has traditionally been used in animal nutrition in some parts of the world—as fodder during periods of scarcity and also as a mineral supplement [60–62]. However, the current interest in the use of algae in animal nutrition arises from the urgent need to search for new bioactive substances that can improve animal health and the sustainability of animal production [63–65]. In this sense, seaweeds represent a very promising source of numerous beneficial substances, as they are very rich in polysaccharides with prebiotic potential [66–69].

The chemical composition and the bioactive metabolite content of seaweed/marine algae have been extensively studied, along with the variations related to species and genera, harvesting season, environmental conditions and geographical location (for a review, see [60]), and it is outside of the scope of this paper to conduct a comprehensive review of these aspects. Overall, macroalgae are classified in three groups according to their pigmentation: green seaweeds (Chlorophyta), brown seaweeds (Phaeophyta) and red seaweeds (Rhodophyta) [63,70]. Although the composition is very variable, together, these seaweeds provide numerous nutrients of great interest (in animal nutrition). The protein content varies among groups, with red algae having the highest percentage (up to 47%) and brown algae the lowest (5–15%), and it is generally of very good quality in all types due to the high content of essential amino acids [69]. Seaweeds are a rich source of minerals, as they contain high levels of potassium, sodium and calcium, as well as iron, zinc, iodine, manganese, copper, cobalt and selenium [63,71,72] and also high levels of vitamins, especially vitamins A, C and E and the B group vitamins (B1, B2 and B12) [71,73]. Seaweeds also contain large amounts of PUFAs, particularly omega-3 and omega-6, which are present in a balanced ratio [69,71,72]. They are also rich in polyphenolic compounds (such as flavonoids and tannins), which act as strong antioxidants [69–71,73].

The main current interest in the use of seaweeds in animal nutrition lies in their high contents of complex polysaccharides and oligosaccharides, which are not generally digested in the small intestine and are thus partially or fully fermented in the large intestine or colon, providing a rich source of dietary fibre (25–75% of DM) [61,71,73]. Brown seaweeds contain soluble fibres such as alginates, fucoidans and laminarins; green seaweeds contain ulvans, galactans, xylans and mannans; and red seaweeds are mostly composed by agars, carrageenans, xylans and porphyran [69,74–77]. Some of these polysaccharides, such as laminarins, fucoidans, alginates, galactans and ulvans, have been demonstrated to have prebiotic activity [67,71,78], among other properties (Table 1; [74,75]). These polysaccharides are fermented by and stimulate the growth of commensal bacteria and also inhibit the growth and adhesion of pathogens and improve gut architecture [61,76,77]. Improved gut health is reflected at many levels, as the consumption of algae increases the absorption of nutrients and thus growth and animal welfare [61,63]. Some of these compounds also display immunomodulatory and anti-inflammatory activities [71].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Table 1.** Main polysaccharides of interest in macroalgae.

| Polysaccharide | Chemical Structure | Biological Properties |
|---|---|---|
| Ulvan | L-rhamnose, D-xylose, D-glucose and D-glucuronic acid. | Antioxidant, anticoagulant, anti-inflammatory, immune-stimulatory, antibacterial, antihyperlipidemic. |
| Fucoidan | 1,3-α-fucopyranoside backbone with branching of α-1,2-fucopyranoside | Antioxidant, anticoagulant, anti-inflammatory, antiviral, immune-modulatory. |
| Laminarin | 1,3-β-D-glucan with β-1,6-linkages. | Antioxidant, anticoagulant, anti-inflammatory, antiviral, immune-modulatory, prebiotic. |
| Alginate | 1,4-β-D-mannuronic acid and α-L-guluronic acid residues. | Antioxidant, anti-inflammatory, antitumor. |

Very few studies have evaluated the inclusion of seaweed in the diets of rabbits, and in most of the studies, the main objective has been to evaluate the potential prebiotic effects on gut health. Two studies performed in Egypt [72,79] evaluated the effect of including whole algae (sun-dried) on the growth performance and gut health of growing rabbits. In both cases, the inclusion of 1% *Ulva lactuca* had positive effects on the growth performance and digestive health parameters of rabbits. On the contrary, in a study conducted in Brazil [80], in which rabbits were fed *Lithothammium* flour (up to 1% of the diet), no significant effects on animal performance or digestive health were observed, even though the highest concentration of algae (1%) led to a decrease in the length and width of the villi. Finally, studies were recently conducted in Italy with the main objective of evaluating the effects of natural extracts from plants and algae (including polysaccharides from brown seaweeds) on the reproductive performance of does [81], semen quality in bucks [82] and zootechnical performance and antioxidant effects; although no significant effects on the reproductive endpoints were observed, the supplementation of the diets with algae improved the antioxidant status and fat metabolism in the animals. In a similar study carried out in Italy, the effect of natural extracts from plants and algae on the growth performance and meat quality parameters of growing rabbits was evaluated [9,10]. The long-term supplementation of lactating does and their offspring with brown seaweed and plant polyphenols (0.3 and 0.6%) improved growth performance, lowered cholesterol content and enhanced the oxidative stability and sensory quality of the meat, leading the researchers to conclude that a low dose of brown seaweed (*Laminaria* spp.) and plant-extract supplementation (phenolic acid, hydroxycinnamic acids, tannins and flavonoids) could enhance growth performance and produced better-quality rabbit meat. Although none of these studies evaluated the gut health of rabbits, most indicated that seaweed consumption can potentially enhance growth performance and antioxidant status and produce better-quality meat.

On the contrary, a large body of research has been carried out in piglets to evaluate the inclusion of macroalgae and algal extracts (mainly laminarin and fucoidans) in the diet in the post-weaning period. Pig production faces problems similar to those of rabbit production related to dysbiosis during the post-weaning period, which was traditionally controlled with the use of antibiotic-medicated feed and supplementation with high levels of minerals (particularly copper and zinc) [58]. The ban on (or limited use of) antibiotics has led to the need for feeding strategies in the post-weaning period that can re-establish the gut eubiosis lost at weaning, aimed at restoring the *Lactobacillus* count, promoting the growth of beneficial bacteria that boost the mucosal immune system and lowering the proliferation of pathogenic bacteria [83]. The pig farming sector already has some experience in using seaweed to improve the health and performance of piglets while avoiding the use of in-feed antibiotics (for a review, see [58,61,63]). The results of the numerous studies carried out in this field are summarized in Figure 2. Most studies have been performed with laminarin and fucoidan, which have been demonstrated to have many valuable properties. These compounds increase beneficial microbiota, enhance nutrient digestibility, improve villus

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

structure, stimulate SCFA production, reduce pathogen populations and boost immune function, ultimately reducing post-weaning diarrhoea [61,65,66,84–97].

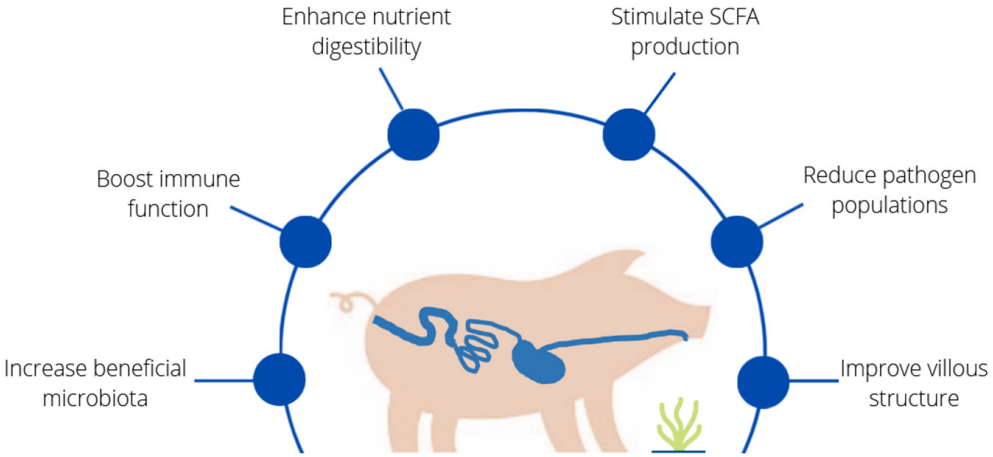



**Figure 2.** Benefits of seaweeds on piglet gut health. Increase beneficial microbiota [84,85,87,88,92,93,95], boost immune function [85,91,95], enhance nutrient digestibility [84–87,89,96], stimulate SCFA production [91,97], reduce pathogen populations [86–88,92,93,95,97], improve villous structure [87,97].

Given the experience with piglets, it seems reasonable to assume that rabbits could benefit from the supplementation of some algae or algae extracts enriched in polysaccharides to improve the health of the immature digestive system in the post-weaning period. This possibility deserves further study.

## 5. Seaweed and Meat Quality

Rabbit meat is a high-quality product due to its nutritive and dietetic properties [1,98]. It has a high protein content (of about 22%), characterised by high essential amino-acid levels. It is also a good source of potassium, phosphorous, selenium and B vitamins (being one of the richest sources of vitamin B12) and has a very low sodium content [2,8,98]. Moreover, the fatty acid profile of rabbit meat is considered very healthy, because the meat contains lower levels of cholesterol and saturated fatty acids than other meats and is also very rich in PUFAs, which are well balanced between the n-3 and n-6 series [99]. However, the high content of PUFAs makes this meat susceptible to oxidative deterioration and the generation of toxic compounds, which alter the sensorial properties and limit its shelf-life. Therefore, it is very important to increase the levels/balance of antioxidants in rabbit meat to guarantee its stability [99]; this can be performed by including antioxidants (preferably of natural origin) in the animal feed.

Seaweeds are a rich source of antioxidants such as polyphenols and vitamins [60,71,100,101], and numerous studies have demonstrated their usefulness in improving muscle oxidative stability and antioxidant capacity in the main livestock species (Figure 3). The inclusion of laminarin and fucoidan derived from *Laminaria digitata* in piglet diets reduces lipid oxidation in the fresh meat [11,102] and also improves its antioxidant capacity [102]. Another study [103] has observed an effect on meat colour that may be related to an increase in antioxidant compounds [101]. This effect has also been observed in ruminants [104,105] and in broiler chickens [106].

It has also been observed that some seaweeds (*L. digitata, L. japonica, A. nodosum*) enhance the fatty acid profile of the meat by increasing the PUFA content and reducing the levels of saturated fatty acids and cholesterol, as observed in piglets [12], ducks [107] and cattle [108]. A reduction in abdominal fat in broiler chickens has also been observed when fed a diet including *Ulva lactuca* [109]. The inclusion of laminarin and fucoidan in piglet diets also enhanced the visual sensory descriptors of the meat [12] and reduced bacterial counts during storage [102]. Finally, the high iodine content of some brown algae, easily transferred to animal tissues, has been proposed as a potential means of mitigating

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

iodine deficiency in humans, with health benefits regarding the prevention of thyroid dysfunctions [85].

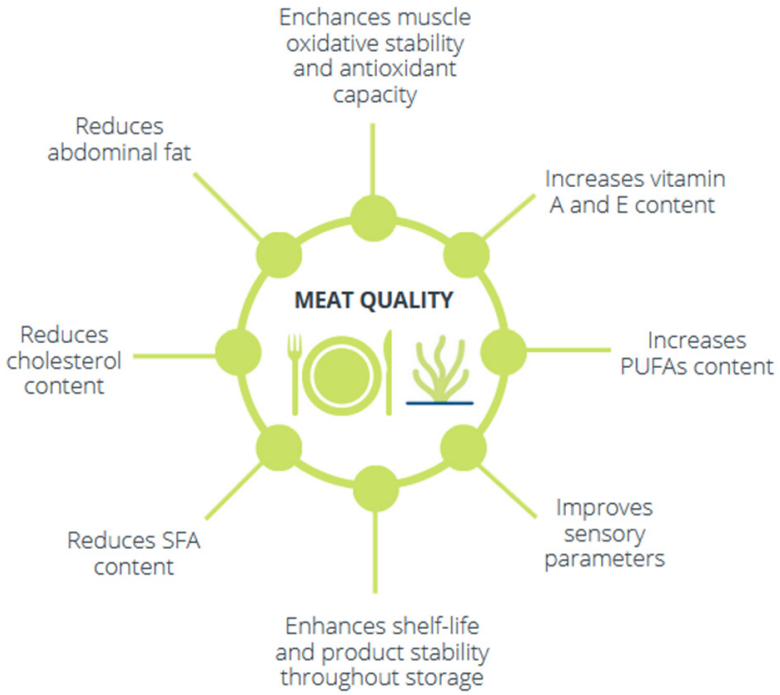



**Figure 3.** Benefits of seaweeds on meat quality.

Information about the capacity of seaweeds to improve meat quality in rabbits is scarce. The short- and long-term inclusion of *Laminaria* spp. (0.3 and 0.6%) in rabbit diets was recently studied [9,10]. In a 42-day-long trial in growing rabbits, the vitamin A and E contents of muscle were improved, enhancing nutritional quality and oxidative stability; the sensory parameters were also enhanced. When lactating does were given the algal supplement, their offspring showed a reduction in cholesterol content and an increase in $\alpha$-tocopherol and retinol contents, while the sensory quality of the meat was also improved.

Altogether, the available information indicates that the inclusion of macroalgae in the diet of rabbits could further improve the intrinsic properties of the meat and enhance its stability. This approach could be used as a marketing tool to help to generate a niche market for rabbit meat as a healthy food [1].

## 6. Seaweed and Sustainable Animal Farming

Seaweed farming is increasing worldwide as part of the development of a sustainable economy [110]. China and Indonesia, where harvesting or collecting algae from the natural environment is an ancient practice, are the major seaweed-producing countries, contributing 86.6% of global seaweed production [60,111]. Within Europe, France is also a top producer of algae [111], and seaweed farming is currently expanding in Mediterranean countries [112]. Seaweeds are used for multiple purposes, directly as animal feed and to produce biofertilizers. They can also be refined to extract some compounds of interest for the pharmaceutical, cosmetic and food industries, and by-products are used to produce biofuels or biofertilizers [112–115].

The use of macroalgae as an alternative to the use of antibiotics in animal production has many environmental benefits, beginning with the direct reduction in the discharge of pharmaceutical residues in the environment [116]. The global consumption (228 countries) of antimicrobials in food animal production was estimated to be 63,151 ($\pm$1560) tonnes in 2010 and is expected to rise by 67% in 2030, almost doubling in BRICS countries [117]. Between 40 and 90% (depending on the class of drugs) of the antibiotic dose administered is excreted as parent compounds in the active form in the faeces and urine, eventually

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

reaching the environment and contaminating soils, water and plants [118]. Once in the environment, antibiotic residues can have negative effects on biota at different trophic levels and on human health via the consumption of contaminated food and water, also contributing to increasing the resistant bacterial population and maintaining selective pressure that leads to the development and/or dissemination of resistance in different environmental compartments [119,120].

The inclusion of seaweed as an ingredient in animal feed provides essential amino acids, PUFAs, vitamins and minerals, antioxidants and soluble fibre, which together can improve animal health and contribute to low mortality rates and a reduction in antibiotic use [58,60]. The minimization of mortality rates would considerably reduce the environmental impact of rabbit farming by increasing its efficiency [8,121]. To achieve this goal, the development of diets that are well adapted to the post-weaning period together with improved farm management and hygienic conditions are crucial [8,14].

It is well known that the greatest environmental impact of monogastric farming is associated with feed production, especially commercial protein feeds such as soybean meal, which are associated with deforestation and emissions derived from transport [8,122]. Reduced protein intake and the substitution of part of the protein with other sources with lower environmental impact, such as macroalgae, would, therefore, contribute to mitigating damage to the environment and pollution due to nitrogen excretion [8,123,124]. Moreover, in the context of population growth and limited sources, high rates of production of marine seaweeds could be achieved without the need for fresh water, arable land or fertilisation; seaweeds, therefore, represent an interesting source of ingredients and bioactive compounds for human and animal nutrition [61,97,100,123,125].

Within sustainable farming systems, seaweed cultivation is of interest because of the ecosystem services that algae provide [110]. Macroalgae possess bioremediation properties, as they are capable of minimising eutrophication by removing excess dissolved nutrients such as C, N and P [126,127]. They also remove heavy metals from water [128] and act as a potential carbon sink that contributes to mitigating ocean acidification and climate change [100,114]. In this sense, seaweed cultivation has been proposed as a beneficial co-culture practice in aquaculture, in a new system called IMTA (integrated multi-trophic aquaculture), in order to reduce the environmental impact of fish and mussel production [127]. Intensive mariculture produces large quantities of organic and inorganic pollutants that cause environmental deterioration [126]. The IMTA system combines the cultivation of various species from different trophic levels and complementary ecosystem functions (fed species (fish/shrimp), filtering species (mussels/oysters/other molluscs) and extractive species (seaweeds)), so that the waste and nutrients derived from one culture can be reused and used for other species [127,129]. As a result, the whole system is less harmful to the environment [126,129], and total production is higher than that of monoculture systems, reaching higher biomass yield [130] and better-quality products [127]. In Europe, there is already some experience with the IMTA system, in some countries such as France, Germany, Norway, the UK, Ireland, Portugal and Spain [129,131], although it is not yet as widespread as in Asia [132]. The commercial value of the seaweed used in these systems is a key point regarding the potential profitability of IMTA [129,133]. The inclusion of algae in livestock feed could increase the commercial value of algae, especially in some European countries where livestock production is economically important, so that both sectors could reinforce each other [129]. The fact that there is already a market for algae in the main rabbit-producing countries means that its use in animal feed as a local-produced alternative to antibiotics could be used as a marketing strategy for consumers who are increasingly concerned about issues of environmental sustainability.

Furthermore, some seaweeds such as *Ulva* spp. grow uncontrollably on the coast and have some negative environmental impacts, leading to coastal degradation and problems for the fishing industry and tourism. Seaweed is removed regularly, thereby generating tons of marine macroalgal waste every year [62,69]. In addition, the seaweed industry also generates large amounts of waste during the transformation process. This waste could

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

be revalorized for inclusion in animal feed, among other uses, providing benefits both to animal health and the economic viability of industries. This approach would create a circular economy model that would be beneficial in environmental, economic, social and animal welfare terms (Figure 4) [62,129].

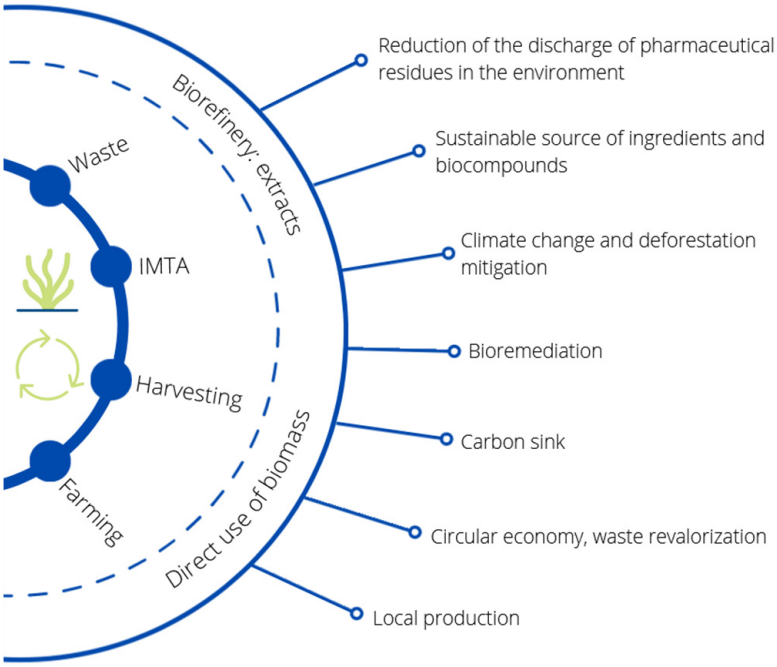



**Figure 4.** Environmental benefits of revalorizing seaweeds for animal feed.

## 7. Conclusions and Future Trends

The rabbit meat industry is unquestionably facing critical challenges that require a holistic solution. On the one hand, the ban on the prophylactic use of antibiotics in animal nutrition has led to changes in the rabbit diet (to improve gut health) and is one of the key points regarding the economically viability of rabbit farming (along with farm husbandry and hygiene conditions). On the other hand, a niche market that offers new formats of meat adapted to modern forms of consumption must be created to compete with other types of meat on the market. Thus, a distinctive meat product that can attract consumers who are increasingly more aware of healthy and sustainable products is required.

This review paper highlights the potential value of macroalgae in the rabbit farming sector. In line with sustainable agriculture programmes, and particularly with the European Green Deal Plan, the use of seaweed in rabbit nutrition may improve animal health according to the One Health approach, whereby consumers and the environment could receive tangible benefits. The rabbit sector also needs a powerful marketing campaign to attract consumers concerned about the environmental sustainability of animal nutrition, and producing higher-quality meat can attract new consumers.

Although algae have been extensively analysed regarding their contents of biologically active compounds, the potential benefits in animal feed, and particularly in rabbit feed, requires further research. Demonstrating the prebiotic effects of algal components on gut health and also identifying the compounds directly responsible for the antimicrobial, antiviral, antioxidative and anti-inflammatory properties of algae remain incipient lines of research. Focusing on the use of algae to reinforce intestinal health, once the use of antibiotics is limited, through a viable and sustainable approach is a strategy that represents progress in solving the major emerging problems related to antibiotic resistance.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Funding:** This review was carried out within the innovation project TIRAC, co-financed by 80% by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) of the European Union and by 20% by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, within the framework of the National Rural Development Program 2014–2020. The General Directorate for Rural Development, Innovation and Agrifood Training (DGDRIFA) is the authority in charge of applying this aid. Budget: EUR 492,580.38. Total grant: EUR 485,043.58.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Petracci, M.; Soglia, F.; Leroy, F. Rabbit Meat in Need of a Hat-Trick: From Tradition to Innovation (and Back). *Meat Sci.* **2018**, *146*, 93–100. [CrossRef] [PubMed]
2. Cullere, M.; Dalle Zotte, A. Rabbit Meat Production and Consumption: State of Knowledge and Future Perspectives. *Meat Sci.* **2018**, *143*, 137–146. [CrossRef] [PubMed]
3. Trocino, A.; Cotozzolo, E.; Zomeño, C.; Petracci, M.; Xiccato, G.; Castellini, C. Rabbit Production and Science: The World and Italian Scenarios from 1998 to 2018. *Ital. J. Anim. Sci.* **2019**, *18*, 1361–1371. [CrossRef]
4. Licois, D.; Wyers, M.; Coudert, P. Epizootic Rabbit Enteropathy: Experimental Transmission and Clinical Characterization. *Vet. Res.* **2004**, *36*, 601–613. [CrossRef]
5. Badiola, I.; Perez De Rozas, A.; Gonzalez, J.; Aloy, N.; García, J.; Carabaño, R. Recent Advances in ERE in Growing Rabbits (Invited Paper). In Proceedings of the 11th World Rabbit Congress, Qingdao, China, 15–18 June 2016; pp. 491–502.
6. Solans, L.; Arnal, J.L.; Sanz, C.; Benito, A.; Chacón, G.; Alzuguren, O.; Fernández, A.B. Rabbit Enteropathies on Commercial Farms in the Iberian Peninsula: Etiological Agents Identified in 2018–2019. *Animals* **2019**, *9*, 1142. [CrossRef]
7. Attia, Y.A.; Hamed, R.S.; Abd El-Hamid, A.E.; Al-Harthi, M.A.; Shahba, H.A.; Bovera, F. Performance, blood profile, carcass and meat traits and tissue morphology in growing rabbits fed mannanoligosaccharides and zinc-bacitracin continuously or intermittently. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2015**, *33*, 85–101.
8. Cesari, V.; Zucali, M.; Bava, L.; Gislon, G.; Tamburini, A.; Toschi, I. Environmental Impact of Rabbit Meat: The Effect of Production Efficiency. *Meat Sci.* **2018**, *145*, 447–454. [CrossRef]
9. Rossi, R.; Vizzarri, F.; Chiapparini, S.; Ratti, S.; Casamassima, D.; Palazzo, M.; Corino, C. Effects of Dietary Levels of Brown Seaweeds and Plant Polyphenols on Growth and Meat Quality Parameters in Growing Rabbit. *Meat Sci.* **2020**, *161*, 107987. [CrossRef]
10. Rossi, R.; Vizzarri, F.; Ratti, S.; Palazzo, M.; Casamassima, D.; Corino, C. Effects of Long-Term Supplementation with Brown Seaweeds and Polyphenols in Rabbit on Meat Quality Parameters. *Animals* **2020**, *10*, 2443. [CrossRef]
11. Moroney, N.C.; O'Grady, M.N.; O'Doherty, J.V.; Kerry, J.P. Addition of Seaweed (*Laminaria digitata*) Extracts Containing Laminarin and Fucoidan to Porcine Diets: Influence on the Quality and Shelf-Life of Fresh Pork. *Meat Sci.* **2012**, *92*, 423–429. [CrossRef]
12. Moroney, N.C.; O'Grady, M.N.; Robertson, R.C.; Stanton, C.; O'Doherty, J.V.; Kerry, J.P. Influence of Level and Duration of Feeding Polysaccharide (Laminarin and Fucoidan) Extracts from Brown Seaweed (*Laminaria digitata*) on Quality Indices of Fresh Pork. *Meat Sci.* **2015**, *99*, 132–141. [CrossRef] [PubMed]
13. Fortun-Lamothe, L.; Boullier, S. A Review on the Interactions between Gut Microflora and Digestive Mucosal Immunity. Possible Ways to Improve the Health of Rabbits. *Livest. Sci.* **2007**, *107*, 1–18. [CrossRef]
14. Gidenne, T.; Fortun-Lamothe, L. Feeding Strategy for Young Rabbits around Weaning: A Review of Digestive Capacity and Nutritional Needs. *Anim. Sci.* **2002**, *75*, 169–184. [CrossRef]
15. Combes, S.; Michelland, R.J.; Monteils, V.; Cauquil, L.; Soulié, V.; Tran, N.U.; Gidenne, T.; Fortun-Lamothe, L. Postnatal Development of the Rabbit Caecal Microbiota Composition and Activity. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *77*, 680–689. [CrossRef]
16. Rees Davies, R.; Rees Davies, J.A.E. Rabbit Gastrointestinal Physiology. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* **2003**, *6*, 139–153. [CrossRef]
17. Carabaño, R.; Piquer, J.; Menoyo, D.; Badiola, I. The digestive system of the rabbit. In *Nutrition of the Rabbit*, 3rd ed.; De Blas, C., Wiseman, J., Eds.; CABI Publishing CAB International: Wallingford, UK, 2020; pp. 1–20.
18. Lesbouyries, M.M.; Berthelon, M. Entero-Toxemie Du Lapin. *Bull. Acad.* **1936**, *9*, 74–82.
19. Marlier, D.; Dewrée, R.; Lassence, C.; Licois, D.; Mainil, J.; Coudert, P.; Meulemans, L.; Ducatelle, R.; Vindevogel, H. Infectious Agents Associated with Epizootic Rabbit Enteropathy: Isolation and Attempts to Reproduce the Syndrome. *Vet. J.* **2006**, *172*, 493–500. [CrossRef]
20. Rosell, J.M.; De La Fuente, L.F.; Badiola, J.I.; De Fernandez, L.D.; Casal, J.; Saco, M. Study of Urgent Visits to Commercial Rabbit Farms in Spain and Portugal during 1997-2007. *World Rabbit Sci.* **2009**, *17*, 127–136. [CrossRef]
21. Licois, D.; Coudert, P.; Marlier, D. Epizootic rabbit enteropathy. In *Recent Advances inRabbit Sciences*; Maertens, L., Coudert, P., Eds.; ILVO: Merenbeke, Belgium, 2006; pp. 163–170.

22. Puón-Peláez, X.-H.; McEwan, N.; Olvera-Ramírez, A. Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE): A Review of Current Knowledge. *Eur. Sci. J. ESJ* **2018**, *14*, 137–149. [CrossRef]
23. Gidenne, T.; Kerdiles, V.; Jehl, N.; Arveux, P.; Eckenfelder, B.; Briens, C.; Stephan, S.; Fortune, H.; Montessuy, S.; Muraz, G. Protein Replacement by Digestible Fibre in the Diet of Growing Rabbits: 2-Impact on Performances, Digestive Health and Nitrogen Output. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *183*, 142–150. [CrossRef]
24. Saettone, V.; Biasato, I.; Radice, E.; Schiavone, A.; Bergero, D.; Meineri, G. State-of-the-Art of the Nutritional Alternatives to the Use of Antibiotics in Humans and Monogastric Animals. *Animals* **2020**, *10*, 2199. [CrossRef] [PubMed]
25. European Commission. *A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)*; European Commission: Brussels, Belgium, 2017; p. 24.
26. Carabaño, R.; Badiola, I.; Chamorro, S.; García, J. New Trends in Rabbit Feeding: Influence of Nutrition. *Span. J. Agric. Res.* **2008**, *6*, 15–25. [CrossRef]
27. Martínez-Paredes, E.; Nicodemus, N.; Pascual, J.J.; García, J. Challenges in Rabbit Doe Feeding, Including the Young Doe. *World Rabbit Sci.* **2022**, *30*, 13–24. [CrossRef]
28. Nicodemus, N.; Carabaño, R.; García, J.; Méndez, J.; De Blas, C. Performance Response of Lactating and Growing Rabbits to Dietary Lignin Content. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **1999**, *80*, 43–54. [CrossRef]
29. Gutiérrez, I.; Espinosa, A.; García, J.; Carabaño, R.; De Blas, J.C. Effect of Levels of Starch, Fiber, and Lactose on Digestion and Growth Performance of Early-Weaned Rabbits. *J. Anim. Sci.* **2002**, *80*, 1029–1037. [CrossRef]
30. Nicodemus, N.; García, J.; Carabaño, R.; De Blas, J.C. Effect of a Reduction of Dietary Particle Size by Substituting a Mixture of Fibrous By-Products for Lucerne Hay on Performance and Digestion of Growing Rabbits and Lactating Does. *Livest. Sci.* **2006**, *100*, 242–250. [CrossRef]
31. Farias, C.; Feijoo, D.; Gratta, F.; Brambillasca, S.; Ocasio-Vega, C.; Nicodemus, N.; Carabaño, R.; García, J. Efecto Del Nivel de Fibra Insoluble y Soluble Sobre La Cantidad de Fibra Fermentada a Nivel Ileal, Cecal y Fecal En Gazapos En Crecimiento. In Proceedings of the XVIII Jornadas Sobre Produccion Animal AIDA, Zaragoza, Spain, 7–8 May 2019; pp. 89–91.
32. Gómez-Conde, M.S.; de Rozas, A.P.; Badiola, I.; Pérez-Alba, L.; de Blas, C.; Carabaño, R.; García, J. Effect of Neutral Detergent Soluble Fibre on Digestion, Intestinal Microbiota and Performance in Twenty Five Day Old Weaned Rabbits. *Livest. Sci.* **2009**, *125*, 192–198. [CrossRef]
33. Trocino, A.; Fragkiadakis, M.; Majolini, D.; Tazzoli, M.; Radaelli, G.; Xiccato, G. Soluble Fibre, Starch and Protein Level in Diets for Growing Rabbits: Effects on Digestive Efficiency and Productive Traits. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *180*, 73–82. [CrossRef]
34. Trocino, A.; Garcia, J.; Carabaño, R.; Xiccato, G. A Meta-Analysis on the Role of Soluble Fibre in Diets for Growing Rabbits. *World Rabbit Sci.* **2013**, *21*, 1–15. [CrossRef]
35. Gutiérrez, I.; Espinosa, A.; García, J.; Carabaño, R.; De Blas, J.C. Effects of Starch and Protein Sources, Heat Processing, and Exogenous Enzymes in Starter Diets for Early Weaned Rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2002**, *98*, 175–186. [CrossRef]
36. Gutierrez, I.; Espinosa, A.; Carabaño, R.; Rebollar, P.G.; De Blas, J.C. Effect of Protein Source on Digestion and Growth Performance of Early-Weaned Rabbits. *Anim. Res.* **2003**, *52*, 461–471. [CrossRef]
37. García-Ruiz, A.I.; García-Palomares, J.; García-Rebollar, P.; Chamorro, S.; Carabaño, R.; De Blas, C. Effect of Protein Source and Enzyme Supplementation on Ileal Protein Digestibility and Fattening Performance in Rabbits. *Span. J. Agric. Res.* **2006**, *4*, 297–303. [CrossRef]
38. Chamorro, S.; Gómez-Conde, M.S.; Pérez De Rozas, A.M.; Badiola, I.; Carabaño, R.; De Blas, J.C. Effect on Digestion and Performance of Dietary Protein Content and of Increased Substitution of Lucerne Hay with Soya-Bean Protein Concentrate in Starter Diets for Young Rabbits. *Animal* **2007**, *1*, 651–659. [CrossRef] [PubMed]
39. Chamorro, S.; de Blas, C.; Grant, G.; Badiola, I.; Menoyo, D.; Carabaño, R. Effect of Dietary Supplementation with Glutamine and a Combination of Glutamine-Arginine on Intestinal Health in Twenty-Five-Day-Old Weaned Rabbits. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 170–180. [CrossRef]
40. García-Palomares, J.; Carabaño, R.; García-Rebollar, P.; De Blas, J.C.; Corujo, A.; García-Ruiz, A.I. Effects of a Dietary Protein Reduction and Enzyme Supplementation on Growth Performance in the Fattening Period. *World Rabbit Sci.* **2006**, *14*, 231–236. [CrossRef]
41. Martínez-Vallespín, B.; Martínez-Paredes, E.; Ródenas, L.; Cervera, C.; Pascual, J.J.; Blas, E. Combined Feeding of Rabbit Female and Young: Partial Replacement of Starch with Acid Detergent Fibre or/and Neutral Detergent Soluble Fibre at Two Protein Levels. *Livest. Sci.* **2011**, *141*, 155–165. [CrossRef]
42. Xiccato, G.; Trocino, A.; Majolini, D.; Fragkiadakis, M.; Tazzoli, M. Effect of Decreasing Dietary Protein Level and Replacing Starch with Soluble Fibre on Digestive Physiology and Performance of Growing Rabbits. *Animal* **2011**, *5*, 1179–1187. [CrossRef]
43. Delgado, R.; Menoyo, D.; Abad-Guamán, R.; Nicodemus, N.; Carabaño, R.; García, J. Effect of Dietary Soluble Fibre Level and N-6/n-3 Fatty Acid Ratio on Digestion and Health in Growing Rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2019**, *255*, 114222. [CrossRef]
44. De la Cruz, P. Efecto Del Nivel de Calcio Sobre Los Rendimientos Productivos de Gazapos. Bachelor´s Thesis, Grado En Ciencias Agrarias y Bioeconomía, ETSI Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain, 2022.
45. Ocasio-Vega, C.; Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; Menoyo, D.; García, J. The Effect of Cellobiose on the Health Status of Growing Rabbits Depends on the Dietary Level of Soluble Fiber. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 1806–1817. [CrossRef]

46. Ocasio-Vega, C.; Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; García, J. Effect of Cellobiose Supplementation on Growth Performance and Health in Rabbits. *Livest. Sci.* **2019**, *221*, 163–171. [CrossRef]
47. Gomez-Conde, M.S.; Garcia, J.; Chamorro, S.; Eiras, P.; Rebollar, P.G.; Pérez De Rozas, A.; Badiola, I.; De Blas, C.; Carabaño, R. Neutral Detergent-Soluble Fiber Improves Gut Barrier Function in Twenty-Five-Day-Old Weaned Rabbits. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 3313–3321. [CrossRef] [PubMed]
48. El Abed, N.; Delgado, R.; Abad, R.; Romero, C.; Villamide, M.; Menoyo, D.; Carabaño, R.; García, J. Soluble and Insoluble Fibre from Sugar Beet Pulp Enhance Intestinal Mucosa Morphology in Young Rabbits. In Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Stavanger, Norway, 29 August–2 September 2011; Book of Abstracts. Wageningen Academic Publisher: Wageningen, The Netherlands, 2011; p. 159.
49. Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Gómez-Conde, M.S.; García, J. Effect of Type of Fiber, Site of Fermentation, and Method of Analysis on Digestibility of Soluble and Insoluble Fiber in Rabbits. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 2860–2871. [CrossRef] [PubMed]
50. Boisot, P.; Licois, D.; Gidenne, T. Feed restriction reduces the sanitary impact of an experimental reproduction of Epizootic Rabbit Enteropathy syndrome (ERE), in the growing rabbit. In *10e'me Journees de Recherches Cu-nicoles Francaises*; Bolet, G., Ed.; ITAVI Publishing: Paris, France, 2003; pp. 267–270.
51. Romero, C.; Cuesta, S.; Astillero, J.R.; Nicodemus, N.; De Blas, C. Effect of Early Feed Restriction on Performance and Health Status in Growing Rabbits Slaughtered at 2 Kg Live-Weight. *World Rabbit Sci.* **2010**, *18*, 211–218. [CrossRef]
52. Gidenne, T.; Combes, S.; Fortun-Lamothe, L. Feed Intake Limitation Strategies for the Growing Rabbit: Effect on Feeding Behaviour, Welfare, Performance, Digestive Physiology and Health: A Review. *Animal* **2012**, *6*, 1407–1419. [CrossRef] [PubMed]
53. Birolo, M.; Trocino, A.; Zuffellato, A.; Xiccato, G. Effect of Feed Restriction Programs and Slaughter Age on Digestive Efficiency, Growth Performance and Body Composition of Growing Rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *222*, 194–203. [CrossRef]
54. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [CrossRef]
55. Gibson, G.R.; Scott, K.P.; Rastall, R.A.; Tuohy, K.M.; Hotchkiss, A.; Dubert-Ferrandon, A.; Gareau, M.; Murphy, E.F.; Saulnier, D.; Loh, G.; et al. Dietary Prebiotics: Current Status and New Definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods* **2010**, *7*, 1–19. [CrossRef]
56. Gibson, G.R.; Probert, H.M.; Van Loo, J.; Rastall, R.A.; Roberfroid, M.B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* **2004**, *17*, 259–275. [CrossRef]
57. Falcão-e-Cunha, L.; Castro-Solla, L.; Maertens, L.; Marounek, M.; Pinheiro, V.; Freire, J.; Mourão, J.L. Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Rabbit Feeding: A Review. *World Rabbit Sci.* **2007**, *15*, 127–140. [CrossRef]
58. López-Gálvez, G.; López-Alonso, M.; Pechova, A.; Mayo, B.; Dierick, N.; Gropp, J. Alternatives to Antibiotics and Trace Elements (Copper and Zinc) to Improve Gut Health and Zootechnical Parameters in Piglets: A Review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2021**, *271*, 114727. [CrossRef]
59. Corino, C.; Di Giancamillo, A.; Modina, S.C.; Rossi, R. Prebiotic Effects of Seaweed Polysaccharides in Pigs. *Animals* **2021**, *11*, 1573. [CrossRef]
60. Makkar, H.P.S.; Tran, G.; Heuzé, V.; Giger-Reverdin, S.; Lessire, M.; Lebas, F.; Ankers, P. Seaweeds for Livestock Diets: A Review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *212*, 1–17. [CrossRef]
61. Øverland, M.; Mydland, L.T.; Skrede, A. Marine Macroalgae as Sources of Protein and Bioactive Compounds in Feed for Monogastric Animals. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 13–24. [CrossRef]
62. Pardilhó, S.; Cotas, J.; Pereira, L.; Oliveira, M.B.; Dias, J.M. Marine Macroalgae in a Circular Economy Context: A Comprehensive Analysis Focused on Residual Biomass. *Biotechnol. Adv.* **2022**, *60*, 107987. [CrossRef]
63. Corino, C.; Modina, S.C.; Di Giancamillo, A.; Chiapparini, S.; Rossi, R. Seaweeds in Pig Nutrition. *Animals* **2019**, *9*, 1126. [CrossRef]
64. Patel, S.; Goyal, A. The Current Trends and Future Perspectives of Prebiotics Research: A Review. *3 Biotech* **2012**, *2*, 115–125. [CrossRef]
65. Sweeney, T.; O'Doherty, J.V. Marine Macroalgal Extracts to Maintain Gut Homeostasis in the Weaning Piglet. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2016**, *56*, S84–S89. [CrossRef]
66. O'Sullivan, L.; Murphy, B.; McLoughlin, P.; Duggan, P.; Lawlor, P.G.; Hughes, H.; Gardiner, G.E. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2038–2064. [CrossRef]
67. De Jesus Raposo, M.F.; De Morais, A.M.M.B.; De Morais, R.M.S.C. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 27. [CrossRef] [PubMed]
68. Cherry, P.; Yadav, S.; Strain, C.R.; Allsopp, P.J.; Mcsorley, E.M.; Ross, R.P.; Stanton, C. Prebiotics from Seaweeds: An Ocean of Opportunity? *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 327. [CrossRef]
69. Morais, T.; Inácio, A.; Coutinho, T.; Ministro, M.; Cotas, J.; Pereira, L.; Bahcevandziev, K. Seaweed Potential in the Animal Feed: A Review. *J. Mar. Sci. Eng.* **2020**, *8*, 559. [CrossRef]
70. Maghin, F. Biological Functions and Health Promoting Effects of Brown Seaweeds in Swine Nutrition. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* **2014**, *1*, 2–5. [CrossRef]
71. Hamed, I.; Özogul, F.; Özogul, Y.; Regenstein, J.M. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, *14*, 446–465. [CrossRef]
72. Abu Hafsa, S.H.; Khalel, M.S.; El-Gindy, Y.M.; Hassan, A.A. Nutritional Potential of Marine and Freshwater Algae as Dietary Supplements for Growing Rabbits. *Ital. J. Anim. Sci.* **2021**, *20*, 784–793. [CrossRef]

73. Wells, M.L.; Potin, P.; Craigie, J.S.; Raven, J.A.; Merchant, S.S.; Helliwell, K.E.; Smith, A.G.; Camire, M.E.; Brawley, S.H. Algae as Nutritional and Functional Food Sources: Revisiting Our Understanding. *J. Appl. Phycol.* **2017**, *29*, 949–982. [CrossRef]
74. Pereira, L. Biological and Therapeutic Properties of the Seaweed Polysaccharides. *Int. Biol. Rev.* **2018**, *2*, 1–50. [CrossRef]
75. Salehi, B.; Sharifi-rad, J.; Seca, A.M.L.; Pinto, D.C.G.A. Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications. *Molecules* **2019**, *24*, 4182. [CrossRef]
76. de Borba Gurpilhares, D.; Cinelli, L.P.; Simas, N.K.; Pessoa, A.; Sette, L.D. Marine Prebiotics: Polysaccharides and Oligosaccharides Obtained by Using Microbial Enzymes. *Food Chem.* **2019**, *280*, 175–186. [CrossRef]
77. Lopez-Santamarina, A.; Miranda, J.M.; Del Carmen Mondragon, A.; Lamas, A.; Cardelle-Cobas, A.; Franco, C.M.; Cepeda, A. Potential Use of Marine Seaweeds as Prebiotics: A Review. *Molecules* **2020**, *25*, 1004. [CrossRef]
78. Evans, F.D.; Critchley, A.T. Seaweeds for Animal Production Use. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 891–899. [CrossRef]
79. El-banna, S.G.; Hassan, A.A.; Okab, A.B.; Koriem, A.A.; Ayoub, M.A. Effect of Feeding Diets Supplemented with Seaweed on Growth Performance and Some Blood Hematological and Biochemical Characteristics of Male Baladi Rabbits. In Proceedings of the 4th International Conference on Rabbit Production in Hot Climate, Sharm Elsheikh, Egypt, 24–27 February 2005; Volume 382, pp. 373–382.
80. Euler, A.C.C.; Ferreira, W.M.; De Teixeira, E.; Lana, Â.M.Q.; Guedes, R.M.C.; Avelar, A.C. Desempenho, Digestibilidade e Morfometria Da Vilosidade Ileal de Coelhos Alimentados Com Níveis de Inclusão de "Lithothamnium". *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* **2010**, *11*, 91–103.
81. Vizzarri, F.; Chiapparini, S.; Corino, C.; Casamassima, D.; Palazzo, M.; Parkanyi, V.; Ondruska, L.; Rossi, R. Dietary Supplementation with Natural Extracts Mixture: Effects on Reproductive Performances, Blood Biochemical and Antioxidant Parameters in Rabbit Does. *Ann. Anim. Sci.* **2020**, *20*, 565–578. [CrossRef]
82. Vizzarri, F.; Massányi, M.; Knížatová, N.; Corino, C.; Rossi, R.; Ondruška, Ľ.; Tirpák, F.; Halo, M.; Massányi, P. Effects of Dietary Plant Polyphenols and Seaweed Extract Mixture on Male-Rabbit Semen: Quality Traits and Antioxidant Markers. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 1017–1025. [CrossRef] [PubMed]
83. Trevisi, P.; Luise, D.; Correa, F.; Messori, S.; Mazzoni, M.; Lallès, J.P.; Bosi, P. Maternal Antibiotic Treatment Affects Offspring Gastric Sensing for Umami Taste and Ghrelin Regulation in the Pig. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2021**, *12*, 31. [CrossRef] [PubMed]
84. Reilly, P.; O'Doherty, J.V.; Pierce, K.M.; Callan, J.J.; O'Sullivan, J.T.; Sweeney, T. The Effects of Seaweed Extract Inclusion on Gut Morphology, Selected Intestinal Microbiota, Nutrient Digestibility, Volatile Fatty Acid Concentrations and the Immune Status of the Weaned Pig. *Animal* **2008**, *2*, 1465–1473. [CrossRef] [PubMed]
85. Dierick, N.; Ovyn, A.; De Smet, S. Effect of Feeding Intact Brown Seaweed Ascophyllum Nodosum on Some Digestive Parameters and on Iodine Content in Edible Tissues in Pigs. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 584–594. [CrossRef]
86. McDonnell, P.; Figat, S.; Odoherty, J.V. The Effect of Dietary Laminarin and Fucoidan in the Diet of the Weanling Piglet on Performance, Selected Faecal Microbial Populations and Volatile Fatty Acid Concentrations. *Animal* **2010**, *4*, 579–585. [CrossRef]
87. O'Doherty, J.V.; McDonnell, P.; Figat, S. The Effect of Dietary Laminarin and Fucoidan in the Diet of the Weanling Piglet on Performance and Selected Faecal Microbial Populations. *Livest. Sci.* **2010**, *134*, 208–210. [CrossRef]
88. Leonard, S.G.; Sweeney, T.; Bahar, B.; Lynch, B.P.; O'Doherty, J.V. Effects of Dietary Seaweed Extract Supplementation in Sows and Post-Weaned Pigs on Performance, Intestinal Morphology, Intestinal Microflora and Immune Status. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 688–699. [CrossRef]
89. McAlpine, P.; O'Shea, C.J.; Varley, P.F.; Flynn, B.; O'Doherty, J.V. The Effect of Seaweed Extract as an Alternative to Zinc Oxide Diets on Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Fecal Score of Weaned Piglets. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 224–226. [CrossRef] [PubMed]
90. Walsh, A.M.; Sweeney, T.; O'Shea, C.J.; Doyle, D.N.; O'Doherty, J.V. Effect of Supplementing Varying Inclusion Levels of Laminarin and Fucoidan on Growth Performance, Digestibility of Diet Components, Selected Faecal Microbial Populations and Volatile Fatty Acid Concentrations in Weaned Pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *183*, 151–159. [CrossRef]
91. Walsh, A.M.; Sweeney, T.; O'Shea, C.J.; Doyle, D.N.; O'Doherty, J.V. Effect of Dietary Laminarin and Fucoidan on Selected Microbiota, Intestinal Morphology and Immune Status of the Newly Weaned Pig. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 1630–1638. [CrossRef] [PubMed]
92. Heim, G.; Walsh, A.M.; Sweeney, T.; Doyle, D.N.; O'Shea, C.J.; Ryan, M.T.; O'Doherty, J.V. Effect of Seaweed-Derived Laminarin and Fucoidan and Zinc Oxide on Gut Morphology, Nutrient Transporters, Nutrient Digestibility, Growth Performance and Selected Microbial Populations in Weaned Pigs. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1577–1585. [CrossRef] [PubMed]
93. O'Shea, C.J.; McAlpine, P.; Sweeney, T.; Varley, P.F.; O'Doherty, J.V. Effect of the Interaction of Seaweed Extracts Containing Laminarin and Fucoidan with Zinc Oxide on the Growth Performance, Digestibility and Faecal Characteristics of Growing Piglets. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 798–807. [CrossRef] [PubMed]
94. Choi, Y.; Hosseindoust, A.; Goel, A.; Lee, S.; Jha, P.K.; Kwon, I.K.; Chae, B.J. Effects of Ecklonia Cava as Fucoidan-Rich Algae on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Intestinal Morphology and Caecal Microflora in Weanling Pigs. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **2017**, *30*, 64–70. [CrossRef]
95. Ruiz, Á.R.; Gadicke, P.; Andrades, S.M.; Cubillos, R. Supplementing Nursery Pig Feed with Seaweed Extracts Increases Final Body Weight of Pigs. *Austral J. Vet. Sci.* **2018**, *50*, 83–87. [CrossRef]
96. Wan, J.; Zhang, J.; Chen, D.; Yu, B.; He, J. Effects of Alginate Oligosaccharide on the Growth Performance, Antioxidant Capacity and Intestinal Digestion-Absorption Function in Weaned Pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2017**, *234*, 118–127. [CrossRef]

97. Sardari, R.R.R.; Nordberg Karlsson, E. Marine Poly- and Oligosaccharides as Prebiotics. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 11544–11549. [CrossRef]
98. Dalle Zotte, A.; Szendro, Z. The Role of Rabbit Meat as Functional Food. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 319–331. [CrossRef]
99. Dalle Zotte, A. Perception of Rabbit Meat Quality and Major Factors Influencing the Rabbit Carcass and Meat Quality. *Livest. Prod. Sci.* **2002**, *75*, 11–32. [CrossRef]
100. Costa, M.; Cardoso, C.; Afonso, C.; Bandarra, N.M.; Prates, J.A.M. Current Knowledge and Future Perspectives of the Use of Seaweeds for Livestock Production and Meat Quality: A Systematic Review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2021**, *105*, 1075–1102. [CrossRef] [PubMed]
101. Ribeiro, D.M.; Martins, C.F.; Costa, M.; Coelho, D.; Pestana, J.; Alfaia, C.; Lordelo, M.; de Almeida, A.M.; Freire, J.P.B.; Prates, J.A.M. Quality Traits and Nutritional Value of Pork and Poultry Meat from Animals Fed with Seaweeds. *Foods* **2021**, *10*, 2961. [CrossRef] [PubMed]
102. Rajauria, G.; Draper, J.; McDonnell, M.; O'Doherty, J.V. Effect of Dietary Seaweed Extracts, Galactooligosaccharide and Vitamin E Supplementation on Meat Quality Parameters in Finisher Pigs. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *37*, 269–275. [CrossRef]
103. Jerez-Timaure, N.; Sánchez-Hidalgo, M.; Pulido, R.; Mendoza, J. Effect of Dietary Brown Seaweed (Macrocystis Pyrifera) Additive on Meat Quality and Nutrient Composition of Fattening Pigs. *Foods* **2021**, *10*, 1720. [CrossRef]
104. Montgomery, J.L.; Allen, V.G.; Pond, K.R.; Miller, M.F.; Wester, D.B.; Brown, C.P.; Evans, R.; Bagley, C.P.; Ivy, R.L.; Fontenot, J.P. Tasco-Forage: IV. Influence of a Seaweed Extract Applied to Tall Fescue Pastures on Sensory Characteristics, Shelf-Life, and Vitamin E Status in Feedlot-Finished Steers 1. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 884–894. [CrossRef]
105. Braden, K.W.; Blanton, J.R.; Montgomery, J.L.; Van Santen, E.; Allen, V.G.; Miller, M.F. Tasco Supplementation: Effects on Carcass Characteristics, Sensory Attributes, and Retail Display Shelf-Life. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 754–768. [CrossRef]
106. Zhu, W.; Li, D.; Wang, J.; Wu, H.; Xia, X.; Bi, W.; Guan, H.; Zhang, L. Effects of Polymannuronate on Performance, Antioxidant Capacity, Immune Status, Cecal Microflora, and Volatile Fatty Acids in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 345–352. [CrossRef]
107. Islam, M.M.; Ahmed, S.T.; Kim, Y.J.; Mun, H.S.; Kim, Y.J.; Yang, C.J. Effect of Sea Tangle (*Laminaria japonica*) and Charcoal Supplementation as Alternatives to Antibiotics on Growth Performance and Meat Quality of Ducks. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2014**, *27*, 217–224. [CrossRef]
108. Fike, J.H.; Saker, K.E.; O'Keefe, S.F.; Marriott, N.G.; Ward, D.L.; Fontenot, J.P.; Veit, H.P. Effects of Tasco (a Seaweed Extract) and Heat Stress on N Metabolism and Meat Fatty Acids in Wether Lambs Fed Hays Containing Endophyte-Infected Fescue. *Small Rumin. Res.* **2005**, *60*, 237–245. [CrossRef]
109. Abudabos, A.M.; Okab, A.B.; Aljumaah, R.S.; Samara, E.M.; Abdoun, K.A.; Al-Haidary, A.A. Nutritional Value of Green Seaweed (*Ulva lactuca*) for Broiler Chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* **2013**, *12*, 177–181. [CrossRef]
110. Jagtap, A.S.; Meena, S.N. Seaweed Farming: A Perspective of Sustainable Agriculture and Socio-Economic Development. In *Natural Resources Conservation and Advances for Sustainability*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2021; pp. 493–501.
111. Ferdouse, F.; Løvstad Holdt, S.; Smith, R.; Murúa, P.; Yang, Z. *The Global Status of Seaweed Production, Trade and Utilization*; FAO Globefish Research Programme; FAO: Rome, Italy, 2018; Volume 124, p. 120.
112. Van Den Burg, S.W.K.; Dagevos, H.; Helmes, R.J.K. Towards Sustainable European Seaweed Value Chains: A Triple P Perspective. *ICES J. Mar. Sci.* **2021**, *78*, 443–450. [CrossRef]
113. Biris-Dorhoi, E.S.; Michiu, D.; Pop, C.R.; Rotar, A.M.; Tofana, M.; Pop, O.L.; Socaci, S.A.; Farcas, A.C. Macroalgae—A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutrients* **2020**, *12*, 85. [CrossRef] [PubMed]
114. Hasselström, L.; Thomas, J.B.; Nordström, J.; Cervin, G.; Nylund, G.M.; Pavia, H.; Gröndahl, F. Socioeconomic Prospects of a Seaweed Bioeconomy in Sweden. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1610. [CrossRef] [PubMed]
115. López-Mosquera, M.E.; Fernández-Lema, E.; Villares, R.; Corral, R.; Alonso, B.; Blanco, C. Composting Fish Waste and Seaweed to Produce a Fertilizer for Use in Organic Agriculture. *Procedia Environ. Sci.* **2011**, *9*, 113–117. [CrossRef]
116. Yang, Q.; Gao, Y.; Ke, J.; Show, P.L.; Ge, Y.; Liu, Y.; Guo, R.; Chen, J. Antibiotics: An Overview on the Environmental Occurrence, Toxicity, Degradation, and Removal Methods. *Bioengineered* **2021**, *12*, 7376–7416. [CrossRef]
117. Van Boeckel, T.P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B.T.; Levin, S.A.; Robinson, T.P.; Teillant, A.; Laxminarayan, R. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5649–5654. [CrossRef]
118. Polianciuc, S.I.; Gurzău, A.E.; Kiss, B.; Georgia Ștefan, M.; Loghin, F. Antibiotics in the Environment: Causes and Consequences. *Med. Pharm. Rep.* **2020**, *93*, 231–240. [CrossRef]
119. Kuppusamy, S.; Kakarla, D.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M.; Yoon, Y.E.; Lee, Y.B. Veterinary Antibiotics (VAs) Contamination as a Global Agro-Ecological Issue: A Critical View. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2018**, *257*, 47–59. [CrossRef]
120. Jayalakshmi, K.; Paramasivam, M.; Sasikala, M.; Sumithra, A. Review on Antibiotic Residues in Animal Products and Its Impact on Environments and Human Health. *J. Entomol. Zool. Stud.* **2017**, *5*, 1446–1451.
121. Maertens, L. Possibilities to Reduce the Feed Conversion in Rabbit Production. In Proceedings of the Giornate di Coniglicoltura ASIC, Forlì, Italy, 2–3 April 2009; pp. 57–59.
122. Austin, K.F. Soybean Exports and Deforestation from a World-Systems Perspective: A Cross-National Investigation of Comparative Disadvantage. *Sociol. Q.* **2010**, *51*, 511–536. [CrossRef]
123. Van Krimpen, M.M.; Bikker, P.; Van Der Meer, I.M.; van der Peet-Schwering, C.M.C.; Vereijken, J.M. *Cultivation, Processing and Nutritional Aspects for Pigs and Poultry of European Protein Sources as Alternatives for Imported Soybean Products*; Wageningen UR Livestock Research: Lelystad, Netherlands, 2013; p. 48.

124. Maertens, L.; Cavani, C.; Petracci, M. Nitrogen and Phosphorus Excretion on Commercial Rabbit Farms: Calculations Based on the Input-Output Balance. *World Rabbit Sci.* **2005**, *13*, 3–16. [CrossRef]
125. Lopez-Santamarina, A.; Cardelle-Cobas, A.; del Carmen Mondragon, A.; Sinisterra-Loaiza, L.; Miranda, J.M.; Cepeda, A. Evaluation of the Potential Prebiotic Effect of Himanthalia Elongata, an Atlantic Brown Seaweed, in an in Vitro Model of the Human Distal Colon. *Food Res. Int.* **2022**, *156*, 111156. [CrossRef] [PubMed]
126. Wu, H.; Huo, Y.; Hu, M.; Wei, Z.; He, P. Eutrophication Assessment and Bioremediation Strategy Using Seaweeds Co-Cultured with Aquatic Animals in an Enclosed Bay in China. *Mar. Pollut. Bull.* **2015**, *95*, 342–349. [CrossRef]
127. Nardelli, A.E.; Chiozzini, V.G.; Braga, E.S.; Chow, F. Integrated Multi-Trophic Farming System between the Green Seaweed *Ulva lactuca*, Mussel, and Fish: A Production and Bioremediation Solution. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 847–856. [CrossRef]
128. Znad, H.; Awual, M.R.; Martini, S. The Utilization of Algae and Seaweed Biomass for Bioremediation of Heavy Metal-Contaminated Wastewater. *Molecules* **2022**, *27*, 1275. [CrossRef] [PubMed]
129. Fraga-Corral, M.; Ronza, P.; Garcia-Oliveira, P.; Pereira, A.G.; Losada, A.P.; Prieto, M.A.; Quiroga, M.I.; Simal-Gandara, J. Aquaculture as a Circular Bio-Economy Model with Galicia as a Study Case: How to Transform Waste into Revalorized by-Products. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *119*, 23–35. [CrossRef]
130. Marinho, G.S.; Holdt, S.L.; Birkeland, M.J.; Angelidaki, I. Commercial Cultivation and Bioremediation Potential of Sugar Kelp, Saccharina Latissima, in Danish Waters. *J. Appl. Phycol.* **2015**, *27*, 1963–1973. [CrossRef]
131. Buck, B.H.; Troell, M.F.; Krause, G.; Angel, D.L.; Grote, B.; Chopin, T. State of the Art and Challenges for Offshore Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA). *Front. Mar. Sci.* **2018**, *5*, 165. [CrossRef]
132. Kleitou, P.; Kletou, D.; David, J. Is Europe Ready for Integrated Multi-Trophic Aquaculture? A Survey on the Perspectives of European Farmers and Scientists with IMTA Experience. *Aquaculture* **2018**, *490*, 136–148. [CrossRef]
133. Guerrero, S.; and Creamades, J. *Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA): A Sustainable, Pioneering Alternative for Marine Cultures in Galicia*; Xunta de Galicia: Pontevedra, Spain, 2012.


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## Publicación 2.

Al-Soufi, S.; Nicodemus, N.; Carro, M.D.; López-Alonso, M.; Miranda, M.; Muíños, A.; Cegarra, E.; Vázquez-Belda, B.; Domínguez, H.; Torres, M.D.; Flórez-Fernández, N.; García, J. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition: *In Vitro* Digestibility, Caecal Fermentability, and Microbial Inhibitory Activity of Seven Macroalgae Species from Galicia (NW Spain). Agriculture 2023, 13, 1995. https://doi.org/10.3390/ agriculture13101995

USC
DE COMPOSTELA

agriculture

MDPI

*Article*

# Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition: *In Vitro* Digestibility, Caecal Fermentability, and Microbial Inhibitory Activity of Seven Macroalgae Species from Galicia (NW Spain)

**Sabela Al-Soufi [1], Nuria Nicodemus [2], María Dolores Carro [2], Marta López-Alonso [1], Marta Miranda [3,*], Antonio Muíños [4], Eugenio Cegarra [5], Beatriz Vázquez-Belda [6], Herminia Domínguez [7], María Dolores Torres [7], Noelia Flórez-Fernández [7] and Javier García [2]**

1 Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; sabelaalsoufi.novo@usc.es (S.A.-S.); marta.lopez.alonso@usc.es (M.L.-A.)
2 Departamento de Producción Agraria, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain; nuria.nicodemus@upm.es (N.N.); mariadolores.carro@upm.es (M.D.C.); javier.garcia@upm.es (J.G.)
3 Departamento de Anatomía, Produción Animal e Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
4 Porto Muíños S.L., 15185 Cerceda, Spain; antonio@portomuinos.com
5 De Heus Nutrición Animal, 15004 A Coruña, Spain; ecegarra@deheus.com
6 Laboratorio de Hixiene, Inspección e Control de Alimentos, Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; beatriz.vazquez@usc.es
7 CINBIO, Departmento de Enxeñaría Química, Facultade de Ciencias, Campus Ouresnse, Universidade de Vigo, 32004 Ourense, Spain; herminia@uvigo.gal (H.D.); matorres@uvigo.es (M.D.T.); noelia.florez@uvigo.es (N.F.-F.)
* Correspondence: marta.miranda@usc.es

check for updates

**Citation:** Al-Soufi, S.; Nicodemus, N.; Carro, M.D.; López-Alonso, M.; Miranda, M.; Muíños, A.; Cegarra, E.; Vázquez-Belda, B.; Domínguez, H.; Torres, M.D.; et al. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition: *In Vitro* Digestibility, Caecal Fermentability, and Microbial Inhibitory Activity of Seven Macroalgae Species from Galicia (NW Spain). *Agriculture* **2023**, *13*, 1995. https://doi.org/10.3390/agriculture13101995

Academic Editor: Jun He

Received: 22 September 2023
Revised: 10 October 2023
Accepted: 11 October 2023
Published: 13 October 2023

**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

**Abstract:** The limitation on the prophylactic use of antibiotics in animal feed in Europe has critically challenged the rabbit meat industry, which urgently needs to find solutions. A feasible alternative could be using macroalgae in the diet to improve the gut health. This research studied seven species of marine macroalgae in four formats (dehydrated, enzymatically hydrolyzed, aqueous extract, and aqueous extract of hydrolyzed macroalgae) in order to select the most promising ones for their use in rabbit feed. Chemical composition, *in vitro* digestibility, *in vitro* caecal gas, total volatile fatty acid (VFA) production, and minimal inhibitory concentrations (MIC) against common pathogens were studied. All *S. latissima* products showed high caecal fermentability and VFA production, especially in both types of extracts. The *H. elongata* aqueous extract was remarkable due to its high *in vitro* butyrate production, which can be of great interest for improving gut health. The MIC results did not indicate any clear inhibition of the pathogens tested. The macroalgae tested appear to have a potentially prebiotic effect, rather than a direct antimicrobial activity. However, these results must be confirmed *in vivo*, in order to observe the real benefits of feeding macroalgae during the rabbit weaning period.

**Keywords:** *in vitro* digestibility and gas production; marine macroalgae; microbial inhibitory activity; rabbit; nutrition

## 1. Introduction

Rabbit meat is a valuable niche product in Mediterranean countries such as Spain, France, and Italy, and the EU is the second biggest producer of this foodstuff in the world [1]. This meat is known for its beneficial nutritional properties—as a source of high-quality protein (CP), B group vitamins, and healthy fatty acids—and also for its characteristic taste and tenderness [1–5].

In Europe, the rabbit industry is undergoing a critical period because of the gradual reduction in the consumption of this type of meat and the many structural weaknesses in the production system [1,6]. Moreover, the limitation on the prophylactic use of antibiotics in animal production produced in Europe in the last years led to an increase in rabbit mortality in many farms, often making production almost economically unsustainable [7,8]. In this respect, the main challenge in rabbit production is to maintain gut health in the rabbits during the post-weaning period [9–11], when the digestive tract is very vulnerable and susceptible to the proliferation of bacterial pathogens (e.g., *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli*) and parasitic protozoa (e.g., coccidians) [12]. In this context, alternatives to antibiotics that improve the gut health and resilience of rabbits to pathogens are required [6], and dietary strategies are especially key in the post-weaning period [13,14]. The addition of marine macroalgae to rabbit diets is a very promising alternative approach, providing numerous benefits that have already been demonstrated in other animal production systems (for reviews, see [6,15–18]).

Marine macroalgae are classified into brown (Phaeophyta), green (Chlorophyta), and red macroalgae (Rhodophyta) [19,20]. Macroalgae have a particular nutritional make-up that is very different from that of most animal feeds, although the composition varies widely across species [21]. They contain high levels of minerals and vitamins, moderate or low levels of fat, although they are usually rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), polyphenolic compounds, and a variable protein level [22–24]. In addition, macroalgae show great potential as animal feed due to their high contents of dietary fibre (25–75% of dry matter (DM)) [25,26] that includes insoluble and soluble fibre. The insoluble fibre, which is composed of hemicellulose, cellulose, and lignin, is poorly fermented [25,26]. The soluble fibre is mainly composed of carbohydrates such as alginates, laminarins, and fucoidans in brown macroalgae, of ulvans and sulphated galactans in green macroalgae, and of agars and carrageenans in red macroalgae [27–29]. These polysaccharides are not generally digested in the small intestine of farm animals and can therefore be either partly or fully fermented in the large intestine. Fermentation of soluble fibre by gut microbiota produces different gases and metabolites like lactic acid and volatile fatty acids (VFA), which modulate the gut environment [6,30]. It is therefore important to determine how macroalgae are fermented, because this process determines their potential prebiotic effects [31–33]. In addition, some macroalgae components may have antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant properties, and it has been suggested that including them in livestock diets could potentially improve meat quality [22,23]. In summary, feeding macroalgae could improve gut health in farm animals and therefore promote nutrient absorption, animal growth, disease protection, and animal welfare [20,34]. Moreover, the inclusion of macroalgae in animal feed has many environmentally related benefits (for reviews, see [6,20,34]), as their production does not require fresh water, fertilization, or arable land [35] and it provides many ecosystem services [36].

The Atlantic coast of Galicia (north-western Spain) is a privileged enclave for macroalgae production, as it hosts more than 700 species with very high production rates [37,38]. Numerous companies in the region either harvest or cultivate macroalgae in a sustainable manner for human consumption [39], and during processing each company accumulates more than 40,000 kg of macroalgal discards every year that cannot be marketed. Recycling these discards in animal feeding, following a circular economy approach, would add value to the macroalgae industry and provide a high-quality ingredient for animal feed [37,40], including rabbit feed [6]. This approach would reinforce both the macroalgae and rabbit production sectors, and could also be used as a marketing strategy to increase rabbit meat consumption by environmentally responsible consumers [40].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Despite the aforementioned benefits, experience regarding the inclusion of macroalgae in animal feed remains scarce, especially in the case of rabbit production. In addition, the great diversity of marine macroalgae makes correct characterization of their properties necessary before their inclusion in animal feed. The objective of this study was therefore to characterize 19 products obtained from seven macroalgae species from the Galician coast, by analyzing

their chemical composition, *in vitro* digestibility, and caecal fermentation, and minimum inhibitory concentrations (MICs), in order to assess their potential benefits in rabbit health. The ultimate aim was to select the most promising macroalgae for further *in vivo* evaluation.

## 2. Materials and Methods

Data collection was carried out according to Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, and the trial complied with the Spanish legislation on animal care (RD 53/2013). The procedures were approved by the Bioethics Committee of the Universidad Politécnica de Madrid, Spain (protocol code 2021-002, approved 24 February 2021).

### *2.1. Macroalgae Products*

A total of 19 samples of macroalgae products were tested, including 7 species and 4 different types of macroalgae products. All samples were provided by Porto-Muiños S.L. (Cerceda, La Coruña, Spain) and were sustainably harvested or cultivated on the Atlantic coast of Galicia (NW Spain).

The macroalgae species were selected according to different criteria (Table 1). Some were chosen because they are either already cultivated in Galicia (*Saccharina latissima*) or potentially cultivable in the short term (*Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, and *Ulva* spp.), and therefore their long-term production is guaranteed without relying on harvesting of wild populations [39,41]. Another criterion was that the industrial processing of the macroalgae produces discards that could be used for animal feed, thereby adding value to these industries and promoting a circular-economy strategy [6,40]. Other macroalgae like *Fucus vesiculosus* and *Mastocarpus stellatus* are highly abundant, but have little commercial value, and their use in animal feed could improve their market value. *Himanthalia elongata* has already been identified as a valuable ingredient for livestock diets [23] and also has potential benefits on human health [42]. Finally, *Ulva* spp. can improve gut health and productive performance of rabbits [24,43].

**Table 1.** Classification, selection criteria, and type of product tested for each macroalgae.

| Name | | Group | Selection Criteria | Type of Sample Tested |
|---|---|---|---|---|
| *Saccharina latissima* | Sugar kelp | Brown | Cultivated. Long-term future. Produces discards | - Dehydrated<br>- Hydrolyzed<br>- Aqueous extract<br>- Hydrolyzed aqueous extract |
| *Fucus vesiculosus* | Fucus | Brown | Harvested. Abundant and underexploited | - Dehydrated<br>- Hydrolyzed<br>- Hydrolyzed aqueous extract |
| *Himanthalia elongata* | Sea spaghetti | Brown | Harvested, potentially cultivable. Produces discards. Proven benefits | - Dehydrated<br>- Hydrolyzed<br>- Aqueous extract |
| *Undaria pinnatifida* | Wakame | Brown | Harvested, potentially cultivable. Long-term future. Produces discards | - Dehydrated<br>- Hydrolyzed<br>- Aqueous extract |
| *Laminaria ochroleuca* | Kombu | Brown | Harvested. Produces discards | - Hydrolyzed<br>- Hydrolyzed aqueous extract |
| *Ulva* spp. | Sea lettuce | Green | Harvested, potentially cultivable. Long-term future. Very abundant. Produces discards. Proven benefits | - Dehydrated<br>- Hydrolyzed<br>- Hydrolyzed aqueous extract |
| *Mastocarpus stellatus* | Star shaped moss | Red | Harvested. Very abundant | - Hydrolyzed aqueous extract |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The selected macroalgae were tested in four different formats (Table 1) obtained after following various industrial processes: dehydrated, enzymatically hydrolyzed, aqueous extract, and aqueous extract of hydrolyzed macroalgae. The aqueous extracts were prepared with the aim of obtaining the compounds of interest (mainly soluble polysaccharides). Macroalgae are commonly dried to extend their shelf life, and the dehydrated macroalgae tested in this study were obtained by drying the samples at low temperature (<40 °C) for 4–5 days before grinding them in a micro-grinding mill (Komodin K-160 P, Lleal, Granollers, Spain) that rendered powder samples. The selected macroalgae were also subjected to enzymatic hydrolysis to improve both carbohydrates and protein digestibility. To this end, the samples were incubated for 24 h in a water solution (1:15 macroalgae:water; in weight) containing 200 µL/100 mL solution (pH 6, 50 °C) of the enzyme Pectinex Ultra tropical (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), and 200 µL/100 mL solution (pH 8, 55 °C) of the enzyme Alcalase (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). The enzymes were inactivated by raising the temperature to 90 °C for 15 min. Then, the hydrolyzed macroalgae were lyophilized.

For the aqueous extraction of the soluble compounds of macroalgae, samples were mixed with water (1:30 m:v) and subjected to autohydrolysis in a Parr pressure reactor operating in a non-isothermal mode up to 160 °C and 110 psi. The supernatant was then collected and dried with a spray dryer (Büchi B-290, Flawil, Switzerland) equipped with a standard cyclone (1.5 mm nozzle). The operating settings were 115 °C inlet temperature, 4 mL/min (pump at 15%) feed solution flow rate, 1050 L/h atomization air flow rate, and 4.1 bar pressure. Finally, the aqueous extract of the enzymatically hydrolyzed macroalgae was obtained, as the enzymatic hydrolysis breaks the cell walls and release compounds of interest. Samples were mixed with water (1:10 ratio) containing the enzyme Celluclast (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) at 4%, and the mixture was incubated at 50 °C for 6 h. The enzyme was inactivated by raising the temperature to 90 °C for 15 min. The supernatant was then dried and ground as commented before. Different products were obtained for each macroalgae species, depending on its characteristics and commercial interest.

### 2.2. In Vitro Digestibility

The *in vitro* ileal and faecal digestibility of dry matter (DM) and the faecal digestibility of crude protein (CP) were determined in all samples as previously described [44,45], using the adapted Ankom bags method [46]. Briefly, 0.5 g of each sample was weighed and placed in an Ankom® filter bag (Ankom Technology, Fairport, NY, USA). Bags were introduced in a Daisy$^{II}$ Incubator jar and incubated first with a HCl + pepsin solution (0.25 g pepsin/g sample, pepsin from porcine gastric mucosa P7000-100G, Sigma, Darmstadt, Germany) for 2 h (step 1: stomach), then with a pancreatin solution (1 g pancreatin/g sample, pancreatin from porcine pancreas P7545-100G, Sigma, Darmstadt, Germany) for 3 h 30 min (step 2: small intestine), and finally with Viscozyme for 16 h (step 3: caecum). The weight of the residues obtained in steps 2 and 3 were used to determine the *in vitro* ileal (ivIDMd) and faecal DM (ivFDMd) digestibility, respectively. The faecal digestibility of CP (ivFCPd) was determined by analyzing the nitrogen (N) content in the final residue obtained after step 3. Sugar beet pulp (SBP) and untreated cereal straw were selected as reference samples for highly and poorly fermentable sources of fibre, respectively, and were subjected to the *in vitro* procedures described previously.

### 2.3. Estimation of Nutritional Value

The nutritional value of the samples was estimated from the chemical composition and the ivFDMd, as described for rabbit feed [47]. The corresponding equations are generally used for animal feed but not for individual ingredients, and the estimates obtained are therefore only indicative, although they helped in ranking the different macroalgae prod-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ucts. The following equations [47] were used to estimate the apparent faecal digestibility of DM (DMd) and of gross energy (GEd), and the digestible energy content (DE):

$$\text{DMd} = -0.019 + 0.98 \times (\text{ivFDMd}/100)$$

$$\text{GEd} = -0.003 + 0.95 \times (\text{ivFDMd}/100)$$

$$\text{DE (MJ/kg DM)} = 1.63 + 15.0 \times (\text{ivFDMd}/100).$$

### *2.4. In Vitro Caecal Fermentation and VFA Production*

The potential fermentability of all samples in the caecum was assessed by measuring the *in vitro* gas production after the incubation of samples with caecal inoculum from rabbits as described by Abad-Guamán et al. [48]. The insoluble residues obtained after the 2-step *in vitro* DM digestibility procedure of the macroalgae products were also incubated *in vitro* when their ivIDMd was below 93%, as there was not enough residue for samples having greater ivIDMd values. Samples (200 mg DM) were accurately weighted into 60 mL fermentation vials.

A total of four unsexed crossbred hybrid rabbits (New Zealand White × Californian, V × R line from UPV, Valencia, Spain) weaned at 30 d of age and fed a standard diet (16.1% CP, 42.1% total dietary fibre (TDF), 32.6% neutral detergent fibre (NDF), 9.51% soluble fibre (SF)) were slaughtered by head concussion at 67 days of age and 2.3 ± 0.03 kg body weight, which is the usual market weight in Spain. Consequently, there were 4 replicates like in a previous study [48]. The caeca of the 4 rabbits were immediately separated, 8 g of caecal digesta of each rabbit was carefully weighted and separately mixed with 800 mL of Goering and Van Soest buffer solution [49], and the mixtures were homogenized for 1 min with a domestic blender. Twenty mL of the mixture was immediately added to each vial with the aid of a peristaltic pump (Watson-Marlow 520UIP31; Watson-Marlow Fluid Technology Group, Cornwall, UK). The vials were sealed with rubber stoppers and incubated at 39 °C. Gas production was measured with a pressure transducer (Wide Range Pressure Meter; Sper Scientific LTD, Scottsdale, AZ, USA) and a plastic syringe at 3, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 58, 75, 103, and 119 h. After each measurement, the gas produced was liberated.

After 24 h of incubation, 1 mL of the content of each vial was collected by using an insulin syringe and mixed with 80 µL of 10% $H_2SO_4$ to stop fermentation. This sample was used to analyze VFA production in the samples that yielded at 48 h of incubation significantly more gas production than the untreated cereal straw used as reference (gas production > 45 mL/g DM). Samples were processed as described by Ocassio-Vega et al. [50] and VFA concentration was measured by gas chromatography [51] using a Pelkin Elmer Autosystem XL gas chromatograph (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, USA) equipped with an automatic injector, detector flame ionization, and a semi-capillary column (TR-FFAP 30 m × 0.53 mm × 1 µm; Supelco, Barcelona, Spain).

Each sample (19 macroalgae products + 12 insoluble residues of 2-step *in vitro* digestibility + 2 reference ingredients) were incubated with each of the 4 caecal inocula to obtain 4 replicates per sample, making a total of 132 vials with substrate. In addition, 8 vials with no substrate (blanks; 2/inoculum) were incubated to correct the amount of gas and VFA for endogenous production at each measurement time.

### *2.5. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC)*

The antimicrobial potential of the 19 samples of macroalgae products was tested with 6 strains of aerobic pathogenic bacteria (strains acquired from the CECT (Spanish Type Culture Collection, University of Valencia): *Escherichia coli* (CECT 727 and CETC 434), *Salmonella typhimurium* (CECT 4594), *Salmonella enteritidis* (CECT 4300), *Listeria monocytogenes* (CECT 4032) and *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 108). The antimicrobial potential was also tested with 6 strains of anaerobic pathogenic bacteria (provided by the CECT): *Clostridium perfringens* (CECT 376, CECT 486 and CECT 563) and *Clostridium difficile* (CECT

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

531, CECT 9136 and CECT 9137). Additionally, 2 aerobic pathogenic bacteria obtained from weaned rabbits were tested: *Escherichia coli* R1 and R2 (provided by the *Escherichia coli* Reference Laboratory (LREC, University of Santiago de Compostela, Spain).

The lyophilized strains of bacteria were reconstituted following the CECT guidelines. Viability, multiplication capacity, and identification were confirmed on selective/differential culture media and under temperature, time, and oxygen conditions suitable for each genus: VRBL-Violet Red Bile Glucose agar for *E. coli*, SM2-chromID Salmonella chromogenic agar, ALOA-chromogenic agar for *Listeria* spp., CFC agar for *Pseudomonas* spp., and Clostridium Reinforced agar for clostridia. The strains were then frozen in tubes with cryoballs in phosphate buffered saline (PBS) (−20 °C) until use.

The highest concentration of macroalgae products tested in this study (8.2 mg/mL) was selected in order to replicate the *in vivo* conditions when macroalgae are used in animal feed, with levels up to 2.5% of macroalgae in the diet [21,23,32]. A dilution factor of about 3.28 was assumed due to water consumption, as in rabbits it may be around 1.5 g water/g feed, although this may be higher depending on the type of dietary fibre. The potential beneficial effects of macroalgae in animal/rabbit nutrition were observed at around 1–2% of the diet [21,23,32].

#### 2.5.1. Aerobic Microorganisms: Broth Dilution Method

The method used to assess the antimicrobial potential of the macroalgae products with the aerobic strains was serial microdilution in polystyrene microplates, following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute [52].

Aliquots (65 mg) of each sample were weighed and dissolved in 2 mL of 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), to achieve an initial concentration of 32.5 mg/mL DMSO. In order to remove any impurities present, the diluted samples were filtered through a 0.22 µm filter into sterile tubes. From this initial extract, serial twofold dilutions were made in culture medium (Mueller–Hinton Broth), which is ideal for growth of these bacteria in microplates. Therefore, the concentrations tested ranged from 0.03 to 8.2 mg/mL (0.03, 0.06, 0.13, 0.26, 0.51, 1.02, 2.05, 4.10, and 8.2 mg/mL).

The 8 strains of aerobic bacteria tested were diluted in Mueller–Hinton Broth to a concentration of $10^8$ cfu/mL (corresponding to the 0.5 MacFarland standard). For the assay, a 96-well microplate was used for each macroalgae sample. Aliquots (50 µL) of the corresponding macroalgae product dilution and of the bacterial solution were dispensed in each individual well. The DMSO (1:10) was used as a negative control and lactic acid (40%) as a positive control. Duplicate microplates were assessed for each macroalgae product. Microplates were incubated at 37 °C for 24 h before interpretation of results. The MIC was determined as the lowest concentration of sample solution that completely inhibited growth of the bacteria in the microdilution wells.

#### 2.5.2. Anaerobic Microorganisms: Agar Dilution Method

For the anaerobic bacterial strains, the method used to evaluate the antimicrobial potential of the macroalgae samples was the agar dilution method, following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [53].

Macroalgae products were tested at 2 different concentrations (6 and 8.2 mg/mL). The samples were weighed (0.32 and 0.20 g, respectively) and dissolved in 2 mL of DMSO/EtOH 50%; and then diluted in 18 mL of Clostridium reinforced agar at 50 °C. Each preparation was thoroughly mixed, transferred to a Petri plate (19 samples × 2 concentrations), and left to solidify completely. Aliquots (2 µL) of each of the 6 Clostridia strains were inoculated in each plate, in duplicate ($10^8$ cfu/mL, 0.5 McFarland ABS). Lactic acid (40%) was used as positive control, and an identical plate without macroalgae products was used as negative control with the same Clostridia strains. The plates were incubated in anaerobiosis boxes at 37 °C for 48 h. Duplicate plates were assessed for each macroalgae product and each concentration tested. The results were considered negative if the bacteria were able to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

grow in the agar containing the macroalgae products and positive if bacterial proliferation was inhibited.

### *2.6. Chemical Composition*

The AOAC (2000) methods were used to determine dry matter (method 934.01), ash (method 942.05), nitrogen (N; method 968.06), TDF (985.29), acid detergent fibre (ADF), and acid detergent lignin (ADL) in the macroalgae products and reference ingredients (973.18, ref. [54]). The NDF was determined using the filter bag system [55] (Ankom Technology, New York, NY, USA), with thermo-stable amylase and without any sodium sulphite added. The NDF was corrected for the ash and protein content, as indicated for total dietary fibre, while ADF and ADL were only corrected for the ash content of the ADL residue. The SF was calculated by difference, as TDF–NDF. Crude protein was calculated as N × 5 [56]. The difference 100-ash-CP-TDF was calculated to estimate the potential dietary fibre not retained in TDF (RES), assuming low levels (<10%) of sugars/oligosaccharides, starch, and ether extract in the samples.

### *2.7. Statistical Analysis*

Gas production values measured at each time and VFA values at 24 h were corrected for the amount of gas and VFA, respectively, produced in the corresponding blanks to discount the endogenous production from the caecal content used as inoculum [50]. Gas production data were analyzed using a mixed model for repeated measurements, including the sample, the time of measurement, and their interaction as fixed effects, and inoculum (donor rabbit) as a random effect. The model was applied using the PROC MIXED procedure in the SAS package (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). A heterogeneous compound symmetry structure was fitted as it yielded the lowest value of the Schwarz Bayesian criterion [57]. When the effect of sample or its interaction with the time of measurement was significant, a Dunnett's test was used to compare the value of each macroalgae product with those of the reference ingredients (untreated cereal straw and SBP). Relationships between gas production at 24 h and chemical composition of samples were tested by linear and quadratic correlation analyses using the CORR and GLM procedures in the SAS package. The VFA production at 24 h was analyzed with a mixed model including the sample as a fixed effect and that of inoculum (donor rabbit) as a random effect. Dunnett's test was used to compare the value of each macroalgae product with those of the reference ingredients (straw and SBP).

## 3. Results and Discussion

### *3.1. Chemical Composition*

The chemical composition of the dehydrated macroalgae varied widely (Table 2). The coefficients of variation ranged from 21% for TDF to 66% for RES (100-ash-CP-TDF). The chemical composition of dehydrated *H. elongata* was found to be rather similar to that of samples previously collected in Galicia, but dehydrated *S. latissima* and *U. pinnatifida* showed different composition (Table 3). As already pointed out, the chemical composition of macroalgae varies depending on geographical location, season, environmental factors, and stressors [21,25,26,58,59]. The chemical composition of both types of extracts was also very variable, with coefficients of variation of 8 for NDF and 106% for SF.

The ash contents of the dehydrated macroalgae were very high (20.8–50.1% DM), which is consistent with the results reported by other authors for these macroalgae species (Table 3), indicating a much higher mineral content than in terrestrial plants [25]. In this respect, it is important to take into account the mineral content of each macroalgae for incorporation in diets, mainly due to the iodine and heavy metals contents [58]. The CP of the dehydrated macroalgae ranged between 7.10 and 16.4% DM, which is consistent with previous reports (5–15% for brown and 10–25% for green algae [23], and with the values previously obtained for these macroalgae in Galicia (Table 3). *Ulva* spp. (16.4%) and *U. pinnatifida* (14.8%) contained almost twice as much protein as SBP (7.99%), and it has been reported that their CP contains relevant proportions of leucine and valine [60,61]. However,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CP content in all macroalgae tested was lower than other protein feeds commonly used in livestock feeding, as sunflower meal or soybean meal.

In the present study, the TDF content varied depending on the species of macroalgae and the type of extract. Dehydrated macroalgae contained large amounts of TDF (28.6–52.7%), although not as high as cereal straw (78.1%) or SBP (71.7%). However, in contrast to straw, macroalgae TDF contained approximately equal parts of NDF and SF (NDF: from 17.1 to 31.3% for macroalgae and 74.3% for straw; SF: from 11.6 to 22.5% for macroalgae and 3.79% for straw), being the values of the macroalgae closer to those of SBP (36.5% NDF and 35.2% of SF). Unlike SBP, some dehydrated macroalgae contained remarkable amounts of ADL (3.63–14.2% for macroalgae; 1.91% for SBP), which may be associated with polyphenolic compounds other than lignin (such as phlorotannins), as lignin is only found in red macroalgae [62]. The results for TDF, although very variable, are broadly consistent with previous reports for samples collected in Galicia (Table 3). The results obtained for SF and other components of TDF are not easy to compare with previously published data because of the variable methods used for determination of macroalgae fibre components in different studies [23,25,26].

**Table 2.** Chemical composition (g/100 g; dry matter basis) of macroalgae products and reference ingredients (untreated cereal straw and sugar beet pulp) [1].

| | Ash | CP | TDF | NDF | SF | ADF | ADL | RES | RES + SF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dehydrated macroalgae | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 23.1 | 10.6 | 52.7 | 31.3 | 21.4 | 30.7 | 14.2 | 13.6 | 35.0 |
| *Himanthalia elongata* | 41.4 | 9.51 | 41.7 | 19.4 | 22.3 | 17.8 | 13.3 | 7.39 | 29.7 |
| *Saccharina latissima* | 20.8 | 7.10 | 43.1 | 22.6 | 20.5 | 10.1 | 3.63 | 29.0 | 49.5 |
| *Ulva* spp. | 27.7 | 16.4 | 44.1 | 21.6 | 22.5 | 14.7 | 7.87 | 11.8 | 34.3 |
| *Undaria pinnatifida* | 50.1 | 14.8 | 28.6 | 17.1 | 11.5 | 11.6 | 7.10 | 6.5 | 18.0 |
| Hydrolyzed macroalgae | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 28.9 | 10.6 | 53.2 | 30.2 | 23.0 | 21.3 | 15.9 | 7.3 | 30.3 |
| *Himanthalia elongata* | 45.5 | 8.92 | 40.9 | 15.3 | 25.6 | 16.4 | 12.5 | 4.7 | 30.3 |
| *Laminaria ochroleuca* | 43.4 | 8.36 | 33.0 | 11.2 | 21.8 | 11.4 | 3.85 | 15.2 | 37.0 |
| *Ulva* spp. | 39.1 | 13.0 | 34.1 | 5.63 | 28.5 | 6.07 | 4.19 | 13.8 | 42.3 |
| *Undaria pinnatifida* | 58.2 | 14.2 | 21.3 | 5.80 | 15.5 | 5.68 | 4.66 | 6.3 | 21.8 |
| Aqueous extract | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 28.7 | 8.23 | 10.4 | 4.83 | 5.60 | 4.72 | 4.32 | 52.7 | 58.3 |
| *Himanthalia elongata* | 55.1 | 3.74 | 29.9 | 0.00 | 29.9 | 0.14 | 0.17 | 11.3 | 41.2 |
| *Saccharina latissima* | 13.6 | 3.49 | 64.7 | 0.00 | 64.7 | 0.00 | 0.00 | 18.2 | 82.9 |
| *Undaria pinnatifida* | 68.7 | 8.91 | 18.6 | 0.26 | 18.3 | 0.17 | 0.16 | 3.8 | 22.1 |
| Hydrolyzed extract | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 32.0 | 9.22 | 29.5 | 1.61 | 27.9 | 1.51 | 1.29 | 29.3 | 57.2 |
| *Laminaria ochroleuca* | 44.4 | 2.37 | 2.70 | 0.54 | 2.16 | 0.82 | 0.77 | 50.5 | 53.1 |
| *Saccharina latissima* | 19.3 | 4.09 | 2.94 | 0.00 | 2.94 | 0.24 | 0.18 | 73.7 | 76.6 |
| *Ulva* spp. | 34.1 | 4.88 | 30.2 | 0.00 | 30.2 | 0.09 | 0.06 | 30.8 | 61.0 |
| *Mastocarpus stellatus* | 31.8 | 10.4 | 43.4 | 2.09 | 41.3 | 0.14 | 0.14 | 14.4 | 55.7 |
| Reference ingredients | | | | | | | | | |
| Untreated cereal straw | 8.80 | 2.90 | 78.1 | 74.3 | 3.79 | 43.8 | 4.20 | 10.2 | 13.9 |
| Sugar beet pulp | 4.70 | 7.99 | 71.7 | 36.5 | 35.2 | 23.6 | 1.91 | 15.6 | 50.8 |

[1] **Crude protein**: [Nitrogen] × 5.0. **TDF**: total dietary fibre. **NDF**: neutral detergent fibre. **SF:** soluble fibre (TDF − NDF). **ADF**: acid detergent fibre. **ADL**: acid detergent lignin. **RES:** 100 − (ash + CP + TDF).

The enzymatic treatment of the macroalgae (hydrolyzed macroalgae products) did not substantially change their chemical composition, especially in *F. vesiculosus* and *H. elongata.* Both the ash (28.9–58.2%) and CP content (8.36–14.2%) were similar to those of the dehydrated samples. In some cases, there was a slight reduction in TDF content due to a lower NDF (5.63–30.2%) but a higher SF level (15.5–28.5%), as it was observed for *Ulva* spp. and *U. pinnatifida.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Table 3.** Review of published data for chemical composition (g/100 g; dry matter basis) of the macroalgae tested in this study.

| Location and Reference | Macroalgae | Ash | Crude Protein | Total Dietary Fibre |
|---|---|---|---|---|
| Galicia, Spain [25] | *Himanthalia elongata* | 36.4 | 14.1 | 37.1 |
| | *Saccharina latissima* | 34.8 | 25.7 | 30.2 |
| | *Mastocarpus stellatus* | 25.0 | 21.3 | 31.7 |
| Galicia, Spain [63] | *Himanthalia elongata* | 31.0 | 6.80 | 39.0 |
| | *Laminaria ochroleuca* | 33.0 | 8.5 | 45.0 |
| | *Undaria pinnatifida* | 35.0 | 20.5 | 39.0 |
| Galicia, Spain [42] | *Himanthalia elongata* | 33.2 | 7.50 | 36.0 |

As expected, both types of extractions influenced the composition of the extract obtained, although in a slightly different way for each macroalgae. No information is available in the literature about the composition of the same extracts for accurate comparisons. The ash content of the extracts ranged from 13.6 to 68.7% DM, and it was numerically higher than that in the corresponding dehydrated macroalgae in most samples. In contrast, the CP content of most extracts was much lower than in the dehydrated macroalgae. For *H. elongata* and *S. latissima*, it was around half in the aqueous extract than in the dehydrated macroalgae (decreased from 9.51% to 3.74%, and from 7.10% to 3.49%, respectively); and the CP reduction was much marked for *Ulva* spp., decreasing from 16.4% in the dehydrated samples to 4.88% in the hydrolyzed extract. In contrast, both aqueous and hydrolyzed extracts of *F. vesiculosus* contained only slightly lower amounts of CP (8.23 and 9.22%, respectively) than the dehydrated macroalgae (10.6%), and CP reductions in the aqueous extract of *U. pinnatifida* were intermediate (8.91 and 14.8% for the extract and the dehydrated macroalgae, respectively). These results suggest a high variability between macroalgae in the CP extraction efficiency, even using the same extraction procedure for all samples. In order to analyze the dietary fibre in the different extracts, it is important to take into account the RES fraction (calculated as RES = 100 − (ash + CP + TDF)), which was very high in some extracts. Considering the low fat and sugar contents usually reported for macroalgae [59,64–66], the RES fraction probably contained mainly soluble carbohydrates, which could not be identified, although in some cases they accounted for a high proportion of the macroalgae. The RES fraction would include the SF that is not precipitated by ethanol or other soluble compounds [67]. In brown macroalgae, such as *S. latissima*, this fraction may correspond to laminarin (1,3-β-D-glucans), which is soluble in water, and alginate (1,4-D-mannuronic acid combined with 1,4-α-L-glucuronic acid), which is soluble at pH between 6 and 9, and/or mannitol [25,68]. These results showed that the standard techniques used to characterize fibre fractions in terrestrial plants do not enable precise quantification of the composition of macroalgae products [25,58,59]. The RES was remarkable in *S. latissima* (29.0% for dehydrated macroalgae and 73.7% for hydrolyzed extract), *F. vesiculosus* (52.7 and 29.3% for aqueous and hydrolyzed extracts, respectively), and the hydrolyzed extracts of *Ulva* spp. (30.8%) and *L. ochroleuca* (50.5%). Therefore, if the RES is considered part of the TDF, and the sum of SF and RES fractions is calculated (Table 2), both the aqueous and hydrolyzed extracts were characterized by high soluble polysaccharides (22.1–82.9%) and very low NDF contents (0–4.83%). These results were expected, as the aim of these extraction processes was to recover the polysaccharides of interest due to their properties and prebiotic potential. Except for *U. pinnatifida*, the sum (RES + SF) was similar or even greater than that of SBP, which is promising due to the fermentation potential of these macroalgae [30,32,69]. Of all the macroalgae considered, *S. latissima* deserves special attention because of the high values of the RES + SF fraction observed in both the aqueous (82.9%) and the hydrolyzed (76.6%) extract, probably due to its high content of laminarin in agreement with the high glucose content in the aqueous extract (80.5%: unpublished data).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 3.2. In Vitro Digestibility and Estimated Energy Content

The values of ivIDMd of dehydrated macroalgae ranged from 38.4 to 73.2%, being all higher than that for SBP (43.3%, except in *F. vesiculosus.* Table 4). When the macroalgae were hydrolyzed the ivIDMd increased by 25% on average. In most dehydrated macroalgae, the values of ivFDMd were similar (42.2–75.0%) than those of SBP (76.8%). The exceptions were *F. vesiculosus* and *H. elongata*, both of which had relatively high sulphate contents (4–7%: unpublished data), and the latter also had a high fucose content (31.5%: unpublished data) probably associated with fucoidans. However, the ivFDMd values were higher in all macroalgae than in the cereal straw (19.8%). Conversely, CP digestibility (ivFCPd) was lower in all macroalgae than in SBP (22.6–59.0% for dehydrated macroalgae and 68.1% for SBP), with some macroalgae (i.e., *F. vesiculosus* and *H. elongata*) having values close to that of cereal straw (17.7%). Both DM and CP digestibility increased when the macroalgae were hydrolyzed (by 20% ivFDMd, and 80% ivFCPd, on average, except in *F. vesiculosus*). The low *in vitro* CP digestibility is consistent with the low *in vivo* CP digestibility reported for *S. latissima* and *Ulva* spp. in rats [70], despite these samples showing the numerically highest values *in vitro* in our study. The ivFDMd and ivFCPd values of the dehydrated macroalgae were negatively correlated with ADF content ($r = -0.97$; $p = 0.005$; $n = 5$) and the protein associated with TDF ($r = -0.96$; $p = 0.011$; $n = 5$), respectively, but they were not correlated with either SF or the sum of RES + SF fractions ($p \geq 0.35$). The negative correlation between ivFDMd and ADF was previously observed for compound feeds for rabbits based on terrestrial plant ingredients [47].

**Table 4.** *In vitro* ileal (ivIDMd) and faecal digestibility of DM (ivFDMd), *in vitro* facecal protein digestibility (ivFCPd), and estimated nutritional value of macroalgae products [1].

| | ***In Vitro* Digestibility (%)** | | | **Estimated Nutritive Value** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ivIDMd** | **ivFDMd** | **ivFCPd** | **DMd (%)** | **GEd (%)** | **DE (MJ/kg Dry Matter)** |
| Dehydrated macroalgae | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 38.4 | 42.2 | 22.6 | 39.5 | 39.8 | 7.96 |
| *Himanthalia elongata* | 57.6 | 63.3 | 25.1 | 60.1 | 59.8 | 11.1 |
| *Saccharina latissima* | 66.0 | 74.3 | 55.6 | 70.9 | 70.3 | 12.8 |
| *Ulva* spp. | 65.2 | 75.0 | 59.0 | 71.9 | 71.2 | 12.9 |
| *Undaria pinnatifida* | 73.2 | 74.6 | 49.8 | 71.2 | 70.6 | 12.8 |
| Hydrolyzed macroalgae | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 43.2 | 42.7 | 14.1 | 39.9 | 40.3 | 8.0 |
| *Himanthalia elongata* | 73.0 | 73.3 | 43.2 | 69.9 | 69.3 | 12.6 |
| *Laminaria ochroleuca* | 73.5 | 74.0 | 64.8 | 70.6 | 70.0 | 12.7 |
| *Ulva* spp. | 86.9 | 91.5 | 100 | 87.8 | 86.6 | 15.3 |
| *Undaria pinnatifida* | 93.0 | 92.1 | 100 | 88.4 | 87.2 | 15.4 |
| Aqueous extract | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 99.6 | 98.8 | 100 | 94.9 | 93.6 | 16.4 |
| *Himanthalia elongata* | 99.7 | 99.4 | 100 | 95.5 | 94.1 | 16.5 |
| *Saccharina latissima* | 98.0 | 99.6 | 100 | 95.7 | 94.3 | 16.6 |
| *Undaria pinnatifida* | 99.7 | 99.7 | 100 | 95.8 | 94.4 | 16.6 |
| Hydrolyzed extract | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 93.5 | 97.9 | 100 | 94.0 | 92.7 | 16.3 |
| *Laminaria ochroleuca* | 99.5 | 98.7 | 100 | 94.8 | 93.5 | 16.4 |
| *Saccharina latissima* | 99.7 | 99.2 | 100 | 95.3 | 93.9 | 16.5 |
| *Ulva* spp. | 99.8 | 99.0 | 100 | 95.1 | 93.8 | 16.5 |
| *Mastocarpus stellatus* | 78.6 | 99.1 | 100 | 95.2 | 93.8 | 16.5 |
| Reference ingredients | | | | | | |
| Untreated cereal straw | 19.7 | 19.8 | 17.7 | 17.5 | 18.5 | 4.60 |
| Sugar beet pulp | 43.3 | 76.8 | 68.1 | 73.4 | 72.7 | 13.1 |

[1] **DMd**: apparent dry matter faecal digestibility (%). **GEd**: apparent gross energy faecal digestibility. **DE:** digestible energy. All values were estimated from equations of Villamide et al. [47].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

As expected, the different extracts obtained from the macroalgae were almost completely digested *in vitro* (78.6–99.8% ivIDMd; 97.9–99.7% ivFDMd; 100.0% ivFCPd) due to their soluble nature. However, the polysaccharides quantified in both the TDF and the RES fractions (possibly laminarin, alginate, fucoidans, ulvans) cannot be hydrolyzed by the endogenous enzymes and can only be fermented by the intestinal microbiota. The *in vivo* protein digestibility of these extracts might be higher than in the dehydrated macroalgae although it would not be expected to be high. Specific protein extraction in *Ulva* spp. has been shown to increase *in vitro* proteolysis [71], which was in agreement with the increased ivFCPd observed in our study for the hydrolyzed *Ulva* spp. and *U. pinnatifida* compared with the dehydrated macroalgae, but these results should be confirmed *in vivo.* None of the *in vitro* digestibility values measured in the extracts were correlated with any fibrous fractions analyzed ($p \geq 0.30$; $n = 9$). When considering all of the 19 macroalgae products together, the ivFDMd and ivFCPd values were negatively correlated with NDF ($r = -0.96$; $p < 0.001$; $n = 19$), and with the protein linked to NDF ($r = -0.82$; $p < 0.001$; $n = 19$) content, respectively.

The dehydrated macroalgae showed similar values of digestible energy (7.96–12.9 MJ/kg DM) than SBP (13.1 MJ/kg DM), with the exception of *F. vesiculosus*, but higher values than straw (4.60 MJ/kg DM) (Table 4). Hydrolyzation of the macroalgae slightly improved their energy content, except for *F. vesiculosus.* In both types of extracts, DE values were higher (16.5 MJ/kg DM, on average) than that of SBP, which is in good accordance with the high DM digestibility of the extracts, although the real value will depend on their fermentability.

### 3.3. In Vitro Gas and VFA Production

Values for the macroalgae products and reference materials are shown in Table 5, whereas those for the insoluble residue of the ivIDMd are shown in Table 6.

**Table 5.** Gas production after 12, 24, and 48 h of *in vitro* incubation of macroalgae products and reference ingredients using caecal rabbit digesta as inoculum ($n = 4$) [1].

| Sample | Gas Production (mL/g Dry Matter) | | |
|---|---|---|---|
| | **12 h** | **24 h** | **48 h** |
| Dehydrated macroalgae | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 6.40 $^{a}$ | 8.25 $^{a}$ | 8.25 $^{a}$ |
| *Himanthalia elongata* | 5.98 $^{a}$ | 10.3 $^{a}$ | 25.6 $^{a}$ |
| *Saccharina latissima* | 7.23 $^{a}$ | 55.8 $^{c}$ | 95.6 $^{c}$ |
| *Ulva* spp. | 12.7 $^{b}$ | 16.6 $^{a}$ | 20.7 $^{a}$ |
| *Undaria pinnatifida* | 3.70 $^{a}$ | 3.75 $^{a}$ | 19.4 $^{a}$ |
| Hydrolyzed macroalgae | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 2.58 $^{a}$ | 2.58 $^{a}$ | 6.43 $^{a}$ |
| *Himanthalia elongata* | 2.63 $^{a}$ | 2.63 $^{a}$ | 14.3 $^{a}$ |
| *Laminaria ochroleuca* | 12.9 $^{b}$ | 23.3 $^{a}$ | 30.3 $^{a}$ |
| *Ulva* spp. | 11.4 $^{a\,b}$ | 11.4 $^{a}$ | 17.9 $^{a}$ |
| *Undaria pinnatifida* | 3.18 $^{a}$ | 3.18 $^{a}$ | 11.0 $^{a}$ |
| Aqueous extract | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 6.78 $^{a}$ | 8.20 $^{a}$ | 20.7 $^{a}$ |
| *Himanthalia elongata* | 5.68 $^{a}$ | 22.2 $^{a}$ | 45.0 $^{b}$ |
| *Saccharina latissima* | 8.00 $^{ab}$ | 90.2 $^{c}$ | 145 $^{d}$ |
| *Undaria pinnatifida* | 6.15 $^{a}$ | 6.15 $^{a}$ | 22.8 $^{a}$ |
| Hydrolyzed extract | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 10.0 $^{ab}$ | 29.6 $^{a}$ | 49.6 $^{b}$ |
| *Laminaria ochroleuca* | 7.15 $^{a}$ | 73.5 $^{c}$ | 103 $^{d}$ |
| *Saccharina latissima* | 10.7 $^{ab}$ | 112 $^{d}$ | 167 $^{e}$ |
| *Ulva* spp. | 8.60 $^{a}$ | 30.0 $^{b}$ | 46.3 $^{b}$ |
| *Mastocarpus stellatus* | 5.70 $^{a}$ | 11.4 $^{a}$ | 23.9 $^{a}$ |
| Reference ingredients | | | |
| Untreated cereal straw | 5.08 $^{a}$ | 5.08 $^{a}$ | 8.35 $^{a}$ |
| Sugar beet pulp | 15.0 $^{b}$ | 67.7 $^{c}$ | 125 $^{d}$ |

[1] The effects of sample, measurement time (hours), and their interaction were all significant ($p < 0.001$). Pooled standard errors of means at 12, 24, and 48 h were 1.53, 5.35, and 5.46, respectively. For each measurement time, different superscripts lowercase letters (within each column) indicate whether each mean is different ($p < 0.05$) from the reference ingredients (untreated cereal straw and sugar beet pulp).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Table 6.** Gas production after 12, 24, and 48 h of *in vitro* incubation of the insoluble residues of the 2-step *in vitro* digestibility of macroalgae (dehydrated and enzymatically hydrolyzed) and of reference ingredients using caecal rabbit digesta as inoculum ($n = 4$) [1].

| Sample | Gas Production (mL/g Dry Matter) | | |
|---|---|---|---|
| | 12 h | 24 h | 48 h |
| Insoluble residue of dehydrated algae | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 5.05 [a] | 5.15 [a] | 6.20 [a] |
| *Himanthalia elongata* | 4.98 [a] | 5.43 [a] | 18.3 [a] |
| *Saccharina latissima* | 4.10 [a] | 5.60 [a] | 34.6 [b] |
| *Ulva* spp. | 1.68 [a] | 1.63 [a] | 12.2 [a] |
| *Undaria pinnatifida* | 3.85 [a] | 4.63 [a] | 10.3 [a] |
| Insoluble residue of hydrolyzed algae | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 3.00 [a] | 3.00 [a] | 3.83 [a] |
| *Himanthalia elongata* | 3.65 [a] | 3.65 [a] | 10.5 [a] |
| *Laminaria ochroleuca* | 3.23 [a] | 3.23 [a] | 4.33 [a] |
| *Ulva* spp. | 4.15 [a] | 4.95 [a] | 7.80 [a] |
| *Undaria pinnatifida* | 4.20 [a] | 4.20 [a] | 4.80 [a] |
| Insoluble residue of the reference ingredients | | | |
| Untreated cereal straw | 2.90 [a] | 2.90 [a] | 2.90 [a] |
| Sugar beet pulp | 3.70 [a] | 7.90 [a] | 38.6 [b] |
| Reference ingredients | | | |
| Untreated cereal straw | 5.08 [a] | 5.08 [a] | 8.35 [a] |
| Sugar beet pulp | 15.0 [b] | 67.7 [b] | 125 [c] |

[1] The effects of sample, the measurement time (h) and their interaction were all significant ($p < 0.001$). Pooled standard errors of means at 12, 24, and 48 h: 1.53, 5.35, and 5.46, respectively. For each measurement time, different superscripts lowercase letters (within each column) indicate whether each mean is different ($p < 0.05$) from the reference ingredients (untreated cereal straw and sugar beet pulp). The fermentability of the insoluble residue of the 2-step *in vitro* digestibility were assessed only for samples with an *in vitro* dry matter ileal digestibility lower than 93%.

The different kinetics of gas production observed in the samples precluded the data being fitted with a single mathematical model, and comparison between samples was thus impossible. Accordingly, only data for 12, 24, and 48 h of incubation are shown for comparison of the samples, as they were more closely correlated with the real *in vivo* fermentation and fibre digestibility in the rabbit (unpublished results). At 48 h, 14 out of 33 samples (macroalgae products + reference ingredients + insoluble residues of 2-step *in vitro* digestibility) have reached the whole potential gas production. When data were analyzed as repeated measures, *in vitro* gas production was influenced by the incubated sample, measurement time and their interaction ($p < 0.001$).

Surprisingly, the two samples that showed the closest ($p > 0.05$) gas production than SBP after 12 h were the dehydrated *Ulva* spp. and the hydrolyzed *L. ochroleuca* samples (Table 5), whereas for the hydrolyzed *Ulva* spp., both extracts of *S. latissima* and the hydrolyzed extract of *F. vesiculosus* showed intermediate values between SPB and straw. At 24 h, gas production in dehydrated *S. latissima*, the aqueous extract of *S. latissima* and the hydrolyzed extract of *L. ochroleuca* was similar to that in SBP, while gas production in the hydrolyzed extract of *S. latissima* was higher than in SBP ($p < 0.05$). Similar results were obtained at 48 h. The results indicated a high fermentability of the different *S. latissima* products, which is probably related to the high content in laminarin and alginate previously reported [72], especially when these polysaccharides are concentrated, as it may occur in the extracts. Laminarin is a non-sulphated water-soluble storage polysaccharide composed of 1,3-β-D-glucans with β1,6 ramifications, and alginate is composed of 1,4-β-D-manuronic acid and 1,4-β-L-guluronic acid and is water soluble at pH 6–9; however, both cannot be hydrolyzed by endogenous enzymes and can be only used by intestinal microbiota [73]. *S. latissima* was also previously found to yield a relatively high level of ruminal gas production *in vitro*, lower than SBP but higher than alfalfa meal [59]. By contrast, gas production was lower in the macroalgae containing relatively high levels of sulphated polysaccharides

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(ulvans and fucoidans), such as *F. vesiculosus* and *Ulva* spp., which had been also reported to be less fermentable in other studies [74,75].

The other macroalgae products yielded similar gas production to that produced by straw, suggesting a low fermentability, with the extracts of *H. elongata* (aqueous), *F. vesiculosus* (hydrolyzed), and *Ulva* spp. (hydrolyzed) yielding intermediate values between SBP and straw at 48 h.

The different fermentability of samples at 12 h suggests the need of adaptation for the microbiota, especially to the most purified extracts, in which the chemical composition is more homogeneous and different from that of substrates usually fermented by the rabbit intestinal microbiota. The caecal inocula were obtained from rabbits that were not fed macroalgae, and the adaptation required would have delayed the beginning of the fermentation process. The need for substrate adaptation by the rabbit intestinal microbiota has been already observed when using a very specific substrate (cellobiose) [50].

Most of the insoluble residues of ivIDMd yielded similar gas production to the cereal straw (Table 6), independently of the fermentation time, which is consistent with the higher fermentability of soluble compared with insoluble fibre in rabbits [76]. Only the insoluble residues of *S. latissima* and SBP produced more gas than the cereal straw not subjected to *in vitro* digestion but less than SBP.

Although a positive correlation between the gas production at 24 h and the RES fraction was observed for the dehydrated macroalgae (r = 0.96; $p = 0.011$; $n = 5$), no correlation was found with SF or the ivIDMd, ivFDMd, and ivFCPd values ($p \geq 0.54$). The gas production at 24 h of the 9 extracts (aqueous and hydrolyzed) was positively correlated with the sum of RES + SF (r =0.72; $p = 0.028$; $n = 9$), but was not correlated with SF or ivIDMd, ivFDMd, and ivFCPd ($p \geq 0.34$). When the relationships between the gas production at 24 h of the 19 macroalgae products and their chemical composition were analyzed, positive correlations were again observed with the RES fraction (r = 0.71; $p < 0.001$; $n = 19$) and with the sum (RES + SF), both linearly ($R^2 = 0.62$; $p < 0.001$; $n = 19$) and quadratically ($R^2 = 0.68$; $p = 0.095$. Figure 1).

Gas production at 24 h was also negatively correlated with CP (r = −0.69; $p = 0.001$; $n = 19$) and ADL content (r = −0.51; $p = 0.025$; $n = 19$), but less significant correlations were observed with ivIDMd, ivFDMd, and ivFCPd (r = 0.37–0.40; $p = 0.086$–$0.12$; $n = 19$), and no correlations were observed with SF fraction ($p = 0.85$). These results indicate the complexity of characterizing macroalgae products with the standard techniques used for terrestrial plant ingredients. In addition, solubility does not equate to fermentability in these samples, which could be due to the presence of either substances that inhibit enzyme action [66,77], or highly fermentable compounds not collected in the TDF fraction. The negative influence of ADL on *in vitro* gas production is similar to that observed by Bikker et al. [59] for macroalgae and to that observed in terrestrial plant ingredients [78], although the chemical meaning of ADL in macroalgae may not be the same than in terrestrial plants.

The *in vitro* VFA production was determined only in the most fermentable macroalgae products and the two reference materials (Table 7). As expected, gas and total VFA production at 24 h were positively correlated (r = 0.84; $p = 0.018$; $n = 9$). All products derived from *S. latissima* showed total VFA production similar to that for SBP. Both extracts of *S. latissima* had increased VFA production compared with the dehydrated macroalgae, probably due to the higher concentration of fermentable polysaccharides such as laminarin, as previously observed *in vitro* in ruminants [79,80]. The other analyzed macroalgae products had lower ($p < 0.05$) total VFA production than *S. latissima* products.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

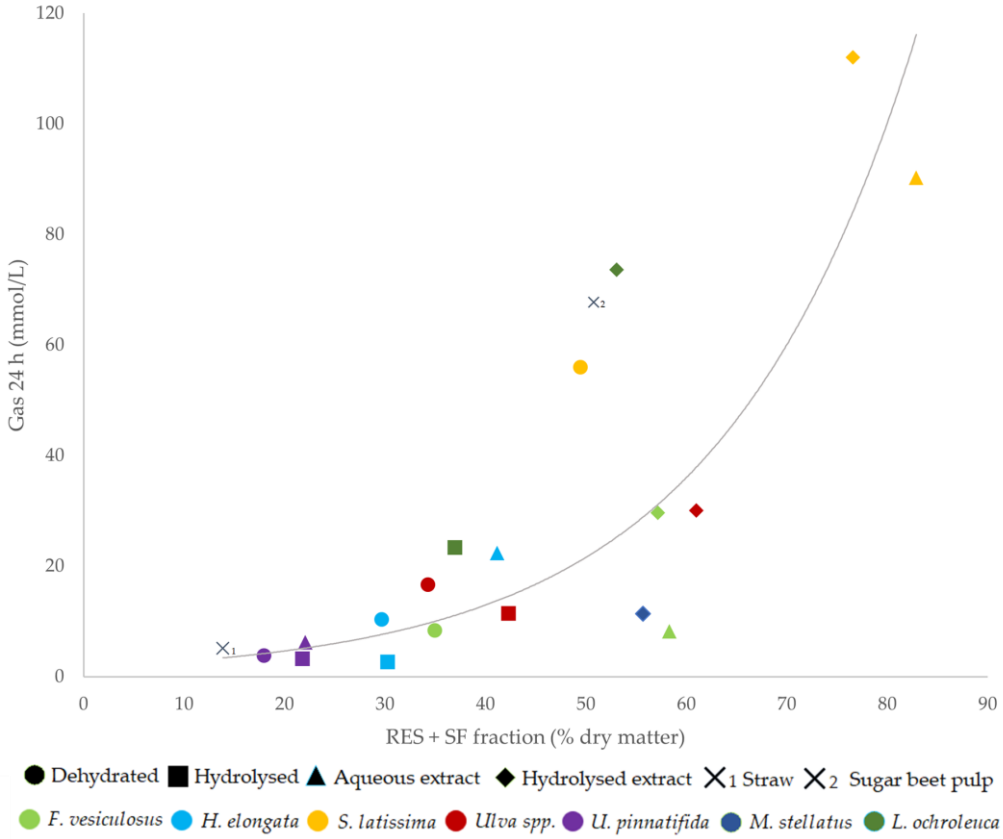



**Figure 1.** Relationship between the *in vitro* gas production at 24 h of incubation with caecal content from rabbits (mmol/L) and the sum of RES + SF fraction (% dry matter) in the 19 macroalgae products and two reference ingredients (sugar beet pulp and straw). $R^2 = 0.68$; linear effect: $p < 0.001$, quadratic effect: $p = 0.095$; residual standard deviation = 20.1; $n = 19$. RES = 100-ash-CP-TDF.

**Table 7.** *In vitro* total volatile fatty acid production (VFA; mmol/L) and molar proportions of individual VFA after incubating macroalgae products and reference ingredients with caecal inoculum from rabbits for 24 h ($n = 4$) [1].

| | Total VFA | Molar Proportion (mol/100 mol) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ac | Pr | But | Ibut | Val | Ival | Cap |
| Dehydrated macroalgae | | | | | | | | |
| *Saccharina latissima* | 37.9 $^{b}$ | 70.1 $^{b}$ | 25.0 | 4.67 $^{a}$ | 0.08 $^{a}$ | 0.12 | 0.03 | 0.00 |
| Aqueous extract | | | | | | | | |
| *Himanthalia elongata* | 14.8 $^{a}$ | 62.1 $^{a}$ | 7.40 | 27.1 $^{b}$ | 2.90 $^{a}$ | 0.47 | 0.00 | 0.00 |
| *Saccharina latissima* | 42.6 $^{b}$ | 67.8 $^{b}$ | 20.7 | 7.60 $^{a}$ | 1.22 $^{a}$ | 1.07 | 0.95 | 0.60 |
| Hydrolyzed extract | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | 21.1 $^{a}$ | 82.5 $^{b}$ | 10.2 | 4.07 $^{a}$ | 1.62 $^{a}$ | 0.57 | 1.07 | 0.00 |
| *Laminaria ochroleuca* | 18.0 $^{a}$ | 71.2 $^{b}$ | 13.8 | 14.0 $^{b}$ | 0.67 $^{a}$ | 0.35 | 0.00 | 0.00 |
| *Saccharina latissima* | 52.2 $^{b}$ | 74.7 $^{b}$ | 21.2 | 3.77 $^{a}$ | 0.15 $^{a}$ | 0.12 | 0.03 | 0.00 |
| *Ulva* spp. | 20.5 $^{a}$ | 66.2 $^{b}$ | 14.6 | 8.00 $^{a}$ | 10.7 $^{b}$ | 0.37 | 0.05 | 0.00 |
| Reference ingredients | | | | | | | | |
| Untreated cereal straw | 4.20 $^{a}$ | 84.0 $^{b}$ | 10.2 | 5.85 $^{a}$ | 0.00 $^{a}$ | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Sugar beet pulp | 47.4 $^{b}$ | 83.4 $^{b}$ | 14.1 | 2.20 $^{a}$ | 0.17 $^{a}$ | 0.08 | 0.00 | 0.00 |
| SEM (n = 4) | 4.73 | 6.51 | 5.57 | 2.94 | 0.75 | 0.33 | 0.37 | 0.20 |

[1] **Ac:** acetate. **Pr:** propionate. **But**: butyrate. **Ibut:** isobutyrate. **Val:** valerate. **Ival:** isovalerate. **Cap**: caproate. Within each variable different superscripts lowercase letters (within each column) indicate whether each mean is different ($p < 0.05$) from the reference ingredients.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*Saccharina latissima* products also produced high proportions of propionate (25.0, 20.7, and 21.2% for the dehydrated sample, aqueous extract, and hydrolyzed extract, respectively), but they did not differ with that produced by SBP (14.1%) or straw (10.2%). The fermentation of the aqueous extract of *H. elongata* and the hydrolyzed extract of *L. ochroleuca* resulted in higher ($p < 0.05$) proportions of butyrate than the reference ingredients, which may be associated with the fucoidan content [81]. A high proportion of butyrate is of interest due to its benefits on gut health, as it is known to be the main energy source for colonocytes [82]. In rabbits, the ileal concentration of butyrate has been associated with better growth traits when cellobiose was supplied in the diet [83]. The hydrolyzed extract of *Ulva* spp. produced a remarkable amount of isobutyrate (10.7%), much higher than SBP (0.17%) or any other macroalgae product.

Macroalgae polysaccharides, particularly laminarin and fucoidan, have been shown to have a prebiotic effect in several *in vitro* and *in vivo* studies (for a review, [32]), but their effects on VFA proportions is variable. In most studies, laminarin (derived from macroalgae such as *S. latissima* and *L. ochroleuca*) has been found to yield high levels of gas production and increased levels of acetate [84,85], propionate [84–86], and butyrate [86,87]. Fermentation of fucoidan, present in macroalgae such as *F. vesiculosus* and *H. elongata*, among others, also showed an increase in the proportions of acetate and butyrate [88], but a decrease in that of propionate [86,88]. It is important to consider that the *in vitro* VFA proportions are influenced by the incubated macroalgae, but probably also by the source of the inoculum used [49].

### 3.4. Minimal Inhibitory Concentrations

Most of the macroalgae products tested did not inhibit the bacterial growth at the maximal concentration tested (8.2 mg/mL. Table 8).

**Table 8.** Minimal inhibitory concentrations (MIC; mg/mL) of the macroalgae products tested against aerobic and anaerobic bacteria [1].

| | EC434 | EC727 | S. ty | S. ent | EC R1 | EC R2 | LM | Pse | C. per | C. dif |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dehydrated macroalgae | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Himanthalia elongata* | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | - | - |
| *Saccharina latissima* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Ulva* spp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Undaria pinnatifida* | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 2.05 | 8.2 | - | - |
| Hydrolyzed macroalgae | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Himanthalia elongata* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Laminaria ochroleuca* | - | - | 8.2 | 8.2 | - | 8.2 | 8.2 | 8.2 | - | - |
| *Ulva* spp. | - | - | - | - | - | - | 8.2 | - | - | - |
| *Undaria pinnatifida* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Aqueous extract | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Himanthalia elongata* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Saccharina latissima* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Undaria pinnatifida* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hydrolyzed extract | | | | | | | | | | |
| *Fucus vesiculosus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Laminaria ochroleuca* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Saccharina latissima* | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | - | - |
| *Ulva* spp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Mastocarpus stellatus* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

[1] **EC 434**: *Escherichia coli* CECT 434. **EC727:** *Escherichia coli* CECT 727. **S. ty:** *Salmonella typhimurium*. **S. ent:** *Salmonella enteritidis*. **EC R1:** *Escherichia coli* R1 (LREC). **EC R2:** *Escherichia coli* R2 (LREC). **LM:** *Listeria monocytogenes*. **Pse:** *Pseudomonas aeruginosa*. **C. per:** *Clostridium perfringens*. **C. dif:** *Clostridium difficile*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Two of the dehydrated macroalgae (*H. elongata* and *U. pinnatifida*) inhibited bacterial growth at the maximal concentration (8.2 mg/mL, except 2.05 mg/mL for *U. pinnatifida* against LM), but their products did not have the same effect. Previous findings indicate that these macroalgae could have some antimicrobial properties [89,90]. Although it is not known what causes the antimicrobial effect of some macroalgae, it has been mainly attributed to the phenolic compounds [90,91]. In the present study, the extracts were obtained with the objective of increasing digestibility and/or fermentability and concentrating the SF of the macroalgae, so any antimicrobial effect may have disappeared at least partly in these extracts because of the absence of these compounds.

Within the macroalgae products, hydrolyzed *L. ochroleuca* and the hydrolyzed extract of *S. latissima* also showed inhibitory responses when tested at the maximal concentrations. Unfortunately, a sample of dehydrated *L. ochroleuca* was not available for testing, and it is possible that it could also show an inhibitory effect. By contrast, dehydrated *S. latissima* did not show any inhibitory effect, suggesting that the positive effect observed in the hydrolyzed extract may be associated with other compounds concentrated in this macroalgae product [90]. Further studies with different solvents and extracts are required to enable solid conclusions to be reached regarding the potential inhibitory effects of these macroalgae. Nonetheless, the positive results appeared only at the maximal concentration, which would correspond in vivo to an inclusion of the macroalgae at a proportion of 2.5% in the diet. Moreover, it must be taking into account that *H. elongata*, *U. pinnatifida*, *L. ochroleuca*, and *S. latissima* are brown macroalgae with a high iodine content, which limits the amount that could be included in rabbit feed (Regulation EC 1334/2003).

## 4. Conclusions

Overall, the dehydrated macroalgae tested in this study were notable for their high content of minerals, and especially as an interesting source of dietary fibre, particularly of soluble fibre. The in vitro digestibility and caecal fermentation of dehydrated *S. latissima* were similar to those obtained for sugar beet pulp. All *S. latissima* products showed high fermentation potential and VFA production, especially both types of extracts. The *H. elongata* aqueous extract was remarkable due to its high in vitro butyrate production that can be of great interest for improving gut health. The MIC results did not indicate any clear inhibition of the pathogens tested by the macroalgae products. Based on our findings, the macroalgae tested appear to have a potentially prebiotic effect, rather than a direct antimicrobial activity. However, these results must be confirmed in vivo, in order to observe the real benefits of feeding macroalgae during the rabbit weaning period.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.G., M.L.-A., N.N. and A.M.; methodology, J.G., M.D.C., B.V.-B., H.D., M.D.T. and N.F.-F.; formal analysis, J.G.; investigation, S.A.-S., N.N., M.L.-A., M.M., B.V.-B., H.D., M.D.T. and J.G.; resources, E.C., A.M., M.L.-A. and J.G.; data curation, S.A.-S., N.N., B.V.-B., H.D. and N.F.-F.; writing—original draft preparation, S.A.-S., M.L.-A. and J.G.; writing—review and editing, S.A.-S., N.N., M.D.C., M.L.-A., M.M. and J.G.; supervision, M.L.-A. and J.G.; project administration, E.C., A.M., M.L.-A. and J.G.; funding acquisition, E.C., A.M., M.L.-A. and J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was carried out within the innovation project TIRAC, co-financed by 80% by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) of the European Union and by 20% by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, within the framework of the National Rural Development Program 2014–2020. The General Directorate for Rural Development, Innovation and Agrifood Training (DGDRIFA) is the authority in charge of applying this aid. Budget: EUR 492,580.38. Total grant: EUR 485,043.58. Funding number: 2020-PN216 (O00000226e2000044671).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Universidad Politécnica de Madrid, Spain (protocol code 2021-002, approved 24 February 2021).

**Data Availability Statement:** Data sharing not applicable.

**Acknowledgments:** We are grateful to César Núñez (student), Raquel del Pozo (technician) for their contribution in the laboratory, and Carlos Rodríguez (head of the laboratory).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References


1. Cullere, M.; Dalle Zotte, A. Rabbit Meat Production and Consumption: State of Knowledge and Future Perspectives. *Meat Sci.* **2018**, *143*, 137–146. [CrossRef] [PubMed]
2. Dalle Zotte, A. Perception of Rabbit Meat Quality and Major Factors Influencing the Rabbit Carcass and Meat Quality. *Livest. Prod. Sci.* **2002**, *75*, 11–32. [CrossRef]
3. Szendro, Z.; Dalle Zotte, A. Effect of Housing Conditions on Production and Behaviour of Growing Meat Rabbits: A Review. *Livest. Sci.* **2011**, *137*, 296–303. [CrossRef]
4. Cesari, V.; Zucali, M.; Bava, L.; Gislon, G.; Tamburini, A.; Toschi, I. Environmental Impact of Rabbit Meat: The Effect of Production Efficiency. *Meat Sci.* **2018**, *145*, 447–454. [CrossRef]
5. Petracci, M.; Soglia, F.; Leroy, F. Rabbit Meat in Need of a Hat-Trick: From Tradition to Innovation (and Back). *Meat Sci.* **2018**, *146*, 93–100. [CrossRef]
6. Al-Soufi, S.; García, J.; Muíños, A.; López-Alonso, M. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming. *Animals* **2022**, *12*, 2346. [CrossRef]
7. Attia, Y.A.; Hamed, R.S.; Abd El-Hamid, A.E.; Al-Harthi, M.A.; Shahba, H.A.; Bovera, F. Performance, Blood Profile, Carcass and Meat Traits and Tissue Morphology in Growing Rabbits Fed Mannanoligosaccharides and Zinc-Bacitracin Continuously or Intermittently. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2015**, *33*, 85–101.
8. Solans, L.; Arnal, J.L.; Sanz, C.; Benito, A.; Chacón, G.; Alzuguren, O.; Fernández, A.B. Rabbit Enteropathies on Commercial Farms in the Iberian Peninsula: Etiological Agents Identified in 2018–2019. *Animals* **2019**, *9*, 1142. [CrossRef]
9. Fortun-Lamothe, L.; Boullier, S. A Review on the Interactions between Gut Microflora and Digestive Mucosal Immunity. Possible Ways to Improve the Health of Rabbits. *Livest. Sci.* **2007**, *107*, 1–18. [CrossRef]
10. Carabaño, R.; Badiola, I.; Chamorro, S.; García, J. New Trends in Rabbit Feeding: Influence of Nutrition. *Span. J. Agric. Res.* **2008**, *6*, 15–25. [CrossRef]
11. Zemzmi, J.; Ródenas, L.; Blas, E.; Najar, T.; Pascual, J.J. Characterisation and in Vitro Evaluation of Fenugreek (Trigonella foenum-graecum) Seed Gum as a Potential Prebiotic in Growing Rabbit Nutrition. *Animals* **2020**, *10*, 1041. [CrossRef]
12. Badiola, I.; Perez De Rozas, A.; Gonzalez, J.; Aloy, N.; García, J.; Carabaño, R. Recent Advances in ERE in Growing Rabbits (Invited Paper). In Proceedings of the 11th World Rabbit Congress, Qingdao, China, 15–18 June 2016; pp. 491–502.
13. Gidenne, T.; García, J. Nutritional Strategies Improving the Digestive Health of the Weaned Rabbit. In *Recent Advances in Rabbit Sciences*; ILVO: Melle, Belgium, 2006; pp. 229–238.
14. Puón-Peláez, X.-H.; McEwan, N.; Olvera-Ramírez, A. Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE): A Review of Current Knowledge. *Eur. Sci. J. ESJ* **2018**, *14*, 137–149. [CrossRef]
15. Falcão-e-Cunha, L.; Castro-Solla, L.; Maertens, L.; Marounek, M.; Pinheiro, V.; Freire, J.; Mourão, J.L. Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Rabbit Feeding: A Review. *World Rabbit Sci.* **2007**, *15*, 127–140. [CrossRef]
16. Saettone, V.; Biasato, I.; Radice, E.; Schiavone, A.; Bergero, D.; Meineri, G. State-of-the-Art of the Nutritional Alternatives to the Use of Antibiotics in Humans and Monogastric Animals. *Animals* **2020**, *10*, 2199. [CrossRef]
17. López-Gálvez, G.; López-Alonso, M.; Pechova, A.; Mayo, B.; Dierick, N.; Gropp, J. Alternatives to Antibiotics and Trace Elements (Copper and Zinc) to Improve Gut Health and Zootechnical Parameters in Piglets: A Review. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2021**, *271*, 114727. [CrossRef]
18. Corino, C.; Di Giancamillo, A.; Modina, S.C.; Rossi, R. Prebiotic Effects of Seaweed Polysaccharides in Pigs. *Animals* **2021**, *11*, 1573. [CrossRef]
19. Maghin, F. Biological Functions and Health Promoting Effects of Brown Seaweeds in Swine Nutrition. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* **2014**, *1*, 2–5. [CrossRef]
20. Corino, C.; Modina, S.C.; Di Giancamillo, A.; Chiapparini, S.; Rossi, R. Seaweeds in Pig Nutrition. *Animals* **2019**, *9*, 1126. [CrossRef] [PubMed]
21. Makkar, H.P.S.; Tran, G.; Heuzé, V.; Giger-Reverdin, S.; Lessire, M.; Lebas, F.; Ankers, P. Seaweeds for Livestock Diets: A Review. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2016**, *212*, 1–17. [CrossRef]
22. Hamed, I.; Özogul, F.; Özogul, Y.; Regenstein, J.M. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, *14*, 446–465. [CrossRef]
23. Morais, T.; Inácio, A.; Coutinho, T.; Ministro, M.; Cotas, J.; Pereira, L.; Bahcevandziev, K. Seaweed Potential in the Animal Feed: A Review. *J. Mar. Sci. Eng.* **2020**, *8*, 559. [CrossRef]
24. Abu Hafsa, S.H.; Khalel, M.S.; El-Gindy, Y.M.; Hassan, A.A. Nutritional Potential of Marine and Freshwater Algae as Dietary Supplements for Growing Rabbits. *Ital. J. Anim. Sci.* **2021**, *20*, 784–793. [CrossRef]
25. Gómez-Ordóñez, E.; Jiménez-Escrig, A.; Rupérez, P. Dietary Fibre and Physicochemical Properties of Several Edible Seaweeds from the Northwestern Spanish Coast. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 2289–2294. [CrossRef]

26. Holdt, S.L.; Kraan, S. Bioactive Compounds in Seaweed: Functional Food Applications and Legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 543–597. [CrossRef]
27. Pereira, L. Biological and Therapeutic Properties of the Seaweed Polysaccharides. *Int. Biol. Rev.* **2018**, *2*, 1–50. [CrossRef]
28. Salehi, B.; Sharifi-rad, J.; Seca, A.M.L.; Pinto, D.C.G.A. Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications. *Molecules* **2019**, *24*, 4182. [CrossRef] [PubMed]
29. De Borba Gurpilhares, D.; Cinelli, L.P.; Simas, N.K.; Pessoa, A.; Sette, L.D. Marine Prebiotics: Polysaccharides and Oligosaccharides Obtained by Using Microbial Enzymes. *Food Chem.* **2019**, *280*, 175–186. [CrossRef]
30. Zheng, L.X.; Chen, X.Q.; Cheong, K.L. Current Trends in Marine Algae Polysaccharides: The Digestive Tract, Microbial Catabolism, and Prebiotic Potential. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *151*, 344–354. [CrossRef]
31. Jimenez-Escrig, A.; Sanchez-Muniz, F.J. Dietary Fibre from Edible Seaweeds: Chemical Structure, Physicochemical Properties and Effects on Cholesterol Metabolism. *Nutr. Res.* **2000**, *20*, 585–598. [CrossRef]
32. Evans, F.D.; Critchley, A.T. Seaweeds for Animal Production Use. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 891–899. [CrossRef]
33. Demarco, M.; Oliveira de Moraes, J.; Matos, Â.P.; Derner, R.B.; de Farias Neves, F.; Tribuzi, G. Digestibility, Bioaccessibility and Bioactivity of Compounds from Algae. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *121*, 114–128. [CrossRef]
34. Øverland, M.; Mydland, L.T.; Skrede, A. Marine Macroalgae as Sources of Protein and Bioactive Compounds in Feed for Monogastric Animals. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 13–24. [CrossRef]
35. Costa, M.; Cardoso, C.; Afonso, C.; Bandarra, N.M.; Prates, J.A.M. Current Knowledge and Future Perspectives of the Use of Seaweeds for Livestock Production and Meat Quality: A Systematic Review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2021**, *105*, 1075–1102. [CrossRef] [PubMed]
36. Jagtap, A.S.; Meena, S.N. Seaweed Farming: A Perspective of Sustainable Agriculture and Socio-Economic Development. In *Natural Resources Conservation and Advances for Sustainability*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2021; pp. 493–501.
37. Rey-Crespo, F.; López-Alonso, M.; Miranda, M. The Use of Seaweed from the Galician Coast as a Mineral Supplement in Organic Dairy Cattle. *Animal* **2014**, *8*, 580–586. [CrossRef]
38. Tasende, M.G.; Peteiro, C. Explotación de Las Macroalgas de Estudio Hacia Una Gestión Marinas: Galicia Como Caso Sostenible de Los Recursos. *Ambienta* **2015**, *111*, 116–132.
39. Peteiro, C.; Salinas, J.M.; Freire, Ó.; Fuertes, C. Cultivation of the Autoctonous Seaweed 'Laminaria Saccharina' off the Galician Coast (NW Spain): Production and Features of the Sporophytes for an Annual and Biennial Harvest. *Thalassas* **2006**, *22*, 45–53.
40. Fraga-Corral, M.; Ronza, P.; Garcia-Oliveira, P.; Pereira, A.G.; Losada, A.P.; Prieto, M.A.; Quiroga, M.I.; Simal-Gandara, J. Aquaculture as a Circular Bio-Economy Model with Galicia as a Study Case: How to Transform Waste into Revalorized by-Products. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *119*, 23–35. [CrossRef]
41. Freitas, J.R.C.; Salinas Morrondo, J.M.; Cremades Ugarte, J. Saccharina latissima (Laminariales, Ochrophyta) Farming in an Industrial IMTA System in Galicia (Spain). *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 377–385. [CrossRef]
42. Lopez-Santamarina, A.; Cardelle-Cobas, A.; del Carmen Mondragon, A.; Sinisterra-Loaiza, L.; Miranda, J.M.; Cepeda, A. Evaluation of the Potential Prebiotic Effect of Himanthalia elongata, an Atlantic Brown Seaweed, in an in Vitro Model of the Human Distal Colon. *Food Res. Int.* **2022**, *156*, 111156. [CrossRef] [PubMed]
43. El-banna, S.G.; Hassan, A.A.; Okab, A.B.; Koriem, A.A.; Ayoub, M.A. Effect of Feeding Diets Supplemented with Seaweed on Growth Performance and Some Blood Hematological and Biochemical Characteristics of Male Baladi Rabbits. In Proceedings of the 4th International Conference on Rabbit Production in Hot Climates, Sharm El-Sheikh, Egypt, 24 February 2005; Volume 382, pp. 373–382.
44. Ramos, M.A.; Carabaño, R.; Boisen, S.; Ramos, M.A. An in Vitro Method for Estimating Digestibility in Rabbits. In Proceedings of the 5th World Rabbit Congress, Corvallis, OR, USA, 25–30 July 1992; pp. 938–946.
45. Carabaño, R.; Nicodemus, N.; García, J.; Xiccato, G.; Trocino, A.; Pascual, J.J.; Falcao-e-Cunha, L.; Maertens, L. In Vitro Analysis, an Accurate Tool to Estimate Dry Matter Digestibiity in Rabbits. Intra- and Inter-Laboratory Variability. *World Rabbit Sci.* **2008**, *16*, 195–203.
46. Abad, R.; Ibáñez, M.A.; Carabaño, R.; García, J. Quantification of Soluble Fibre in Feedstuffs for Rabbits and Evaluation of the Interference between the Determinations of Soluble Fibre and Intestinal Mucin. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2013**, *182*, 61–70. [CrossRef]
47. Villamide, M.J.; Carabaño, R.; Maertens, L.; Pascual, J.; Gidenne, T.; Falcao-E-Cunha, L.; Xiccato, G. Prediction of the Nutritional Value of European Compound Feeds for Rabbits by Chemical Components and In Vitro Analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2009**, *150*, 283–294. [CrossRef]
48. Abad-Guamán, R.; Larrea-Dávalos, J.A.; Carabaño, R.; García, J.; Carro, M.D. Influence of Inoculum Type (Ileal, Caecal and Faecal) on the In Vitro Fermentation of Different Sources of Carbohydrates in Rabbits. *World Rabbit Sci.* **2018**, *26*, 227–240. [CrossRef]
49. Goering, H.K.; Van, P.J. *Forage Fiber Analyses*; U.S. Department of Agriculture: Washington, DC, USA, 1975; pp. 387–598.
50. Ocasio-Vega, C.; Abad-Guamán, R.; Delgado, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; García, J. In Vitro Caecal Fermentation of Carbohydrate-Rich Feedstuffs in Rabbits as Affected by Substrate Pre-Digestion and Donors' Diet. *World Rabbit Sci.* **2018**, *26*, 15–25. [CrossRef]
51. Carro, M.D.; Lebzien, P.; Rohr, K.; Ftir Trererniihnrng, I. Influence of Yeast Culture on the in Vitro Fermentation (Rusitec) of Diets Containing Variable Portions of Concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1992**, *37*, 209–220. [CrossRef]

52. *M07-A9*; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2012; Approved Standard—9° Ed. Volume 32, pp. 1–88.
53. *M11-A6*; Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2004; Approved Standard—6° Ed. Volume 24, pp. 1–48.
54. Möller, J.J.; Boonnayanont, K.; Danier, J.; Egert, M.; Fütö, K.; Horst, H.; Hüther, L.; Janjira, S.; Kongchuensin, R.; Korol, W.; et al. Gravimetric Determination of Acid Detergent Fiber and Lignin in Feed: Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* **2009**, *92*, 74–90. [CrossRef] [PubMed]
55. Mertens, D.R.; Allen, M.; Main, D.; Thiex, N.J. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study Guidance on Obtaining Defensible Test Portions View Project Databases View Project. *J. AOAC Int.* **2002**, *2*, 540.
56. Lourenço, S.O.; Barbarino, E.; De-Paula, J.C.; Otávio, L.; Pereira, S.; Lanfer Marquez, U.M. Amino Acid Composition, Protein Content and Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for 19 Tropical Seaweeds. *Phycol. Res.* **2002**, *50*, 233–241. [CrossRef]
57. Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammerman, C.B. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures 1,2. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 1216–1231. [CrossRef]
58. Garcia-Vaquero, M.; Rajauria, G.; Miranda, M.; Sweeney, T.; Lopez-Alonso, M.; O'doherty, J. Seasonal Variation of the Proximate Composition, Mineral Content, Fatty Acid Profiles and Other Phytochemical Constituents of Selected Brown Macroalgae. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 204. [CrossRef]
59. Bikker, P.; Stokvis, L.; van Krimpen, M.M.; van Wikselaar, P.G.; Cone, J.W. Evaluation of Seaweeds from Marine Waters in Northwestern Europe for Application in Animal Nutrition. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2020**, *263*, 114460. [CrossRef]
60. Taboada, C.; Millan, R.; Miguez, I. Evaluation of Marine Algae Undaria pinnatifida and Porphyra purpurea as a Food Supplement: Composition, Nutritional Value and Effect of Intake on Intestinal, Hepatic and Renal Enzyme Activities in Rats. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 1863–1868. [CrossRef]
61. Laramore, S.E.; Wills, P.S.; Hanisak, M.D. Seasonal Variation in the Nutritional Profile of Ulva lactuca Produced in a Land-Based IMTA System. *Aquac. Int.* **2022**, *30*, 3067–3079. [CrossRef]
62. Martone, P.T.; Estevez, J.M.; Lu, F.; Ruel, K.; Denny, M.W.; Somerville, C.; Ralph, J. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 169–175. [CrossRef]
63. Fernández-Segovia, I.; Lerma-García, M.J.; Fuentes, A.; Barat, J.M. Characterization of Spanish Powdered Seaweeds: Composition, Antioxidant Capacity and Technological Properties. *Food Res. Int.* **2018**, *111*, 212–219. [CrossRef] [PubMed]
64. Rouxel, C.; Crouan, K. Variations de La Composition Chimique de l'algue Brune Himanthalia elongata (L.) Gray Durant Le Printemps. *Acta Bot. Gall.* **1995**, *142*, 109–118. [CrossRef]
65. Gudiel Urbano, M.; Goñi, I. Bioavailability of Nutrients in Rats Fed on Edible Seaweeds, Nori (Porphyra tenera) and Wakame (Undaria pinnatifida), as a Source of Dietary Fibre. *Food Chem.* **2002**, *76*, 281–286. [CrossRef]
66. Neto, R.T.; Marçal, C.; Queirós, A.S.; Abreu, H.; Silva, A.M.S.; Cardoso, S.M. Screening of Ulva Rigida, Gracilaria sp., Fucus vesiculosus and Saccharina latissima as Functional Ingredients. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2987. [CrossRef] [PubMed]
67. Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. Dietary Fibre and Physicochemical Properties of Edible Spanish Seaweeds. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *212*, 349–354. [CrossRef]
68. Rupérez, P.; Ahrazem, O.; Leal, J.A. Potential Antioxidant Capacity of Sulfated Polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed Fucus vesiculosus. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 840–845. [CrossRef]
69. Lopez-Santamarina, A.; Miranda, J.M.; Del Carmen Mondragon, A.; Lamas, A.; Cardelle-Cobas, A.; Franco, C.M.; Cepeda, A. Potential Use of Marine Seaweeds as Prebiotics: A Review. *Molecules* **2020**, *25*, 1004. [CrossRef]
70. Juul, L.; Stødkilde, L.; Ingerslev, A.K.; Bruhn, A.; Jensen, S.K.; Dalsgaard, T.K. Digestibility of Seaweed Protein from *Ulva* sp. and Saccharina latissima in Rats. *Algal Res.* **2022**, *63*, 102644. [CrossRef]
71. Kazir, M.; Abuhassira, Y.; Robin, A.; Nahor, O.; Luo, J.; Israel, A.; Golberg, A.; Livney, Y.D. Extraction of Proteins from Two Marine Macroalgae, *Ulva* Sp. and *Gracilaria* sp., for Food Application, and Evaluating Digestibility, Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of the Protein Concentrates. *Food Hydrocoll.* **2019**, *87*, 194–203. [CrossRef]
72. Schiener, P.; Black, K.D.; Stanley, M.S.; Green, D.H. The Seasonal Variation in the Chemical Composition of the Kelp Species Laminaria digitata, Laminaria hyperborea, Saccharina latissima and Alaria esculenta. *J. Appl. Phycol.* **2015**, *27*, 363–373. [CrossRef]
73. Sharma, S.; Horn, S.J. Enzymatic Saccharification of Brown Seaweed for Production of Fermentable Sugars. *Bioresour. Technol.* **2016**, *213*, 155–161. [CrossRef]
74. Rochet, V.; Bernalier, A. Utilization of Algal Polysaccharides by Human Colonic Bacteria, in Axenic Culture or in Association with Hydrogenotrophic Microorganisms. *Reprod. Nutr. Develpment* **1997**, *37*, 221–229. [CrossRef]
75. Williams, A.G.; Withers, S.; Sutherland, A.D. The Potential of Bacteria Isolated from Ruminal Contents of Seaweed-Eating North Ronaldsay Sheep to Hydrolyse Seaweed Components and Produce Methane by Anaerobic Digestion in Vitro. *Microb. Biotechnol.* **2012**, *6*, 45–52. [CrossRef]
76. Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Gómez-Conde, M.S.; García, J. Effect of Type of Fiber, Site of Fermentation, and Method of Analysis on Digestibility of Soluble and Insoluble Fiber in Rabbits. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 2860–2871. [CrossRef]
77. Kellogg, J.; Grace, M.H.; Lila, M.A. Phlorotannins from Alaskan Seaweed Inhibit Carbolytic Enzyme Activity. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5277–5294. [CrossRef] [PubMed]

78. Gidenne, T.; Fortun-Lamothe, L. Feeding Strategy for Young Rabbits around Weaning: A Review of Digestive Capacity and Nutritional Needs. *Anim. Sci.* **2002**, *75*, 169–184. [CrossRef]
79. de la Moneda, A.; Carro, M.D.; Weisbjerg, M.R.; Roleda, M.Y.; Lind, V.; Novoa-Garrido, M.; Molina-Alcaide, E. Variability and Potential of Seaweeds as Ingredients of Ruminant Diets: An In Vitro Study. *Animals* **2019**, *9*, 851. [CrossRef]
80. Pandey, D.; Hansen, H.H.; Dhakal, R.; Aryal, N.; Rai, S.P.; Sapkota, R.; Nielsen, M.O.; Novoa-Garrido, M.; Khanal, P. Interspecies and Seasonal Variations in Macroalgae from the Nordic Region: Chemical Composition and Impacts on Rumen Fermentation and Microbiome Assembly. *J. Clean. Prod.* **2022**, *363*, 132456. [CrossRef]
81. Sweeney, T.; Dillon, S.; Fanning, J.; Egan, J.; O'Shea, C.J.; Figat, S.; Gutierrez, J.J.M.; Mannion, C.; Leonard, F.; O'Doherty, J.V. Evaluation of Seaweed-Derived Polysaccharides on Indices of Gastrointestinal Fermentation and Selected Populations of Microbiota in Newly Weaned Pigs Challenged with Salmonella Typhimurium. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2011**, *165*, 85–94. [CrossRef]
82. Guilloteau, P.; Martin, L.; Eeckhaut, V.; Ducatelle, R.; Zabielski, R.; Van Immerseel, F. From the Gut to the Peripheral Tissues: The Multiple Effects of Butyrate. *Nutr. Res. Rev.* **2010**, *23*, 366–384. [CrossRef]
83. Ocasio-Vega, C.; Delgado, R.; Abad-Guamán, R.; Carabaño, R.; Carro, M.D.; Menoyo, D.; García, J. The Effect of Cellobiose on the Health Status of Growing Rabbits Depends on the Dietary Level of Soluble Fiber. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 1806–1817. [CrossRef] [PubMed]
84. Jiménez-Escrig, A.; Gómez-Ordóñez, E.; Tenorio, M.D.; Rupérez, P. Antioxidant and Prebiotic Effects of Dietary Fiber Co-Travelers from Sugar Kombu in Healthy Rats. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 503–512. [CrossRef]
85. Seong, H.; Bae, J.H.; Seo, J.S.; Kim, S.A.; Kim, T.J.; Han, N.S. Comparative Analysis of Prebiotic Effects of Seaweed Polysaccharides Laminaran, Porphyran, and Ulvan Using In Vitro Human Fecal Fermentation. *J. Funct. Foods* **2019**, *57*, 408–416. [CrossRef]
86. Lynch, M.B.; Sweeney, T.; Callan, J.J.; O'Sullivan, J.T.; O'Doherty, J.V. The Effect of Dietary Laminaria Derived Laminarin and Fucoidan on Intestinal Microflora and Volatile Fatty Acid Concentration in Pigs. *Livest. Sci.* **2010**, *133*, 157–160. [CrossRef]
87. Devillé, C.; Gharbi, M.; Dandrifosse, G.; Peulen, O. Study on the Effects of Laminarin, a Polysaccharide from Seaweed, on Gut Characteristics. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1717–1725. [CrossRef]
88. Leonard, S.G.; Sweeney, T.; Bahar, B.; Lynch, B.P.; O'Doherty, J.V. Effects of Dietary Seaweed Extract Supplementation in Sows and Post-Weaned Pigs on Performance, Intestinal Morphology, Intestinal Microflora and Immune Status. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 688–699. [CrossRef]
89. Ibtissam, C.; Hassane, R.; José, M.L.; Francisco, D.S.J.; Antonio, G.V.J.; Hassan, B.; Mohamed, K. Screening of Antibacterial Activity in Marine Green and Brown Macroalgae from the Coast of Morocco. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 1258–1262.
90. Silva, A.; Rodrigues, C.; Garcia-Oliveira, P.; Lourenço-Lopes, C.; Silva, S.A.; Garcia-Perez, P.; Carvalho, A.P.; Domingues, V.F.; Barroso, M.F.; Delerue-Matos, C.; et al. Screening of Bioactive Properties in Brown Algae from the Northwest Iberian Peninsula. *Foods* **2021**, *10*, 1915. [CrossRef] [PubMed]
91. Muñoz, R.A.; Santome, S.; León, J.Q. Antibacterial Activity of Hexane and Ethanolic Extracts of Marine Macroalgae of the Bay of Ancón, Lima—Peru. *Rev. Investig. Vet. Peru* **2020**, *31*, e17829. [CrossRef]


**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## Publicación 3.

Al-Soufi, S.; Vivero-Saavedra, C.; Pernas, A. M.; Miranda, M.; López-Alonso, M. Consumer perception of supplementing rabbit diets with seaweed to reduce antibiotic use in rabbit production in Spain. *World Rabbit Science. Aceptado para publicación.*

USC
SANTIAGO
DE COMPOSTELA

# Consumer perception of supplementing rabbit diets with seaweed to reduce antibiotic use in rabbit production in Spain

Sabela Al-Soufi [1], Carlota Vivero-Saavedra [2], Ana María Pernas [2], Marta Miranda [3*], Marta López-Alonso [1]

[1] Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; sabelaalsoufi.novo@usc.es ; marta.lopez.alonso@usc.es

[2] Atoupa S. Coop. Galega Xuvenil, 27800 Vilalba, Lugo, Spain; atoupacoop@gmail.com; carlota.vivero@udc.es; a.m.pernas.vazquez@udc.es

[3] Departamento de Anatomía, Producción Animal e Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; marta.miranda@usc.es

ORCID numbers: Carlota Vivero-Saavedra 0009-0002-0465-2236
Ana María Pernas 0000-0001-6239-4584
Marta Miranda 0000-0002-9869-3874
Marta López-Alonso 0000-0001-6426-4273

***Corresponding author:** Marta Miranda
Phone: +34 982822615
Email: marta.miranda@usc.es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Authors contribution:**

Sabela Al-Soufi: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing-original draft, Writing-review and editing.

Carlota Vivero-Saavedra: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Investigation, Writing-review and editing.

Ana María Pernas: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Investigation, Writing-review and editing.

Marta Miranda: Investigation, Methodology, Writing-review and editing.

Marta López-Alonso: Conceptualization, Funding, Investigation, Methodology, Resources, Supervision, Writing-review and editing.

**Running head:** Consumer perception of seaweed-fed rabbit meat

**Cite as:** Al-Soufi S., Vivero-Saavedra C., Pernas A.M., Miranda M., López-Alonso M. 2024. Consumer perception of supplementing rabbit diets with seaweed to reduce antibiotic use in rabbit production in Spain. *World Rabbit Sci., no: ip-fp.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Abstract:** Rabbit meat consumption has gradually decreased in Spain and rabbit production systems face some challenges related to high mortalities caused by gastrointestinal diseases, which are difficult to control owing to limitations on antibiotic use. The inclusion of seaweeds in the rabbit diet as prebiotics can potentially reduce the need to use antibiotics, as already observed in other types of livestock. The aim of this survey was to study the rabbit meat and seaweed consumption habits of the population of a municipality in Galicia (NW Spain) and the willingness of the population to choose seaweed-fed rabbit meat over other rabbit meat, to determine whether this new product would be accepted by consumers. Rabbit meat consumption, despite being minoritarian, is more frequent in the surveyed population compared to other regions in Spain, and great importance is attached to home-produced rabbit meat. Most respondents have a positive image of rabbit meat and highlighted its nutritional value. The acceptability of seaweed-fed rabbit meat was high, as two thirds of the respondents stated that they would choose this product over other types of rabbit meat. Most respondents agreed about the environmental benefits of this feeding strategy, highlighting the reduction in antibiotic use and the higher quality of the product as benefits. Nevertheless, this strategy should be properly communicated, to guarantee its success in attracting environmentally concerned consumers.

**Keywords:** Rabbit meat, seaweed, antibiotics, consumer perception, willingness to consume

## INTRODUCTION

Rabbit meat is a minor but very valuable and highly appreciated product in Mediterranean countries such as Spain, Italy and France, due to its characteristic taste and its nutritional properties (high quality protein, low cholesterol and sodium, and

USC DE COMPOSTELA

64 valuable content of B group vitamins) (Cullere and Dalle Zotte, 2018). Nonetheless,
65 rabbit production is facing a critical period caused by a large increase in mortality on
66 farms, mainly due to the limitation on the prophylactic use of antibiotics, which makes
67 control of some gastrointestinal diseases difficult (Solans *et al.*, 2019). Moreover,
68 rabbit meat consumption in Mediterranean countries has gradually decreased in
69 recent years (Cullere and Dalle Zotte, 2018). In Spain, total consumption has dropped
70 by 51.4% in the last 10 years (2012-2022), and the per capita consumption in Spain is
71 currently only 0.74 kg/year (MAPA, 2023). The main reasons for the decline in
72 consumption are the limited availability of processed products adapted to modern
73 types of consumption, the perception of rabbits as pets, the lack of tradition of
74 consumption and the intense taste of the meat, which some consumers do not like
75 (Buitrago-Vera *et al.*, 2016; Cullere and Dalle Zotte, 2018). The rabbit farming sector
76 therefore needs support and new marketing strategies to ensure its long-term future.
77 Dietary supplementation with marine macroalgae or seaweed has been well studied
78 in some livestock species (Costa *et al.*, 2021; Morais *et al.*, 2020), especially in
79 porcine, with very positive results on both gut health and meat quality. In rabbits,
80 literature is scarce, although some studies have observed some benefits on gut health,
81 both *in vitro* (Al-Soufi *et al.*, 2023, 2022) and *in vivo* (Abu Hafsa *et al.*, 2021), due to
82 the potential prebiotic activity of some of the polysaccharides that seaweeds contain.
83 Seaweed is a suitable ingredient for complete animal feed, as production is very
84 sustainable and does not require fresh water or arable land, and in addition, seaweed
85 acts as a carbon sink (Costa *et al.*, 2021). Seaweed production reaches very high
86 levels in some regions of Spain, e.g. Galicia (NW Spain) (Manuel García Tasende and
87 César Peteiro, 2015). Seaweed-producing companies sustainably harvest or cultivate
88 seaweed for human consumption in these regions, generating tonnes of discards that

USC

89 could potentially be revalorised if used for animal feed, in a circular-economy approach
90 (Al-Soufi *et al.*, 2022).
91 The inclusion of seaweed in rabbit feed has also proven to have some benefits on
92 rabbit meat quality (Rossi *et al.*, 2020) without any negative impact on the sensory
93 properties of the meat (unpublished results). Therefore, consumer acceptability
94 regarding the objective characteristics of this product should be positive, and this
95 feeding strategy could also be used as a marketing tool to attract consumers and
96 increase rabbit meat consumption. However, as far as we know, no previous studies
97 have addressed consumer perception and acceptability of seaweed-fed rabbit meat or
98 the willingness of consumers to choose this type of product (Siddiqui *et al.*, 2023).
99 Consumers are generally concerned about animal welfare and sustainable livestock
100 production systems and also demand functional food with adequate nutritional
101 properties (Siddiqui *et al.*, 2023), and they are therefore expected to accept these
102 types of products. Nevertheless, consumption of rabbit meat is more dependent on
103 some societal factors than consumption of other types of meat, which is in fact one of
104 the main causes for the decrease in consumption (Petracci *et al.*, 2018). This makes
105 it difficult to predict consumer response to different strategies.
106 Galicia is a suitable place to address this question, as the region is a top producer of
107 marine macroalgae and is also one of the main rabbit meat producing regions in Spain
108 (3$^{rd}$ position). Although the Atlantic diet is widely consumed in Galicia —with pork and
109 beef being the main types of meat consumed— rabbits have traditionally been raised
110 by smallholders as a complementary source of meat and manure (Botana and Novas,
111 2023). Although rabbit farming has gradually been industrialised and professionalised,
112 rearing rabbits for home consumption is still very important in Galicia (Botana and
113 Novas, 2023; MAPA, 2020). This sociohistorical feature, together with the food

114 traditions in the area, must be considered in order to understand consumption habits
115 and the willingness of individuals to consume new products (Fernández, 2008;
116 Petracci *et al.*, 2018).
117 This study was conducted within a broader research project (TIRAC) investigating the
118 use of seaweed products in rabbit feed within intensive production systems, in order
119 to improve rabbit gut health and reduce antibiotic use in rabbit production. The specific
120 objective of the present study was to determine the willingness of consumers to buy
121 seaweed-fed rabbit meat. In addition, rabbit meat and seaweed consumption habits
122 were studied in relation to consumer perception of this novel product. The main interest
123 was to determine whether the feeding strategy could be used as a marketing tool to
124 increase rabbit meat consumption.

125 ## MATERIAL AND METHODS

126 ### Interview design

127 This study adopted a quantitative method. Data were collected using a semi-structured
128 questionnaire specifically designed for the study (Table 1). The questionnaire was
129 divided into the following sections: 1) sociodemographic characteristics of
130 respondents; 2) general consumption habits; 3) rabbit meat consumption habits; 4)
131 seaweed consumption habits; and 5) willingness to buy seaweed-fed rabbit meat.

132 ### Research location and sample selection

133 The study was carried out in the municipality of Lugo (NW Spain), which is a medium-
134 sized town of 97,211 inhabitants. It is a territory organised around an urban area —
135 the city of Lugo— surrounded by small rural settlements, and it also borders other rural
136 municipalities. The questionnaire was administered to inhabitants over 18 years old,
137 selected by non-probabilistic quota sampling based on gender and age in order to

USC DE COMPOSTELA

138 achieve a distribution representative of the population (Table 2). The sample size was
139 calculated by applying an expected error of 5% and a confidence level of 95%,
140 assuming that p=q=0.5. This yielded a sample size of n= 383.

141 **Data collection**

142 In total, 383 people completed the questionnaire, which was administered using two
143 methods: a) computer-assisted web interviewing (CAWI) and b) face-to-face
144 interviews. Initially, the methodology was designed to administer the questionnaire
145 only online. However, the difficulty in obtaining responses from inhabitants over 65
146 years old (owing to the digital divide) led us to carry out face-to-face interviews. The
147 questionnaires were administered between March and June 2023.

148 **Statistical analysis**

149 Different analyses were performed. On the one hand, we employed univariate analysis
150 to describe the data using basic statistics and frequency distributions. On the other,
151 based on the frequencies of consumption of rabbit meat and seaweed of respondents,
152 we identified three different types of consumers, creating two new variables: “profile
153 of rabbit meat consumer” and “profile of seaweed consumer”. Both were elaborated
154 with the following categories: a) non-consumer (never consumed either); b) sporadic
155 consumer (consumed them “sporadically” or “several times a year”); and c) regular
156 consumer (consumed them “at least once a week”, “once every two weeks” or “at least
157 once a month”). To investigate the dependency relationships of these two new
158 variables with others, we performed cross-tabulation with Chi-squared test, used to
159 evaluate hypotheses about the relationship of two categorical variables (Hernández
160 Sampieri *et al.*, 2014). The level of statistical significance was set at $p<0.05$. This test
161 was also performed to investigate the dependency relationship between the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

willingness of respondents to consume seaweed-fed rabbit meat with other variables. Data were analysed using Jamovi (version 2.3.21.0).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Sociodemographic characteristics and general consumption habits

The sociodemographic characteristics of the respondents (Table 3) were homogeneous regarding gender and age due to the sampling quotas, and income level and educational level were representative of all sectors of the population.

Most of the respondents had similar consumption habits (Table 4), as they mainly shopped in supermarkets, specialist shops or local markets. Regarding the factors that most influenced the consumers, a wide range of answers were given, but most people appeared to be concerned about the product quality, its origin and its freshness, and although price was also an important factor, it was not considered as important as quality. The frequent consumption of local, seasonal, fresh and low processed products is considered a characteristic feature of the traditional Galician diet, i.e. the so-called Atlantic diet (Trabazo *et al.* (2019)).

The Atlantic diet is also characterised by moderate meat consumption —especially pork and beef— among other products (Trabazo *et al.*, 2019). Most people surveyed consumed meat two or three times a week, while a substantial proportion consumed meat every or almost every day. Low meat consumption was quite frequent, as almost one quarter of respondents consumed meat only once a week or less.

### Profile of rabbit meat consumers

Based on the frequency of rabbit meat consumption, the main types of consumers were sporadic consumers (41.3%), followed closely by regular consumers (38.6%).

USC DE COMPOSTELA

186 Non-consumers of rabbit meat accounted for 18.0% and vegetarians represented
187 2.1% of respondents.
188 Regarding the sociodemographic characteristics of rabbit meat consumers (Figure 1),
189 no significant differences were observed in relation to gender or income level.
190 However, rabbit meat consumption differed significantly depending on the age of the
191 respondents ($p<0.001$). In this respect, consumption of rabbit meat was significantly
192 higher in people older than 65 years, while both young (18-30) and middle-aged
193 respondents (31-64 years old) were predominantly sporadic consumers. Non-
194 consumers of rabbit meat were more frequent in the middle-aged group than in the
195 young group, although vegetarians were predominantly young people. Regular
196 consumers were more common in people between 31-64 years than in the younger
197 participants. As expected, people who consumed more meat in general also
198 consumed more rabbit meat ($p<0.001$).

199 Regarding the most frequent place of purchase of rabbit meat (Figure 1), both sporadic
200 and regular consumers had different preferences ($p<0.001$), which help to explain the
201 different types of consumption. Supermarkets were the most common place of
202 purchase in both groups. Nevertheless, one third of rabbit meat consumers did not
203 buy rabbit meat but raised rabbits themselves (or their relatives did). This type of
204 purchase was almost equal in all age groups, and it was not directly linked to elderly
205 people as might have been expected.
206 The frequency of rabbit meat consumption determined in the present study differed
207 from that reported for the whole of Spain, as non-consumers and regular consumers
208 were less frequent, while a higher proportion of the population consumed the meat
209 sporadically. Escriba-Perez *et al.* (2017) studied the consumption of different types of
210 meat in Spain (whole territory) among the meat consuming population (age 25-75

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

211 years) and observed that 34.6% of these people did not consume rabbit meat, whereas
212 regular consumers accounted for about 50% of the population. Another study
213 conducted in Spain (Buitrago-Vera *et al.*, 2016) reported similar proportions of rabbit
214 meat consumption (38% of non-consumers, 49% regular consumers). Nevertheless,
215 both studies included the whole territory of Spain, which is very diverse and therefore
216 some differences in findings are expected. Lugo is a small municipality (approx.
217 100,000 inhabitants), like many others in Galicia and Spain (58% of the cities in Spain
218 have less than 100,000 inhabitants, Montero-Vicente *et al.* (2018)), which are still
219 closely linked to rural areas and therefore to livestock production systems. This fact
220 might affect the consumption habits and could explain the lower number of non-
221 consumers of rabbit meat.
222 In other Mediterranean countries like Italy, where rabbit meat is part of the gastronomic
223 tradition, consumption was similar to that in the whole of Spain, as around 30% of the
224 population does not consume this meat, whereas 38% are regular consumers
225 (Crovato *et al.*, 2022). Similar consumption rates to those obtained in the present study
226 were reported in France (Gomant and Beddiar, 2018), as only 20% of the population
227 did not consume rabbit meat. In other countries such as Romania (Petrescu and
228 Petrescu-Mag, 2018) and Hungary (Bodnar and Horvath, 2008), consumption was low
229 and mostly sporadic. In Spain and in most mentioned countries, consumption of rabbit
230 meat was higher in middle-aged or elderly people than in younger people (Escriba-
231 Perez *et al.*, 2017; Szendro *et al.*, 2020).
232 The place of purchase of rabbit meat varies widely between countries and regions:
233 supermarkets are preferred in countries like Italy (Crovato *et al.*, 2022) or Romania
234 (Petrescu and Petrescu-Mag, 2018), whereas in Hungary most consumers buy the
235 meat directly from the farmer or produce the meat themselves (Bodnar and Horvath,

USC

236 2008). In Spain, most rabbit meat consumers buy rabbit meat in local butcher shops
237 (46.6%) or in supermarkets (33.3%), while people who rear rabbits or buy the meat
238 directly from farms account for only 4.8% (Buitrago-Vera *et al.*, 2016), although in
239 some butcher shops the meat comes directly from producers or from the butchers
240 themselves. In our study, the number of rabbit meat consumers whose families still
241 breed rabbits themselves was remarkable, and therefore the availability of the meat is
242 very important in relation to maintaining consumption. Family farming (smallholding)
243 is very important in Galicia —the region of Spain with the largest area of family farming
244 spaces (MAPA, 2022)— and generates an alternative economy and home
245 consumption that may not be contemplated in the official indicators of this meat and
246 probably others. This type of supply of some products like rabbit meat is likely to occur
247 in other similar small municipalities in Galicia and in Spain, whose close contact with
248 rural areas may encourage consumption of this type of meat.
249 The findings show the importance of informal food distribution networks produced by
250 older relatives who live in the countryside and who provide food to their descendants
251 living in the city (Botana and Novas, 2023), in relation to rabbit meat and also to
252 vegetables. A high proportion of the population rely on the supply of rabbit meat from
253 their family and habitually consume rabbit meat. There therefore appears to be an
254 opportunity to attract these niche consumers to buy a high quality product that would
255 enable them to maintain their rabbit meat consumption if they cease to have this family
256 supply in the future.

257 **Positive and negative characteristics of rabbit meat**

258 When respondents were asked which positive and negative characteristics of rabbit
259 meat they would highlight (Figure 2), most of them appeared to have a very positive
260 image of this product. They especially highlighted its nutritional value (healthy fatty

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

261 acids, good quality protein, antioxidants, low cholesterol content, etc.) and half of them
262 did not highlight any negative property of rabbit meat.
263 The perception of rabbit meat differed significantly between types of consumers
264 (Figure 2). Most habitual and sporadic consumers appreciated the nutritional value
265 and taste of rabbit meat, while most non-consumers did not report any positive
266 property of meat. The same applied to the negative properties of rabbit meat, as most
267 habitual consumers did not highlight any, while some sporadic consumers though of
268 rabbits as pets, did not know how to prepare the meat or disliked its texture. Many
269 non-consumers viewed rabbits as pets, although others did not highlight any negative
270 properties or they disliked the intense taste of the meat.

271 These results are consistent with those of previous surveys conducted in Spain and
272 other European countries, where rabbit meat is considered a healthy, “low fat” tasty
273 meat (Buitrago-Vera *et al.*, 2016; Montero-Vicente *et al.*, 2018; Petrescu and Petrescu-
274 Mag, 2018), although a lack of information about the nutritional properties of rabbit
275 meat was also observed in previous studies (Siddiqui *et al.*, 2023; Szendro *et al.*,
276 2020). Promoting the nutritional value of the meat has been proposed by numerous
277 authors in order to enhance consumption (Cullere and Dalle Zotte, 2018; Petracci *et*
278 *al.*, 2018; Petraci and Cavani, 2013; Siddiqui *et al.*, 2023), not only among health-
279 conscious consumers and consumers who need to maintain a low-sodium or low
280 cholesterol diet, but among meat consumers in general.
281 Although half of the respondents did not report any negative attributes of rabbit meat,
282 the other half reported several disadvantages of this meat. A high proportion of people
283 think of rabbits as companion animals and do not consider them as meat production
284 animals, as previously observed in Spain (Buitrago-Vera *et al.*, 2016; Camps, 1996;
285 González-Redondo and Rodríguez-Serrano, 2012) and in other countries (Crovato *et*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

286 *al.*, 2022; Gomant and Beddiar, 2018; Petracci *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2023;
287 Szendro *et al.*, 2020). It is unlikely that this group of people will ever consume rabbit
288 meat, since it is no longer part of their usual diet. The taste is another barrier to the
289 consumption of rabbit meat, as some people consider the intense taste a negative
290 rather than a positive characteristic (Cullere and Dalle Zotte, 2018). These opposing
291 views were previously observed in Spain (Buitrago-Vera *et al.*, 2016; Montero-Vicente
292 *et al.*, 2018) and some thought may be required to develop preparations in which the
293 flavour is hidden or less predominant, so that more people would eat rabbit meat.
294 Other obstacles to rabbit meat consumption are the lack of know-how or the lack of
295 time required to cook the meat and also the predominant presentation or appearance
296 of this meat and the format in which it is sold. These issues were also observed in
297 previous studies (Crovato *et al.*, 2022; González-Redondo and Rodríguez-Serrano,
298 2012; Szendro *et al.*, 2020), as rabbit meat is commonly sold as a whole carcass,
299 usually with the head (Cullere and Dalle Zotte, 2018). This type of presentation is
300 related to the traditional preparation of rabbit meat and associated with social or family
301 meals and long cooking times (Cullere and Dalle Zotte, 2018); it is contrary to the
302 modern types of cooking, which look for quick and easy to cook preparations, adapted
303 to everyday life (Szendro *et al.*, 2020). The fact that the carcass is usually sold with
304 the head is also a negative factor for many consumers (Petracci *et al.*, 2018). Some
305 actions that can be taken in order to address these problems have already begun to
306 be developed in Spain (Camps, 1996; González-Redondo and Rodríguez-Serrano,
307 2012) and other countries (Petracci *et al.*, 2018) in order to provide a wider variety of
308 rabbit meat products that are better adapted to the current forms of consumption:
309 smaller portions of the carcass that do not need long cooking times and other
310 innovative products (Petracci *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2023).

USC

311 In summary, the inhabitants of this municipality appear to have quite a positive image
312 of rabbit meat, which may be related to the fact that a high portion of the population
313 has close links with rural areas where rabbits are raised, or the rabbits are raised by
314 their family or relatives (Botana and Novas, 2023). These findings appear to be
315 consistent with the conclusions of Montero-Vicente *et al.* (2018), who observed that
316 people living in cities in Spain with up to 100,000 inhabitants had a much more positive
317 image of rabbit meat than people living in larger cities. These results may indicate that
318 smaller cities and municipalities with close links to rural areas could be considered
319 target regions for promotion of rabbit meat consumption.

320

321 **Seaweed consumption**

322 Respondents were classified into three groups in relation to seaweed consumption
323 (Figure 3). Most respondents declared that they never consumed seaweed, while one
324 third consumed it sporadically and very few people consumed it regularly. Differences
325 in seaweed consumption were not related to the gender of the respondents, but some
326 significant differences were observed regarding the age of the respondents ($p<0.001$).
327 Both the young and the middle-aged groups had similar patterns of seaweed
328 consumption, while most of the respondents aged more than 65 years were non-
329 consumers.

330 When respondents were invited to select the positive and negative aspects that they
331 would highlight about seaweed (Figure 4), some barriers to their consumption were
332 observed. Regarding the positive aspects, many respondents did not know of any,
333 which indicates the lack of information about these novel products among consumers.
334 Meanwhile, almost half of the respondents highlighted the nutritional value of
335 seaweed, including the high content of healthy fatty acids, minerals, dietary fibre and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

antioxidants, as well as its prebiotic effects, which indicates that those people who do consume seaweed are probably aware of the associated health benefits (Figure 3). Only a few respondents highlighted the taste, which may indicate that some people would consume seaweed because of the health benefits rather than because they particularly like the taste. Previous studies pointed that the healthy and nutritious characteristics were the most important reasons for consuming seaweed (Birch *et al*., 2019), and therefore that promotion of these attributes was the key to attracting new consumers (Losada-Lopez *et al*., 2021).

The most remarkable negative aspect of seaweed was that the respondents did not know how to cook seaweed, indicating a lack of information among consumers who may be willing to consume this product but do not have enough information to do so; this also indicates that there are many potential consumers of seaweed. Among this group of people, it is likely that many of them only consume seaweed outside of their homes, in restaurants or other establishments (or ordered it at home).

Most respondents who had never consumed seaweed, across all age groups, were willing to try the product (68%). Therefore, the general perception of seaweed seemed to be positive, and the high level of willingness to try the product may be important in relation to the willingness of consumers to try other related products, such as seaweed-fed rabbit meat.

**Willingness to consume seaweed-fed rabbit meat**

Most of the respondents (66%) stated that they would be willing to buy seaweed-fed rabbit meat in preference to other similar rabbit meat products (Figure 5). This tendency was not influenced by age or gender ($p>0.05$), but some significant differences were observed regarding the type of consumer ($p<0.001$). Most

USC DE COMPOSTELA

360 respondents who would buy the product were sporadic rabbit meat consumers.
361 Remarkably, almost half of non-consumers would choose this product, which is
362 important since that could increase rabbit meat consumption. The place of purchase
363 of rabbit meat did not seem to influence the decision of the respondents ($p>0.05$) (only
364 considering rabbit meat consumers), which may indicate that people who rear rabbits
365 would also buy this meat if they did not have this supply route.

366 When respondents were asked if they would increase their consumption of rabbit meat
367 if they knew that rabbits were fed a diet containing seaweed, the answers were not
368 clear (Figure 6). One third of habitual and sporadic consumers would eat more rabbit
369 meat, while among non-consumers, more than half would not do so, and around a
370 quarter of them would eat more seaweed-fed rabbit meat (Figure 6). These results
371 indicate that rabbit meat consumption would increase slightly if rabbits were fed this
372 diet and if the product were appropriately explained and marketed. In any case,
373 consumers would have to taste this product before declaring that they would repeat or
374 even increase their rabbit meat consumption.

375 In order to obtain more information about the willingness to choose this product over
376 other rabbit meat products, respondents who declared that they would not choose it
377 were asked for their reasons (Table 5). Many of them would not choose it since they
378 do not consume rabbit meat frequently or because they do not eat meat. Some people
379 considered that it was not an appropriate diet for rabbits, as they should be fed in a
380 “natural” way, and others distrusted the beneficial effects of this feeding strategy or of
381 industrial feed in general.

382 Respondents were also asked why they would not eat more seaweed-fed rabbit meat
383 (Table 6). For one third of the respondents, the reason was just that they did not like

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

384 rabbit meat or they do not consume it. Other people would not be influenced by this
385 strategy or consider that they already eat enough rabbit meat. Other people preferred
386 the “home-raised rabbit” or rabbit fed in a “traditional way”, with a diet based on
387 vegetables; and they dislike the meat sold in supermarkets (usually intensively
388 reared).
389 Regarding feeding strategies, many respondents differentiated between two types of
390 rabbit rearing and had a clear opinion about them. On the one hand, they related the
391 rabbit meat sold in supermarkets to intensive breeding practices whereby rabbits
392 received a diet based on industrial feed and with excessive use of antibiotics; they
393 considered this low-quality meat with a poor taste. On the other, rabbit meat bought
394 directly from farmers or raised at home or by their relatives was associated with
395 “natural and traditional” breeding, where no industrial feeds or antibiotics were used
396 and rabbits were fed only with vegetables of local origin. This second type of
397 production would produce rabbit meat of very high quality and good organoleptic
398 properties, and was therefore favoured by many people. This dichotomy has been
399 observed in previous studies (Crovato *et al.*, 2022; Petracci *et al.*, 2018; Siddiqui *et*
400 *al.*, 2023), although there was also some contradiction, as consumers also believed
401 that rabbit meat sold in supermarkets was safer than home-produced rabbit meat
402 (Crovato *et al.*, 2022). This study, which was conducted in Italy, concluded that
403 consumers were willing to pay more for rabbit meat that was produced without routine
404 use of antibiotics (Crovato *et al.*, 2022), as in the present study. Other authors have
405 also stated that these types of characteristics of rabbit meat are not visible to
406 consumers, and it is therefore essential to include information regarding breeding and
407 feeding strategies on the product label, which could influence the choice (Crovato *et*
408 *al.*, 2022; Siddiqui *et al.*, 2023). Nonetheless, most people will probably have to first

taste this meat and personally check the benefits (or at least not disadvantages) regarding its quality, in order to favour it over other rabbit meat products.

Our results indicate that consumers are concerned about the feeding strategies and use of antibiotics in rabbit production. Previous studies have already found that these factors have a strong influence on consumers' purchasing choice regarding rabbit meat, both breeding without routine use of antibiotics (Crovato *et al.*, 2022; Gomant and Beddiar, 2018) and feeding systems (Gomant and Beddiar, 2018; Petrescu and Petrescu-Mag, 2018; Siddiqui *et al.*, 2023; Szendro *et al.*, 2020). These studies also noted other factors that influence this choice, such as the local origin of the meat and cruelty-free rearing (Crovato *et al.*, 2022; Kallas and Gil, 2012; Petracci *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2023; Szendro *et al.*, 2020).

Altogether these results indicate that the acceptance of these new type of products will be highly dependent on the sociocultural aspects of the population, which affect the decisions regarding food (Fernández, 2008). Therefore, for promotion of food, in this case of rabbit meat, to be successful, it should take all these of these factors into account and adapt to the target population.

**Benefits of including seaweed in rabbit feed**

In this survey, respondents were first asked —through an open question— what benefits they thought feeding rabbits with seaweed would have (Table 7). Although almost half of the respondents did not answer or did not know of any benefits, many people were aware of the benefits on the reduction of antibiotic use and pointed out that this strategy could be healthier for both rabbits and humans. Some people stated that the meat would be more nutritious and of higher quality. For some respondents, it would be an opportunity to revalorise seaweeds as a local ingredient, making rabbit meat production more sustainable.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

After this open question, respondents were again asked about how strongly they agreed with some statements related to the benefits that the inclusion of seaweed in rabbit diets would have (Figure 7). Only a small proportion of the respondents disagreed with the statements, while most people agreed or were hesitant to do so. Among the possible benefits of this strategy, respondents mostly agreed about the environmental benefits, while the other benefits such as improvements in meat quality or rabbit health were not clear to many people. These findings are not surprising, as the environmental benefits are easier to see and to relate to the feeding strategy, as consumers are already informed about the circular economy, the local production of ingredients or the reduction of antibiotics. This can be extrapolated to any animal production system in which seaweed could be included, as the potential benefit to health is applicable to other livestock species and even for people, who would benefit from incorporating these ingredients in their own diet. As seaweed is a relatively new dietary ingredient in our culture, it requires an effort to transmit this information to all of society.

When the level of agreement with the statements was related to the willingness to choose seaweed-fed rabbit meat rather than other rabbit meat (Figure 7), significant differences were observed in all cases, as expected. In general, those people who would choose this meat agreed more strongly with the statements, as they may be more sensitive to these issues and more convinced of the strategy. In contrast, those respondents who would not be influenced by this feeding strategy were more hesitant about its benefits.

## CONCLUSIONS

Rabbit meat consumption in the municipality of Lugo seems to be in a better situation than in other areas, possibly due to the maintenance of family smallholdings and the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

459 informal food distribution networks this creates. Nevertheless, this type of production
460 is disappearing and the consumption of some of the derived products —like rabbit
461 meat— is also at risk of disappearing, especially in the younger population. Our results
462 show that a high proportion of the surveyed population in Lugo would be willing to
463 consume seaweed-fed rabbit meat (65%); these findings may be extrapolated to other
464 similar animal products and other similar populations. One of the keys to ensuring the
465 success of this type of products in the market seems to be the correct communication
466 of the reasons for this feeding strategy. The circular-economy approach and the
467 environmental benefits of this strategy could be used as marketing points to attract
468 environmentally responsible consumers and to increase rabbit meat consumption.
469 Rabbit meat products will also have to be adapted to modern types of cooking and
470 information about how to cook the products provided, so that the meat can be included
471 in the daily diets of people of all ages. The nutritional benefits were also identified as
472 key points for increasing the consumption of rabbit meat, and the same applies to
473 seaweed. Promoting the combination of both foods as functional foods has great
474 potential but requires some effort to be made in developing marketing campaigns that
475 include relevant information.
476 Overall, the complete analysis of this area and the preferences of its inhabitants,
477 allows us to affirm that the use of seaweed in rabbit feed would be accepted by
478 consumers, and that it would be an interesting strategy to increase the consumption
479 of this meat among environmentally conscious people. However, this study is limited
480 by its geographical location and should therefore be replicated in other regions in order
481 to obtain more consistent results.
482

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

**Acknowledgements:** The authors would like to thank the support given by María Luz de Santos, Managing Director of the Spanish Interprofessional Organisation to Promote Rabbit Sector (INTERCUN).

**Conflicts of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Funding:** This research was carried out within the innovation project TIRAC, co-financed by 80% by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) of the European Union and by 20% by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, within the framework of the National Rural Development Programme 2014–2020. The General Directorate for Rural Development, Innovation and Agrifood Training (DGDRIFA) is the authority in charge of applying this aid. Budget: EUR 492,580.38. Total grant: EUR 485,043.58. Funding number: 2020-PN216 (O00000226e2000044671). Sabela Al-Soufi, Marta Miranda and Marta López-Alonso belong to “Grupo de Potencial Crecimiento” financed by GAIN (Axencia Galega de Innovación) (grant number ED431B 2023/008).

**Data availability statement**: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## REFERENCES

Abu Hafsa, S.H., Khalel, M.S., El-Gindy, Y.M., Hassan, A.A., 2021. Nutritional potential of marine and freshwater algae as dietary supplements for growing rabbits. Ital J Anim Sci 20, 784–793. https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1928557

Al-Soufi, S., García, J., Muíños, A., López-Alonso, M., 2022. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition—A Valuable Feed in Sustainable Farming. Animals 12. https://doi.org/10.3390/ani12182346

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

507 Al-Soufi, S., Nicodemus, N., Carro, M.D., López-Alonso, M., Miranda, M., Muíños, A.,
508 Cegarra, E., Vázquez-Belda, B., Domínguez, H., Torres, M.D., Flórez-Fernández,
509 N., García, J., 2023. Marine Macroalgae in Rabbit Nutrition: In Vitro Digestibility,
510 Caecal Fermentability, and Microbial Inhibitory Activity of Seven Macroalgae
511 Species from Galicia (NW Spain). Agriculture 13.
512 https://doi.org/10.3390/agriculture13101995
513 Bodnar, K., Horvath, J., 2008. Consumers´ opinion about rabbit meat consumption in
514 Hungary, in: 9th World Rabbit Congress. Verona, Italy, pp. 1519–1522.
515 Botana, C., Novas, M., 2023. Invisible ecoproducers. Galician family farming spaces
516 for local self-consumption. Astrágalo. Cultura de la Arquitectura y la Ciudad 259–
517 284. https://doi.org/10.12795/astragalo.2023.i33-34.14
518 Buitrago-Vera, J., Escribá-Pérez, C., Baviera-Puig, A., Montero-Vicente, L., 2016.
519 Consumer segmentation based on food-related lifestyles and analysis of rabbit
520 meat consumption. World Rabbit Science 24, 169–182.
521 https://doi.org/10.4995/wrs.2016.4229
522 Camps, J., 1996. Carne de conejo: Cualidades dietéticas y futuro. Boletín de
523 Cunicultura 44–50.
524 Costa, M., Cardoso, C., Afonso, C., Bandarra, N.M., Prates, J.A.M., 2021. Current
525 knowledge and future perspectives of the use of seaweeds for livestock
526 production and meat quality: a systematic review. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)
527 105, 1075–1102. https://doi.org/10.1111/jpn.13509
528 Crovato, S., Pinto, A., Martino, G. Di, Mascarello, G., Rizzoli, V., Marcolin, S.,
529 Ravarotto, L., 2022. Purchasing Habits, Sustainability Perceptions, and Welfare
530 Concerns of Italian Consumers Regarding Rabbit Meat. Foods 11.
531 https://doi.org/10.3390/foods11091205

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cullere, M., Dalle Zotte, A., 2018. Rabbit meat production and consumption: State of knowledge and future perspectives. Meat Sci 143, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.029

Escriba-Perez, C., Baviera-Puig, A., Buitrago-Vera, J., Montero-Vicente, L., 2017. Consumer profile analysis for different types of meat in Spain. Meat Sci 129, 120–126. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.015

Fernández, S., 2008. Culture, body and health: an analysis of the nutritional concepts in the Galician rural context. Zainak 30, 161–176.

Gomant, F., Beddiar, A., 2018. Etude sur l'image de la viande de lapin et de la filière cunicole en 2018. Cuniculture magazine 45, 27–30.

González-Redondo P, Rodríguez-Serrano, 2012. Promotion of rabbit meat consumption in Spain, in: 10th World Rabbit Congress. Sharm El-Sheikh, Egypt, pp. 955–959.

Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., Baptista Lucio, P., 2014. Metodología de la investigación. Mc Graw Hill, México D. D. .

Kallas, Z., Gil, J.M., 2012. A dual response choice experiments (DRCE) design to assess rabbit meat preference in Catalonia: A heteroscedastic extreme-value model. British Food Journal 114, 1394–1413. https://doi.org/10.1108/00070701211262984

Losada-Lopez, C., Dopico, D.C., Faína-Medín, J.A., 2021. Neophobia and seaweed consumption: Effects on consumer attitude and willingness to consume seaweed. Int J Gastron Food Sci 24. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100338

Manuel García Tasende y César Peteiro, 2015. Explotación de las macroalgas de estudio hacia una gestión marinas: Galicia como caso sostenible de los recursos. Ambienta 116–132.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

557 Montero-Vicente, L., Escribá-Pérez, C., Baviera-Puig, A., Buitrago-Vera, J., 2018.
558 Analysis of the commercial value of rabbit meat based on positioning of the
559 different types of fresh meat. Spanish Journal of Agricultural Research 16.
560 https://doi.org/10.5424/sjar/2018163-13407
561 Morais, T., Inácio, A., Coutinho, T., Ministro, M., Cotas, J., Pereira, L., Bahcevandziev,
562 K., 2020. Seaweed potential in the animal feed: A review. J Mar Sci Eng 8, 1–24.
563 https://doi.org/10.3390/JMSE8080559
564 Petracci, M., Soglia, F., Leroy, F., 2018. Rabbit meat in need of a hat-trick: from
565 tradition to innovation (and back). Meat Sci 146, 93–100.
566 https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.08.003
567 Petracci, M., Cavani, C., 2013. Rabbit meat processing: Historical perspective to future
568 directions. World Rabbit Science 21, 217–226.
569 https://doi.org/10.4995/wrs.2013.1329
570 Petrescu, D.C., Petrescu-Mag, R.M., 2018. Consumer behaviour related to rabbit meat
571 as functional food. World Rabbit Science 26, 321–333.
572 https://doi.org/10.4995/wrs.2018.10435
573 Rossi, R., Vizzarri, F., Ratti, S., Palazzo, M., Casamassima, D., Corino, C., 2020.
574 Effects of Long-Term Supplementation with Brown Seaweeds and Polyphenols in
575 Rabbit on Meat Quality Parameters. Animals 10, 14.
576 Siddiqui, S.A., Gerini, F., Ikram, A., Saeed, F., Feng, X., Chen, Y., 2023. Rabbit
577 Meat—Production, Consumption and Consumers' Attitudes and Behavior.
578 Sustainability (Switzerland). https://doi.org/10.3390/su15032008
579 Solans, L., Arnal, J.L., Sanz, C., Benito, A., Chacón, G., Alzuguren, O., Fernández,
580 A.B., 2019. Rabbit enteropathies on commercial farms in the Iberian Peninsula:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

581 Etiological agents identified in 2018–2019. Animals 9.
582 https://doi.org/10.3390/ani9121142
583 Szendro, K., Szabó-Szentgróti, E., Szigeti, O., 2020. Consumers' attitude to
584 consumption of rabbit meat in eight countries depending on the production
585 method and its purchase form. Foods 9. https://doi.org/10.3390/foods9050654
586 Trabazo, R.L., Pérez, C. de L., Castro Pérez, X., Solla, P., 2019. Atlantic diet. Nutrition
587 and gastronomy in Galicia. Nutr Hosp 36, 7–13.
588 https://doi.org/10.20960/nh.02686

589

590

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

591 **Table 1.** Questions included in the survey.

| Sections | Questions | Type of Question |
|---|---|---|
| Socio-demographic characteristics of respondents | -Do you live in Lugo? | -Close-Yes/No |
| | -What gender do you identify with? | -Close-Various options |
| | -What age range are you in? | -Close-Various options |
| | -Who do you live with? | -Close-Various options |
| | -Indicate your educational level | -Close-Various options |
| | -Indicate your annual income range | -Close-Various options |
| General consumption habits | -Choose the type of establishment where you usually shop (most frequent) | -Close-Various options |
| | -Choose the type of establishment where you usually shop (second most frequent) | -Close-Various options |
| | -What are the factors that most influence you when purchasing a product? | -Close-Various options (can choose 3) |
| | -How would you describe your diet? | -Close-Various options |
| | -How often do you consume meat? | -Close-Various options |
| Rabbit meat consumption habits | -How often do you consume rabbit meat? | -Close-Various options |
| | -Where do you usually buy rabbit meat? | -Close-Various options |
| | -What positive properties can you highlight about rabbit meat? | -Close-Various options (multiple choice) |
| | -What negative properties can you highlight about rabbit meat? | -Close-Various options (multiple choice) |
| Seaweed consumption habits | -How often do you consume seaweed? | -Close-Various options |
| | -If you have never tried seaweed, would you be willing to try it? | -Close-Yes/No |
| | -Where do you usually consume seaweed? | -Close-Various options |
| | -What positive properties do you highlight about seaweed? | -Close-Various options (multiple choice) |
| | -What negative properties do you highlight about seaweed? | -Close-Various options (multiple choice) |
| Willingness to buy rabbit meat | -Read the following statement: rabbits were fattened with feed containing | -Close-Yes/No/No influence |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

| | | |
|---|---|---|
| fed with seaweed | seaweed with the aim of reducing the need to use antibiotics in its production. Taking this factor into account, would you choose this meat over other rabbit meat products with similar characteristics but that were not fed this way? | |
| | -Why not? | -Open (just for “No” answer in the previous question) |
| | -Would knowing that these rabbits received this diet make you consume more rabbit meat? | -Close-Yes/No/Don´t know |
| | -Why not? | -Open (just for “No” answer in the previous question) |
| | -From your point of view, what benefits would there be to fattening rabbits with feed containing seaweed? | -Open |
| | -Indicate how closely you agree with the following statements: “The inclusion of seaweed in rabbit diets would…”:<br>I. “…improve the meat quality”.<br>II. “…provide environmental benefits”.<br>III. “…improve their health”. | -Close-Agree/Don´t know what to say/Disagree |

592

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

593 **Table 2:** Sampling by quota based on gender and age.

| | Gender | | Total |
|---|---|---|---|
| **Age (years)** | **Women** | **Men** | |
| **18-30** | 29 | 24 | 53 (13.7%) |
| **31-64** | 123 | 102 | 226 (58.9%) |
| **65 or more** | 57 | 48 | 105 (27.4%) |
| **Total** | 209 (54.6%) | 174 (45.4%) | 383 |

594

595

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

596 **Table 3:** Sociodemographic characteristics of respondents.

| **Gender** | **N** |
|---|---|
| Woman | 209 |
| Man | 174 |
| Gender-diverse | 0 |
| **Age (years)** | |
| 18-30 | 53 |
| 31-64 | 226 |
| >65 | 105 |
| **Monthly income (Euros)** | |
| Up to 999 | 24 |
| 1000 to 1499 | 73 |
| 1500 to 1999 | 60 |
| 2000 to 2500 | 80 |
| 2500 to 2999 | 39 |
| 3000 or more | 100 |
| NA | 7 |
| **With whom do you live** | |
| Family | 205 |
| Alone | 54 |
| Friends | 14 |
| Partner | 108 |
| Others | 2 |
| **Educational level** | |
| No studies | 8 |
| Primary Studies | 33 |
| Compulsory Secondary Education | 59 |
| Vocational training | 74 |
| University degree | 209 |

597

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

598

599 **Table 4**: General consumption habits of respondents

| **Type of establishment where you usually shop (most frequent)** | **%** |
|---|---|
| Supermarket/hypermarket | 83.8 |
| Specialised shops | 12.3 |
| Local market | 1.6 |
| Organic grocery | 1.6 |
| Local grocery shop | 0.5 |
| No answer | 0.3 |
| **Type of establishment were you usually shop (2nd most frequent)** | |
| Supermarket/hypermarket | 24.8 |
| Specialised shops | 39.4 |
| Local market | 12.0 |
| Organic grocery | 5.7 |
| Local grocery shop | 5.2 |
| I always buy at the same type of establishment | 12.3 |
| Self-supply | 0.3 |
| No answer | 0.3 |
| **Factors that most influence you when purchasing a product?** [1] | |
| Quality | 32.0 |
| Price | 20.7 |
| Local production | 18.2 |
| Fresh product | 17.7 |
| Sustainable production | 5.52 |
| Establishment | 2.48 |
| Brand | 1.80 |
| Others | 1.58 |
| **How would you describe your diet?** [1] | |
| I try to eat everything in a balanced way | 57.4 |
| I look for food with a low cholesterol content | 8.4 |
| I look for food with a healthy fatty acid profile | 11.7 |
| High in protein | 6.5 |
| Low content of salt | 9.3 |
| Vegetarian diet | 1.8 |

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

| | |
|---|---|
| I include prebiotics and probiotics in my diet | 2.1 |
| Others | 2.8 |
| **How often do you consume meat?** | |
| Every/almost every day | 17.5 |
| Two or three times a week | 58.7 |
| Once a week | 18.8 |
| Once or twice a month | 2.9 |
| Less than once a month | 0.3 |
| Never | 1.8 |

600 [1] multiple responses

601

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

602 **Table 5**: Open question: “Why would you not choose to buy seaweed-fed rabbit meat?”

603 (%).

| Reasons for not choosing seaweed-fed rabbit meat | % |
|---|---|
| Do not eat rabbit meat | 43.3 |
| Not an appropriate diet for rabbits | 20.0 |
| Distrust of the beneficial effects of the diet | 13.3 |
| Distrust of rabbit meat due to diseases | 6.67 |
| Distrust of industrial feed | 6.67 |
| Do not like seaweed | 3.33 |
| NA | 6.67 |

604 n=30

605

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

606 **Table 6:** Responses to the open question: “Why would you not consume more rabbit

607 meat if you knew the rabbits were fed seaweed?”

| **Reasons for not consuming more rabbit meat** | **%** |
|---|---|
| Don’t like it | 20.0 |
| Don’t eat rabbit meat | 12.8 |
| Would not influence | 12.8 |
| Already eat enough | 12.0 |
| Only consume home-produced rabbit | 8.0 |
| Lack of habit | 8.0 |
| Consider that it is not an appropriate diet for rabbits | 6.4 |
| Not enough information | 4.0 |
| Rabbit considered a pet | 4.0 |
| Difficult to cook | 2.4 |
| Price | 2.4 |
| Don’t know | 3.2 |
| Other reasons | 4.0 |

608 n=125

609

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

610 **Table 7:** Frequency of answers to the open question: “What benefits do you think there

611 would be to including seaweed in rabbit diets?”

| **Benefits of including seaweed in rabbit diets** | **%** |
|---|---|
| Don’t know | 21.9 |
| Reduction in antibiotic use | 16.7 |
| Healthier meat | 11.3 |
| Higher meat quality | 5.48 |
| More sustainable | 3.92 |
| More natural | 4.0 |
| More nutritious meat | 2.61 |
| None | 2.61 |
| Use of local products | 1.83 |
| Seaweed valorisation | 1.57 |
| Not enough information | 1.31 |
| Mineral-enriched meat | 1.04 |
| NA | 25.8 |

612 n=383

613

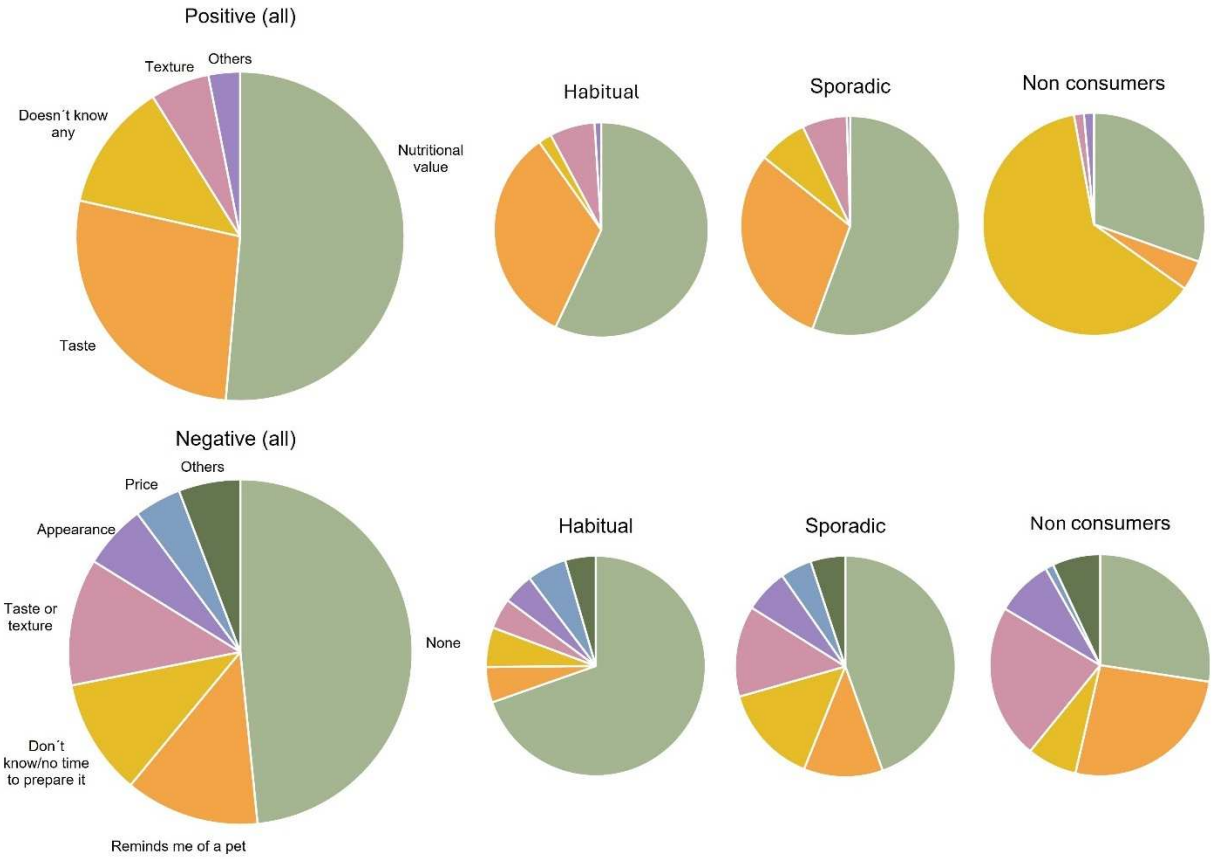
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

| Variable | N | % Non consumers | % Sporadic | % Regular | % Vegetarian | p |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 383 | 69 | 158 | 148 | 8 | |
| **Gender** | | | | | | NS |
| Woman | 209 | 19.6 | 37.3 | 40.7 | 2.4 | |
| Man | 174 | 16.1 | 46.0 | 36.2 | 1.7 | |
| **Age (years)** | | | | | | ** |
| 18-30 | 53 | 15.1 | 58.5 | 18.9 | 7.5 | |
| 31-64 | 225 | 20.4 | 44.4 | 33.3 | 1.8 | |
| >65 | 105 | 14.3 | 25.7 | 60.0 | 0.0 | |
| **Income level** | | | | | | NS |
| Up to 999 | 24 | 25.0 | 33.3 | 41.7 | 0.0 | |
| 1000 to 1499 | 73 | 17.8 | 38.4 | 42.5 | 1.4 | |
| 1500 to 1999 | 60 | 20.0 | 31.7 | 45.0 | 3.3 | |
| 2000 to 2499 | 80 | 21.3 | 43.8 | 31.3 | 3.8 | |
| 2500 to 2999 | 39 | 10.3 | 48.7 | 38.5 | 2.6 | |
| 3000 or more | 100 | 15.0 | 49.0 | 35.0 | 1.0 | |
| NA | 7 | 28.6 | 0.0 | 71.4 | 0.0 | |
| **Frequency of meat consumption** | | | | | | ** |
| Every/almost every day | 67 | 6.0 | 52.2 | 41.8 | 0.0 | |
| 2-3 times a week | 225 | 19.1 | 40.4 | 40.4 | 0.0 | |
| Once a week | 72 | 22.2 | 40.3 | 37.5 | 0.0 | |
| Once or twice a month | 11 | 54.5 | 27.3 | 18.2 | 0.0 | |
| Never or <1/month | 8 | 25.0 | 0.0 | 0.0 | 75.0 | |
| **Place of purchase of rabbit meat[1]** | | | | | | ** |
| Supermarket | 117 | | 47.9 | 52.1 | | |
| Home-reared | 104 | | 51.9 | 48.1 | | |
| Butcher shop | 40 | | 40.0 | 60.0 | | |
| Does not buy it | 21 | | 95.2 | 4.8 | | |
| Local market | 15 | | 60.0 | 40.0 | | |
| Others | 9 | | 50.0 | 50.0 | | |

**Figure 1:** Profile of rabbit meat consumers considering different sociodemographic and consumption habits.

[1]Only rabbit meat consumers

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA




619

620 **Figure 2:** Positive and negative characteristics of rabbit meat highlighted by (all)

621 respondents and by type of rabbit meat consumer.

622

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

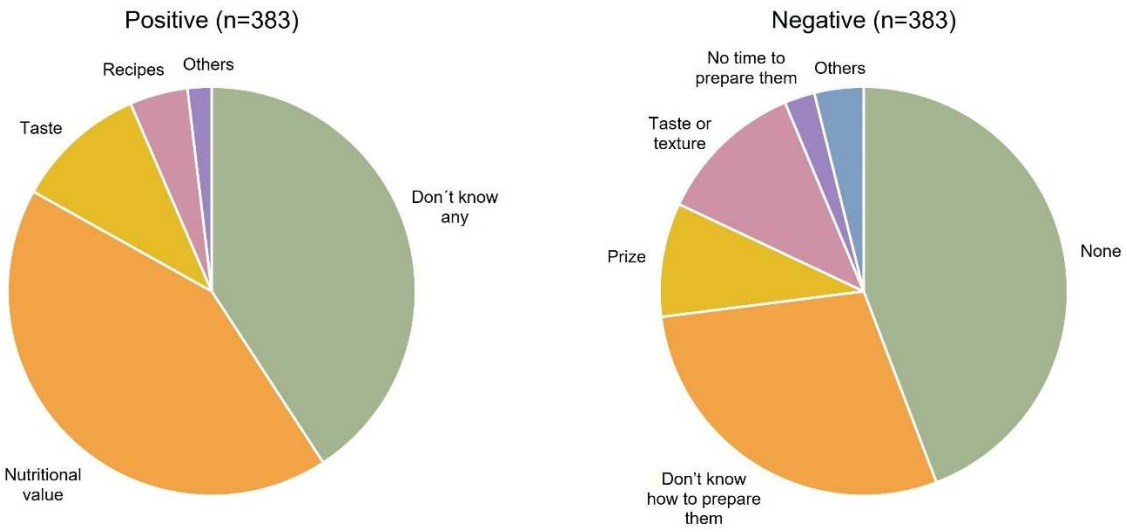
| Variable | N | % Non consumer | % Sporadic | % Regular | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 383 | 230 | 137 | 16 | |
| **Gender** | | | | | NS |
| Woman | 209 | 62.2 | 33.5 | 4.3 | |
| Man | 174 | 57.5 | 38.5 | 4.0 | |
| **Age (years)** | | | | | ** |
| 18-30 | 53 | 52.8 | 43.4 | 3.8 | |
| 31-64 | 225 | 52.9 | 42.2 | 4.9 | |
| >65 | 105 | 79.0 | 18.1 | 2.9 | |
| **Highlights positive properties of seaweed** | | | | | ** |
| No | 167 | 88.0 | 12.0 | 0.0 | |
| Yes | 216 | 38.4 | 54.2 | 7.4 | |

623

624 **Figure 3**: Profile of seaweed consumers in relation to different variables.

625

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA




626

627 **Figure 4:** Positive and negative aspects respondents highlighted about seaweed.

628

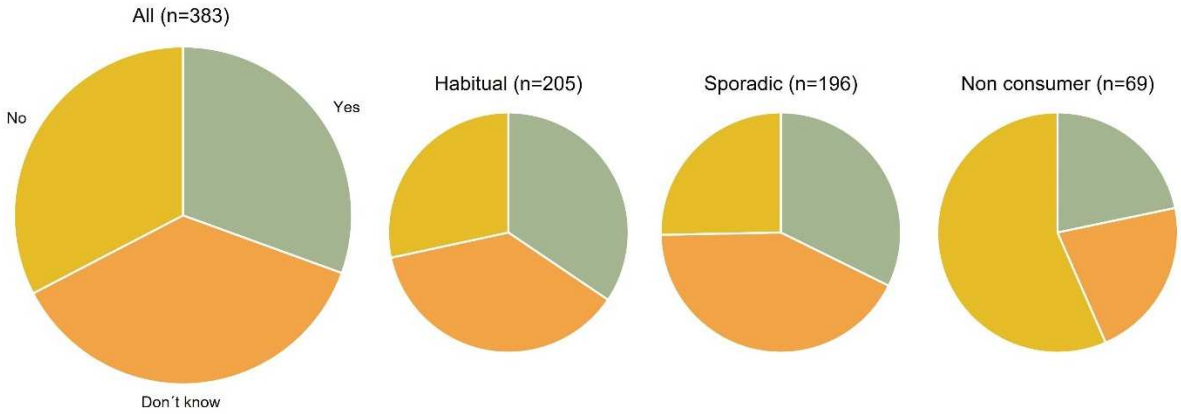
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

| Variable | N | % Yes | % No influence | % No | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **N** | 383 | 252 | 101 | 30 | |
| **Gender** | | | | | |
| Woman | 209 | 67.5 | 23.4 | 9.1 | NS |
| Man | 174 | 63.8 | 29.9 | 6.3 | |
| **Age (years)** | | | | | NS |
| 18-30 | 53 | 66.0 | 32.1 | 1.9 | |
| 31-64 | 225 | 67.1 | 24.4 | 8.4 | |
| >65 | 105 | 62.9 | 27.6 | 9.5 | |
| **Type of consumer of rabbit meat** | | | | | ** |
| Non-consumer | 69 | 46.4 | 30.4 | 23.2 | |
| Sporadic | 158 | 75.9 | 21.5 | 2.5 | |
| Regular | 148 | 65.5 | 29.1 | 5.4 | |
| Vegetarian | 8 | 37.5 | 37.5 | 25.0 | |
| **Place of purchase of rabbit meat[1]** | | | | | NS |
| Supermarket | 117 | 70.9 | 26.5 | 2.6 | |
| Home-reared | 104 | 70.2 | 23.1 | 6.7 | |
| Butcher shop | 40 | 72.5 | 27.5 | 0.0 | |
| Does not buy it | 21 | 66.7 | 28.6 | 4.8 | |
| Local market | 15 | 86.7 | 13.3 | 0.0 | |
| Others | 9 | 55.6 | 33.3 | 11.1 | |
| **Type of consumer of seaweed** | | | | | NS |
| Non-consumer | 230 | 63 | 27.4 | 9.6 | |
| Sporadic | 137 | 68.6 | 26.3 | 5.1 | |
| Regular | 16 | 81.3 | 12.5 | 6.3 | |

**Figure 5**: "If you knew that rabbits had been fed a diet that included seaweed, with the aim of reducing antibiotic use, would you choose this meat over other rabbit meat products?"

[1]Only rabbit meat consumers (306 respondents)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



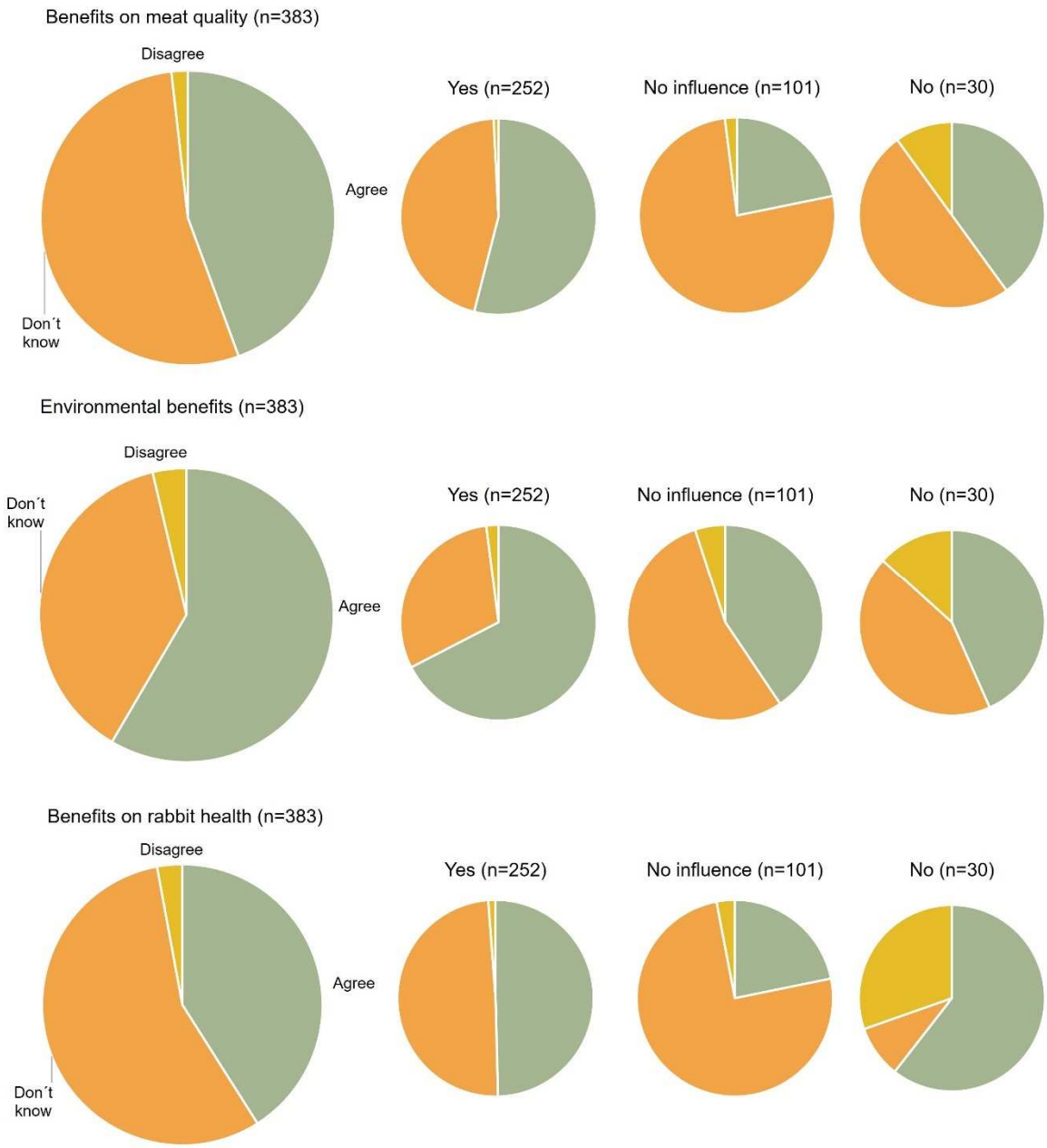

635

636 **Figure 6:** Response to the question: “If you knew that rabbits were fed a diet including

637 seaweed, would you eat more rabbit meat?“

638

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA




639

640 **Figure 7:** Level of agreement of respondents with the following statements: "The
641 inclusion of seaweed in the rabbit diet would 1) improve the meat quality 2) provide
642 environmental benefits 3) improve rabbit health", and answers related to the
643 willingness to choose seaweed-fed rabbit meat in preference to other rabbit meat
644 products.

645

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O sector cunícola enfróntase a un descenso no consumo de carne de coello e a un aumento da mortalidade nas granxas, debido á dificuldade de manter a saúde intestinal dos cazapos tras as recentes restricións no uso de antibióticos. As macroalgas mariñas aparecen como unha prometedora alternativa, xa que presentan numerosos polisacáridos con potencial efecto prebiótico. O obxectivo deste estudo foi avaliar o emprego de macroalgas nas dietas dos coellos co fin de mellorar a súa saúde intestinal no período post-desteta. As especies S. latissima, H. elongata e Ulva spp mostraron resultados prometedores sobre a saúde intestinal. As macroalgas demostraron ser unha boa fonte de minerais, sobre todo de iodo, e non produciron ningún efecto negativo sobre a calidade da carne nin sobre a súa aceptación por parte dos consumidores.