



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00558

(22) Data de depozit: 11/09/2019

(41) Data publicării cererii:
30/09/2020 BOPI nr. 9/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
BIOLOGIE ȘI NUTRIȚIE ANIMALĂ - IBNA
BALOTEȘTI, CALEA BUCUREȘTI NR. 1,
BALOTEȘTI, IF, RO

(72) Inventatori:
• CRISTE RODICA DIANA,
STR. VALEA IALOMIȚEI NR.2A, BL.417,
SC.D, AP.151, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• PANAITTE TATIANA DUMITRA,
BD. IULIU MANIU NR. 71, BL. 4, SC. 2,
AP. 56, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• VĂZARU IULIA, STR. POIENI NR. 1,
AP. 3, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• SOICA CRISTINA, STR. POLONĂ
NR. 23A, OTOPENI, IF, RO;
• TABUC CRISTINA,
BD. CONSTRUCTORILOR NR.11, SC.B,
ET.4, AP.37, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• SĂRĂCILĂ MIHAELA,
STR. AUREL VLAICU NR.37, GIURGIU, GR,
RO;
• UNTEA ARABELA ELENA,
ȘOS. GIURGIULUI, NR.119, BL.11, SC.4,
AP.132, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• GAVRIS TEODOR, STR.GAROAFELOR,
NR.19, BUFTEA, IF, RO

(54) REȚETA FURAJERĂ CARE INCLUDE UN AMESTEC
DE ANTIOXIDANȚI PENTRU PUII DE CARNE (1-28 DE ZILE)
CRESCUȚI ÎN STRES TERMIC RIDICAT

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de furaj pentru puii de carne de 1-28 zile expuși la temperaturi ambientale ridicate. Compoziția, conform invenției, este constituită în procente masice din 1% pulbere din planta întreagă de macrișor (*Oxalis corniculata*), 1% premix vitamino-mineral având conținut de 0,00002% crom sub formă de crom picolinat, precum și un amestec de furaj convențional pe bază de porumb, grâu, gluten de porumb, șrot de soia, ulei vegetal, fosfat monocalcic,

carbonat de calciu, sare, metionină, lizină și colină, compoziția fiind structurată pentru două faze: de starter (1-14 zile) și respectiv, de creștere (14-28 zile), având un conținut de proteină brută de 23,35, respectiv, 23,41%, o capacitate oxidantă de 44,79, respectiv, 44,407 mM echivalent acid ascorbic și 47,434, respectiv, 47,017 mM echivalent vitamina E.

Revendicări: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 219 00558
Data depozit 11-09-2019

48

RETETA FURAJERA CARE INCLUDE UN AMESTEC DE ANTIOXIDANTI PENTRU PUII DE CARNE (1-28 DE ZILE) CRESCUTI IN STRES TERMIC RIDICAT

DESCRIEREA INVENTIEI

Domeniul tehnic la care se referă invenția: Zootehnie

Inventia se refera la o noua reteta furajera structurata in doua: pentru faza starter (1-14 zile) si pentru faza de crestere (14-28 zile) a puilor de carne care, fata de o reteta conventionala contine un amestec de antioxidanti si prin folosirea careia se pot atenua efectele adverse ale stresului termic ridicat asupra performantelor productive si asupra echilibrului microflorei intestinale.

Incalzirea globală declansata de industrializarea intensiva odata cu degradarea mediului inconjurator a dus la cresterea continua a temperaturii, ceea ce face ca stresul termic să fie o problema majora in procesul cresterii animalelor, în special în sectorul pasarilor. Este bine cunoscut faptul că hibridii moderni de pasari, in special cei ai puilor de carne, sunt foarte sensibili la stresul termic datorita penajului, lipsei glandelor sudorifere si cresterii rapide. O temperatură de peste 30 ° C reprezintă o situatie de stres termic ridicat pentru păsări și este unul dintre cei mai comuni factori de stres care afectează criteriile de productie la pasari. La puii de carne crescuti in stres termic ridicat, hraniti cu retete furajere conventionale, scad consumurile, si prin urmare scad si sporurile de greutate, conversia hranei, productia de carne si este afectat echilibrul florei intestinale. Dezechilibrul microflorei intestinale are un impact negativ asupra sanatatii tractusului digestiv si prin urmare si asupra performantele de crestere ale puilor .

Avand in vedere cele prezentate mai sus, se impune necesitatea implementarii unor noi retete furajere pentru puii de carne, crescuti in stres termic ridicat, care sa asigure atenuarea efectelor stresului termic. Mai multe studii au demonstrat importanta includerii de antioxidanti in retetele furajere pentru combaterea efectelor stresului termic In acest fel, cercetarea din nutritia pasarilor ajuta industria printr-o solutie nutritionala viabila, usor de monitorizat si economica care să poată îmbunătăți performanța, să protejeze sănătatea animalelor și să mențină marjele de profit.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia revendicata consta in folosirea unei noi retete furajere pentru puii de carne (1-28 de zile) crescuti in stres termic ridicat (32⁰ C), care

poate atenua efectele adverse ale stresului termic ridicat asupra performanțelor productive și asupra echilibrului microflorei intestinale. Fata de o rețetă conventională, noua rețetă propusă pentru brevetare este îmbogățită în antioxidanți prin includerea unui fitoaditiv (macrisor) și unui microelement (crom). Includerea în rețetele furajere a macrisorului (*Oxalis corniculata*), care are o concentrație ridicată de vitamina C și a cromului, ambele substanțe fiind antioxidante este o abordare fezabilă în mod satisfăcător pentru ameliorarea, pe cale nutrițională, a efectelor dăunătoare aparute la puii de carne crescuți în stres termic.

Avantajele pe care le prezintă invenția revendicată se referă la o rețetă furajeră care este îmbogățită în antioxidanți și poate astfel asigura echilibrul microflorei intestinale și menține performanțele puiilor (1-28 de zile) crescuți în stres termic ridicat (32⁰ C). Rețeta nu conține antibiotice și nici monenzin. Un mare avantaj al prezentei antioxidantilor îl constituie efectul benefic asupra sănătății tractusului digestiv.

Invenția revendicată poate fi obținută la scară industrială fiind adresată producătorilor de furaje în vederea diversificării producției în condițiile asigurării de furaje, fără antibiotice, dedicate pasărilor crescute în stres termic ridicat (32⁰ C). Prin folosirea pulberii de macrisor din planta întreagă uscată, care este mai ieftină, se diminuează costurile furajului fabricat conform noii rețete furajere propusă pentru brevetare.

Combaterea stresului termic rămâne o provocare pentru crescătorii de pasări, fiind necesară dezvoltarea de strategii care să faciliteze atingerea performanțelor optime ale pasărilor. Expunerea la temperaturi ambientale ridicate cauzează serioase disfuncții fiziologice și declanșează secreția de corticosteroizi, care reduc performanțele animalelor (Mujahid et al., 2007).

Notiunea de “stres” este în mod obișnuit utilizată pentru a descrie efectele daunătoare ale unor factori asupra performanțelor și stării de sănătate a pasărilor, și poate fi definită ca un set de răspunsuri la aceste cerințe externe, care determină pasările să se adapteze la noi situații anormale. Acest proces de adaptare eliberează hormoni și redistribuie rezervele de nutrienți, în detrimentul performanțelor (Abhay et al., 2015). Prin creșterea corticosteroizilor circulanți și scăderea activității tiroidei, stresul termic afectează performanțele broilerilor, în special pasările adulte, din cauza faptului că abilitatea de a împrăști căldura scade cu vârsta (Mahmoud et al., 2014; Rosa et al. 2007).

S-a sugerat ca stresul termic este raspunzator de inducerea stresului oxidativ la animale, pe timpul verii (Nizar et al., 2013). Stresul oxidativ rezulta dintr-o perturbare a starii de echilibru intre concentratiile de prooxidanti si antioxidanti, ducand la o supraproductie de radicali liberi si specii oxigen reactive (ROS), si la o scadere a apararii antioxidante (Ganaie et al., 2013). Mai multe studii au aratat ca expunerea la caldura creste productia de ROS (in special de superoxid anion) si induce stresul oxidativ, care duce la citotoxicitate (Bernabucci et al., 2002; Lord-Fontaine si Averill-Bates, 2002).

Stresul termic creste de asemenea activitatea enzimelor antioxidante: superoxid dismutaza, catalaza, glutatation peroxidaza, ca raspuns la cresterea nivelului de ROS. Mai multe studii au aratat ca in sezonul cald are loc o scadere a concentratiilor de antioxidanti endogeni precum glutatation, vitamine (E, C si A) si β -caroten la diferite specii de animale (Kumar et al., 2011; Pandey et al., 2012). Aceasta scadere este explicata de mobilizarea antioxidantilor celulari pentru detoxifierea radicalilor liberi generati de expunerea la caldura.

La pasari, stresul este caracterizat de modificari de comportament, de biochimie si fiziologie, toate fiind destinate restabilirii homeostaziei (Sahin et al., 2009). Cercetarile au demonstrat ca stresul termic afecteaza morfologia si integritatea barierei intestinale a puilor (Song et al., 2013; 2014), ducand la deteriorarea capacitatii digestive de absorbtie si la cresterea permeabilitatii luminale pentru antigeni si toxine. Rhoads et al. (2013) au aratat ca stresul termic poate influenta in mod negativ statusul metabolic si echilibrul fiziologic al pasarilor, ducand la probleme de sanatate si o rata ridicata de mortalitate. Stresul termic compromite functia imuna a pasarilor, crescand susceptibilitatea pasarilor la infectii, si mortalitatea si morbiditatea (Hosseini-Vashan et al., 2016).

Efectele nocive ale stresului termic asupra performantelor puilor au fost demonstrate in diferite studii (Song et al., 2013; Al-Fataftah si Abdelqader, 2014; Song et al., 2014). Influenta negativa a stresului termic asupra performantelor a fost asociata cu un apetit scazut si reducerea consumului de furaj – ca mecanism de reducere a caldurii (Sohail et al., 2013), cu afectarea procesului de digestie – din cauza deteriorarii morfologiei intestinale si scaderea activitatii enzimatice (Chen et al., 2014), cu afectarea proceselor metabolice – din cauza activitatii reduse a hormonilor tiroidieni (Tolba si Sabry, 2004), cu alterarea statusului endocrin – cresterea hormonului corticosteron (Deng et al., 2012), cu modificari metabolice la nivel celular si sistemic (Rhoads et al., 2013).

Mai multe studii au demonstrat importanta suplimentarii cu antioxidanti pentru combaterea efectelor stresului termic. Antioxidantii scad gradul de deteriorare a calitatii carni, cauzata de peroxidarea lipidica si stabilizeaza procesul de oxidare a carni, dupa sacrificare (Yasin et al., 2012). De asemenea, antioxidantii cresc indicii eritrocitari ai broilerilor supusi stresului termic (Majekodunmi et al., 2013)

In perioada de stres termic, la broileri se poate observa o reducere a nivelurilor circulante de vitamine si minerale, care poate fi asociata cu un consum scazut de furaj si un consum ridicat de apa. Mai mult decat atat, capacitatea antioxidanta la puii stresati termic este diminuată din cauza reducerii sintezei de glutathion peroxidaza, superoxid dismutaza si catalaza. In schimb, au fost observate efecte pozitive in urma suplimentarii cu vitamine si minerale in conditii de stres termic (Khan et al. 2012), fiind capabile sa reduca reactiile de oxidare celulara (Silva et al., 2015).

Cercetarile au demonstrat ca suplimentarea cu crom reprezinta o strategie nutritionala de imbunatatire a performantelor de crestere (Ghazi et al., 2012), a metabolismului nutrientilor (Jahanian si Rasouli, 2015), a raspunsului imun (Oba et al., 2012), a functiei antioxidante si a raspunsului la stres (Khan et al., 2014) la puii broiler expusi stresului termic. Suplimentarea furajelor cu crom la broileri determina o crestere a eficientei furajului, a ratei de crestere și îmbunătățește randamentul cărnii și calitatea carcaselor, reducand grasimea (Toghyani și colab., 2006; Samanta și colab., 2008). Efectele benefice ale cromului se intensifica in conditii de stres (Borgs și Mallard, 1998).

Khan et al. (2014) au evidentiat importanta cromului in producerea de modificari fiziologice precum scaderea concentratiilor de corticosteron, cresterea functiei imune si atenuarea stresului oxidativ la broilerii crescuti in stres termic. Metabolismul insulinei influenteaza peroxidarea lipidelor, iar cromul in calitate de cofactor al insulinei, actioneaza ca un antioxidant secundar. In consecinta, broilerii expusi la temperaturi ridicate, pot avea un raspuns imun mai mare si o deteriorare a calitatii carni mai scazuta, prin reducerea formarii de peroxizi. Intr-un studiu intreprins de Króliczewska et al. (2004) in care ratiile broilerilor au fost suplimentate cu 0.50 mg/kg drojdie cu crom, au fost inregistrate scaderi ale nivelurilor serice de colesterol total, LDL, trigliceride si glucoza, si cresteri ale nivelului de HDL in asociere cu greutate corporale mai mari, spor de crestere mai mare, precum si o eficienta a furajului crescuta. Xiao et al. (2016) au evaluat diferite niveluri de crom-propionat (0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mg/kg)

incluse în rațiile puilor broiler crescuți în condiții de stres termic (35 °C) de la 21 la 42 zile, și au observat o scădere liniară a nivelurilor de trigliceride și LDL. Souza et al. (2010) au sugerat că acest fapt are loc probabil datorită cromului care acționează ca inhibitor al hidroximetil-CoA reductaza, responsabilă pentru sinteza colesterolului. Pe aceeași linie, Souza et al. (2010) au observat o reducere cu 6.53 % a conținutului de colesterol total din pieptul provenit de la broilerii care au primit supliment de crom-picolinat.

De mii de ani, plantele au fost utilizate ca agenți terapeutici și sunt în continuare folosite în tratarea diferitelor afecțiuni (Karunanithi et al., 2016). Conform unei estimări OMS, aproximativ 80% din populația globului se bazează pe medicina tradițională datorită efectelor plantelor asupra sănătății, majoritatea utilizând plante sau principiile lor active. Plantele utilizate în medicina tradițională conțin o gamă largă de ingrediente care pot fi utilizate pentru tratarea bolilor cronice, precum și a celor infecțioase.

În lume există aproape 800 de specii de plante aparținând genului *Oxalis*, din familia *Oxalidaceae*. Ele pot fi întâlnite pe toate continentele, mai puțin în zonele polare. Sunt plante anuale, perene, de dimensiuni modeste, care dezvoltă frunze aproximativ egale între ele, asemănătoare trifoiului, dar considerabil mai mici. Originar din Europa de sud, macrișorul s-a răspândit și pe alte continente. În România crește de la câmpie până la 1500 m altitudine.

Toate speciile de măcrișor pot fi recunoscute ușor, în primul rând datorită frunzelor înconfundabile compuse din 3 frunzulițe cu formă de inimă, îndoite pe mijloc. Florile, cu 5 petale, înfloresc din primăvară până toamna. Pot fi galbene, albe, roz, purpurii, sau cu striții violacee. Diferitele culori ale florilor sunt și un indiciu bun pentru a identifica fiecare specie.

Macrișorul preferă solurile umede, alcaline, nisipoase și poate fi găsit în flora spontană din păduri, pe pajiști și în colțurile grădinilor. Crește și în umbră, dar se dezvoltă mai bine la soare direct. O particularitate sunt frunzele și florile ce se deschid și se închid în funcție de intensitatea luminii.

Toate porțiunile plantei sunt comestibile. Acidul oxalic din plantă îi conferă un gust acrișor, frunzele crude sunt zemoase și au o textură proaspătă, un pic crocantă. Măcrișorul este recomandat de multe terapii naturiste pentru cantitățile mari de vitamina C. O gamă largă de compuși fitochimici au fost izolați din *Oxalis corniculata* L., precum flavonoide, tanini, fitosteroli, polifenoli, glicozide, acizi grași. Frunzele conțin flavonoide și izovitexina. Planta este o sursă bogată de acizi grași esențiali precum acidul palmitic, oleic, linoleic, linolenic și stearic.

Cercetarile privind analiza fitochimica a macrisorului au evidentiat prezenta carbohidratilor, proteinelor (12,5 %), aminoacizilor si uleiurilor volatile. Frunzele contin acid tartric, acid citric, oxalat de calciu, flavone, glicoflavone, si acizi fenolici precum acidul p-hidroxibenzoic, vanilic si siringic (Srikanth et al., 2012). Aceasta planta este cunoscuta pentru gustul acid, cauzat de continutul ridicat de oxalat din frunze si tulpini. Frunzele au un continut ridicat de minerale, precum sodiu (1.12 %), potasiu (2.17 %), calciu (2.51 %), si magneziu (0.25 %), aceste minerale fiind vitale in diferite procese metabolice ale organismului (Ibrahim et al., 2012).

Extractele etanolice de *Oxalis corniculata* L. in diferite doze, au evidentiat o semnificativa activitate antioxidanta la soareci (Sharangouda si Patil, 2007). Un studiu realizat de Kumar et al. (2012) a aratat ca pentru inhibarea 50 % a radicalului DPPH (IC50) a fost necesara o concentratie de extract metanolic de macrisor de 30 mg/mL, mai mica decat cea a acidului ascorbic, aratand astfel ca extractul metanolic de macrisor a avut o activitate antioxidanta mai puternica decat cea a acidului ascorbic.

Capacitatea antioxidanta a partii aeriene de *Oxalis corniculata* a fost studiata de catre Borah et al. (2012) prin utilizarea de diferite metode *in vitro*. Analiza principalilor constitienti antioxidanti a evidentiat un continut de polifenoli de 6.424 mg echiv. ac. galic/ g substanta uscata, acid fenolic 0.738 6.424 mg echiv. ac. galic/ g substanta uscata, glutatation de 948.143 μ M/ g proba proaspata. Continutul de vitamina C a fost de 0.414 mg/ g proba proaspata, iar vitamina E de 137.36 mg/ g proba proaspata.

S-a demonstrat ca *Oxalis corniculata* are proprietati antiinflamatoare, anticonvulsive, antifungice, antiulcerative, anticancerigene, antidiabetice, anxiolitice, hepatoprotectore, hipolipidemice, antimicrobiene (Mushir et al., 2015).

Literatura este saraca in studii care sa investigheze efectul includerii de macrisor in hrana animalelor, desi sunt recunoscute multiplele efecte benefice ale acestei plante in medicina traditionala. Gupta et al. (2012) au demonstrat intr-un studiu pe soareci efectele anxiolitice ale extractului etanolic de *Oxalis corniculata*.

In acest context s-a realizat un studiu experimental privind efectele folosirii unei noi retete furajere cu pulbere de macrisor (*Oxalis corniculata*) si crom (sub forma de crom picolinat) pentru furajarea puilor broileri (1-28 zile), crescuti in stres termic ridicat (32⁰ C).

Reteta furajera care include un amestec de antioxidanti pentru puii de carne (1-28 de zile) crescuti in stres termic ridicat propusa pentru brevetare, a fost elaborata tinand cont de urmatoarele:

- cerintele nutritionale conform NRC (1994) si a recomandarilor producatorului hibridului COBB 500 pe care s-a organizat testarea *in vivo*.

- cerintele specifice fazei starter (1-14 zile) si fazei de crestere a puilor (14-28 zile).

- s-a realizat estimarea unor parametri preliminari privind: greutatele, consumul mediu zilnic; consumul specific.

Reteta furajera care include un amestec de antioxidanti pentru puii de carne (1-28 de zile) crescuti in stres termic ridicat, este structurata pe furaje conventionale (porumb, srot soia) dar include in mod particular ca aditivi furajeri:

- pulbere obtinuta din planta intreaga uscata de macrisor (*Oxalis corniculata*) recoltata la maturitate deplina in Balotesti, Ilfov (44.62° N, 26.12° E). Pentru a obtine pulberea de macrisor (*Oxalis corniculata*), plantele au fost uscate timp de 3 saptamani la intuneric la temperatura ambientală de 20°C si apoi macinate fin. Aceasta pulbere a fost caracterizata de un continut ridicat de proteine (12,25 %) si celuloza bruta (10,64%). In ceea ce priveste continutul in substante bioactive, planta de *Oxalis corniculata* prezinta concentratii semnificative de polifenoli (4,96 mg/ g GAE) si vitamina C (11,77 mg/100 g), cu o capacitate antioxidanta de 31.604 mM echivalent acid ascorbic, respectiv 31.223 mM echivalent Vit E. In noua reteta furajera pulberea de macrisor (*Oxalis corniculata*) a fost inclusa la nivel de 1g/100g furaj.

- crom picolinat $\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2)_3$; masa moleculara 418.33 g/mol; produs de Sigma Aldrich (Germania). Au fost incluse 20 mg Cr/kg premix (1 % premix inclus in furaj).

Folosirea noii retete furajere, propusa pentru brevetare, intr-un experiment desfasurat pe pui de carne (1- 28 zile) crescuti in stres termic ridicat (32⁰ C)

Experimentul s-a efectuat timp de 28 zile pe 72 pui din hibridul Cobb 500, achizitionati la varsta de 1 zi. Puii au fost cantariti individual si impartiti in 2 loturi (36 pui/ lot) omogene din punct de vedere al greutatii corporale. Au fost cazati in custi de digestibilitate (6 pui/cusca) structurate pe cate 3 nivele, care au permis inregistrarea zilnica a ingestiei de hrana si a excretei.

Pe parcursul experimentului temperatura in hala experimentală s-a menținut la $33,44 \pm 0,47^\circ\text{C}$, umiditatea la $50 \pm 6,38\%$, lumina 23h/24 ore. In hala ventilatia/cap/animal a fost de $0,48 \pm 0,36\%$ si emisia de CO_2 de $827,64 \pm 155,77$ ppm, fiind sub valoarea maxima stabilita prin *Norma sanitara veterinara privind stabilirea normelor minime de protecție* a puilor destinati productiei de aprobata prin *Ordinul ANSVSA nr. 30/2010*.

La demararea experimentului s-a intocmit un protocol experimental care a fost aprobat de catre Comisia de etica din IBNA Balotesti infiintata prin decizia nr. 52/30.07.2014 si care functioneaza pe langa Consiliul de Administratie si Consiliul Stiintific al IBNA. Rezultatele obtinute in urma analizei pulberii de macrisor folosita in structura noii retete furajere propuse pentru brevetare sunt prezentate in tabelul 1.

Tabelul 1. Date privind compozitia chimica a pulberii de macrisor (*Oxalis corniculata*)

Specificatie	Valoare
Substanta uscata (%)	89,26
Proteina bruta (%)	12,25
Grasime (%)	1,69
Celuloza (%)	10,64
Cenusa (%)	89,26
P (%)	0,50
Cu (mg/kg)	6,40
Fe (mg/kg)	243,68
Mn (mg/kg)	41,00
Zn (mg/kg)	92,10
Polifenoli totali, mg/ g EAG	4,96
<u>Capacitatea antioxidanta</u>	
mM echivalent acid ascorbic	31,604
mM echivalent Vit E	31,223
Vitamina C, mg/100 g	11,77

Datele din tabelul 1 arata un continut ridicat de proteine (12,25 %) si celuloza (10,64%) pentru pulberea de macrisor (*Oxalis corniculata*) precum si o concentratie insemnata de polifenoli si vitamin C.

Au fost formulate 2 retete furajere (tabelul 2) in concordanta cu cerintele nutritionale (NRC, 1994) si cerintele nutritionale ale hibridului Cobb 500. Puii din lotul martor au primit un furaj conventional, bazat pe porumb si srot soia. Noua reteta furajera experimentata pentru lotul

E a inclus 1 % pulbere de macrișor (*Oxalis stricta*) și supliment de crom picolinat (20 mg Cr/kg premix). Premixul celor două rețete (rețeta convențională ca și rețeta propusă pentru brevetare), nu a fost suplimentat cu coccidiostat și a conținut 2000 mg acid ascorbic / kg premix (Tabelul 2). Față de rețeta convențională martor (M), premixul pentru noua rețeta furajera (E) conține 20 mgCr / kg premix. Apa și furajul au fost administrate *ad libitum*.

Tabelul 2. Structura rețetelor furajere ale puilor (1-28 zile) crescuți în stress termic ridicat (32° C)

Ingrediente	Faza starter (1 – 14 zile)		Faza de creștere (14 – 28 zile)	
	M	E	M	E
	%		%	
Porumb	32,73	31,73	36,63	35,63
Grau	20	20	20	20
Gluten de porumb	2	2	4	4
Srot de soia	36,17	36,17	30,2	30,2
Macrișor	-	1	-	1
Ulei vegetal	3,85	3,85	4,3	4,3
Fosfat monocalcic	1,68	1,68	1,52	1,52
Carbonat de calciu	1,5	1,5	1,38	1,38
Sare	0,39	0,39	0,38	0,38
Metionina	0,33	0,33	0,25	0,25
Lizina	0,3	0,3	0,29	0,29
Colina	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix A1	1	1*	1	1*
TOTAL	100	100	100	100
<i>Calcul teoretic</i>				
Energia metabolizabila, Kcal/kg	3039,79	3039,79	3128,99	3128,99
Proteina bruta, %	23,00	23,00	21,50	21,50
Lizina, %	1,44	1,44	1,29	1,29
Metionina, %	0,69	0,69	0,61	0,61
Triptofan, %	0,25	0,25	0,22	0,22
1kg premix vitamino- mineral A1 conține: = 1100000 IU/kg vit. A; 200000 IU/kg vit. D3; 2700 IU/kg vit. E; 300 mg/kg Vit. K; 200 mg/kg Vit. B1; 400 mg/kg Vit. B2; 1485 mg/kg acid pantotenic; 2700 mg/kg acid nicotinic; 300 mg/kg Vit. B6; 4 mg/kg Vit. B7; 100 mg/kg Vit. B9; 1.8 mg/kg Vit. B12; 2000 mg/kg Vit. C; 8000 mg/kg mangan; 8000 mg/kg fier; 500 mg/kg cupru; 6000 mg/kg zinc; 37 mg/kg cobalt; 152 mg/kg iod; 18 mg/kg seleniu.				
*premix A1 + 20 mg Cr/kg premix				

La fiecare sarja de furaj fabricata, pentru fiecare lot, s-au prelevat probe din care s-au facut determinari privind compozitia chimica (tabelul 3), determinari bacteriologice și micologice (tabelul 4).

Rezultatele determinarilor privind compoziția chimică a celor două nutreturi au arătat că acestea au fost echilibrate din punct de vedere energo- proteic (tabelul 3). În stabilirea concentrației în nutrienți (substanța uscată, proteina, grăsimi) s-au utilizat metodele standardizate conform *Regulamentului (CE) nr. 152/2009 privind controlul calității furajelor*.

Conținutul total de polifenoli al nutreturilor combinate a fost măsurat spectrofotometric conform metodei Folin-Ciocalteu, așa cum este descrisă de Untea și colab., (2018). Principiul metodei este de a înregistra absorbția unui extract care, prin complexare cu reactivul Folin-Ciocalteu, absoarbe în domeniul Vis la $\lambda = 732$ nm. Pentru determinarea concentrației de polifenoli totali din furaje a fost utilizată curba de calibrare a acidului galic. Capacitatea antioxidantă totală a nutreturilor combinate a fost evaluată folosind metoda fosfomolibdenică descrisă de Prieto și colab., (2010), bazată pe reducerea Mo (VI) la Mo (V) de către anioni probelor și formarea suplimentară la pH acid a unui complex verde fosfat / Mo (V). Absorbția complexului verde de fosfat / Mo (V) a fost măsurată la 695 nm față de blank (soluție fără adaos de extract).

Efectele tratamentelor au fost testate prin analiza varianței folosind procedura GLM a software-ului Minitab (versiunea 17, Software statistic Minitab®), cu tratamentul ca efect fix, conform modelului $Y_i = T_i + e_i$, unde Y_i este variabila dependentă, T_i este tratamentul și e_i este eroarea. Când rezultatele testului Fisher au fost semnificativ diferite, diferențele dintre medii au fost testate cu testul Tukey și considerate semnificative la $P < 0.05$ folosind.

Tabelul 3. Date privind compoziția chimică a nutreturilor combinate fabricate conform rețetelor furajere prezentate în tabelul 2

Ingrediente	Nutret combinat Faza starter (1 – 14 zile)		Nutret combinat Faza de creștere (14 – 28 zile)	
	M	E	M	E
Substanța uscată, %	90,03	90,16	90,29	90,23
Proteina brută, %	22,77	23,35	22,44	23,41
Grăsimi, %	5,13	5,20	5,66	5,99
Polifenoli totali, mg/ g EAG	1,709	2,084	1,892	1,963
Capacitate antioxidantă, mM echivalent acid ascorbic	42,715	44,790	43,286	44,407
mM echivalent Vit E	45,151	47,434	44,539	47,017

Determinarea de polifenoli a evidențiat un conținut de polifenoli totali cu 21,9 % mai mare la lotul E (cu adaos de *Oxalis corniculata* și *crom*) față de lotul M (rețeta convențională),

in faza starter. Nutretul combinat cu adaos de antioxidanti a prezentat de asemenea o capacitate antioxidanta mai mare fata de nutretul combinat conventional

In tabelul 4 sunt prezentate rezultatele analizelor bacteriologice si micologice efectuate pe furajele (nutreturile combinate) administrate celor doua loturi (M, E). Determinarea NTG Col/g s-a efectuat conform standardului SR 13178-1; Coliformi totali/g conform SR 13178-2; E. Coli/g conform SR 13178-2; Salmonella Col/g conform SR EN 12824; NTF Col/g conform STAS 6953-81. Valorile determinate in nutretul combinat fabricat conform retetei propuse pentru brevetare se incadreaza in limitele maxime admise, reglementate de Monitorul Oficial al Romaniei 362/ 2003. In ambele nutreturi combinate, *Salmonella spp.* a fost absenta (tabelul 4).

Tabelul 4. Analiza bacteriologica si micologica a nutreturilor combinate

Specificatie		NTG Col/g SR 13178-1	Coliformi totali/g SR 13178-2	<i>E.coli</i> /g SR 13178-2	<i>Salmonella</i> Col/g SR EN 12824	NTF Col/g STAS 6953-81
<i>Faza starter</i> (1 – 14 zile)	Reteta lotului M_starter	57 x 10 ³	40	11,5	absent	7750
	Reteta lotului E_starter	32 x 10 ³	25	25	absent	4750
<i>Faza de crestere</i> (14 – 28 zile)	Reteta lotului M_crestere	49 x 10 ³	2	0,9	absent	1725
	Reteta lotului E_crestere	43,5 x 10 ³	3,5	1,6	absent	250
Limite maxime admise: (MO 362 bis/2003): NTG: maxim 15x 10 ⁶ col/g; coliformi totali: maxim 3000 col/g; <i>E.coli</i> : maxim 100 col/g; <i>Salmonella sp.</i> : 0 col/g; NTF: maxim 5 x 10 ⁴ col/g. Unde: SR= Standard romanesc; STAS= Standarde de stat; SR EN= Standarde europene.						

Rezultatele obtinute in experiment privind performantele de productie.

Pe parcursul perioadei experimentale s-au monitorizat urmatoorii parametrii (tabelul 5): greutatea corporala (g); consumul mediu zilnic (g furaj/pui/zi); sporul mediu zilnic (g/pui/zi); consumul specific (g furaj/g spor). Mortalitatea a fost inregistrata pe parcursul intregii perioade experimentale.

Tabelul 5. Efectul utilizării rețetei propuse pentru brevetare asupra performanțelor de creștere ale puilor (1-28 zile) crescuți în stres termic ridicat (32⁰ C)

Specificatie			M	E	SEM	Valoarea lui p
Greutatea corporală (g)	Starter (0-14 zile)	1 zile	46,36	46,36	0,345	0,9975
		7 zile	186,52	189,40	1,951	0,4645
		14 zile	446,10	463,78	5,141	0,0856
	Crestere (14-28 zile)	21 zile	801,79	831,64	10,103	0,1408
		28 zile	1212,57	1238,06	16,807	0,4524
Spor mediu zilnic (g/cap/zi)	Starter (0-14 zile)	0-7 zile	20,02	20,43	0,266	0,4429
		8-14 zile	37,08	39,20	0,666	0,1157
		Perioada 0-14 zile	28,55	29,82	0,365	0,0841
	Crestere (14-28 zile)	15-21 zile	50,81	52,55	1,315	0,5124
		22-28 zile	58,68	58,06	2,006	0,8779
		Perioada 15-28 zile	54,75	55,31	1,071	0,7969
	Total perioada 1-28 zile			41,65	42,56	0,602
Consum mediu zilnic (gNC/pui)	Starter (0-14 zile)	0-7 zile	21,29	21,47	0,202	0,6758
		8-14 zile	48,46	49,25	1,035	0,7220
		Perioada 0-14 zile	34,87	35,36	0,583	0,6974
	Crestere (14-28 zile)	15-21 zile	69,94	71,74	1,974	0,6703
		22-28 zile	84,81	87,26	3,186	0,7198
		Perioada 15-28 zile	77,38	79,50	2,574	0,7001
Total perioada 1-28 zile			56,13	57,43	1,540	0,6925
Consum specific (kg NC/kg spor)	Starter (0-14 zile)	0-7 zile	1,06	1,05	0,011	0,5024
		8-14 zile	1,31	1,26	0,021	0,2464
		Perioada 0-14 zile	1,22	1,19	0,011	0,1298
	Crestere (14-28 zile)	15-21 zile	1,38	1,36	0,010	0,5031
		22-28 zile	1,45	1,51	0,014	0,0216
		Perioada 15-28 zile	1,42	1,44	0,007	0,1240
Total perioada 1-28 zile			1,35	1,35	0,004	0,9490

Unde : litere diferite în același rând = diferențe semnificative; SEM = eroarea standard a mediei

După cum se poate observa din datele prezentate în tabelul 5, pentru toată perioada experimentală nu s-au înregistrat diferențe semnificative ale greutateii corporale. Cu toate acestea, la 7, 14, 21 și 28 de zile se poate observa că greutatea corporală a puilor hrăniți cu rețeta propusă pentru brevetare a fost mai mare decât cea a puilor hrăniți cu rețeta convențională, însă diferențele nu au fost susținute statistic. La 7 zile greutatea lotului E a fost mai mare cu 1,54 %, la 14 zile cu 3,96 %, la 21 zile cu 3,72 %, iar la 28 zile cu 2,10% față de lotul martor. Raportat la greutatea corporală din ghidul de creștere a hibridului Cobb 500, greutatea finală a puilor,

crescuti in conditii de stres, a fost mai mica cu 24,92 % (lotul M) respectiv cu 23,34 % (lotul E). De asemenea, sporul mediu zilnic a fost mai mare la puii hraniti cu reteta (E) propusa pentru brevetare, inasa nu a fost asigurat statistic. Consumul mediu zilnic (tabelul 5) calculat pentru lotul de pui hraniti cu reteta propusa pentru brevetare (macrisor si adaos de crom picolinat) a fost mai mare fata de consumul inregistrat la puii hraniti cu dieta conventionala. Fata de datele din ghidul de crestere a hibridului Cobb 500, puii de la lotul M au avut un consum mediu zilnic (1-28 zile) cu 42,96% mai mic, iar puii de la lotul E cu 41,64 % mai mic. In ceea ce priveste consumul specific, nu au fost inregistrate diferente intre loturi.

La 28 de zile, conform protocolului de lucru aprobat, au fost sacrificati 5 pui/ lot. Intregul intestin a fost prelevat, iar continutul intestinal si cel cecal s-au golit in tuburi de plastic in vederea examinarii bacteriologice (*Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Lactobacilli*, *Stafilococci*, *Salmonella spp.*).

Tabelul 6. Efectul folosirii retetei propuse pentru brevetare asupra compozitiei microbiotei intestinale (\log_{10} UFC*/g continut intestinal) a puilor crescuti in stres termic ridicat (32⁰ C)

Specificatie	M	E	SEM	Valoarea lui p
<i>Enterobacteriaceae</i> , lg10	7,456 ^a	7,415 ^b	0,008	<0,0001
<i>E. coli</i> , lg 10	6,103 ^a	6,07 ^b	0,006	<0,0001
Stafilococci, lg10	5,796 ^a	5,689 ^b	0,021	<0,0001
<i>Lactobacilli</i> , lg 10	7,106 ^a	7,181 ^b	0,014	<0,0001
<i>Salmonella spp.</i>	Absent	Absent	-	-

Unde: * unitati formatoare de colonii; litere diferite in acelasi rand= diferente semnificative; SEM= eroarea standard a mediei

Numarul de bacterii patogene, respectiv, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* si stafilococi a fost semnificativ ($P \leq 0.05$) mai mic in continutul intestinal al puilor de la lotul E (reteta propusa pentru brevetare) comparativ cu lotul martor (tabelul 6). Numarul de lactobacilli din continutul intestinal al puilor din lotul experimental a fost semnificativ ($P \leq 0.05$) mai mare comparativ cu lotul M, fapt ce demonstreaza ca utilizarea macrisorului si a cromului in dieta puilor favorizeaza multiplicarea bacteriilor benefice pentru mentinerea echilibrului florei intestinale (tabelul 6).

Tabelul 7. Efectul folosirii retetei propuse pentru brevetare asupra compozitiei microbiotei cecale (\log_{10} UFC*/g continut cecal) a puilor crescuti in stress termic ridicat (32° C)

Specificatie	M	E	SEM	Valoarea lui p
<i>Enterobacteriaceae</i> , lg10	11,142 ^a	11,119 ^b	0,005	0,0005
<i>E. coli</i> , lg 10	9,944 ^a	9,875 ^b	0,014	0,0003
Stafilococci, lg10	8,130 ^a	7,924 ^b	0,039	<0,0001
<i>Lactobacilli</i> , lg 10	9,898 ^a	10,965 ^b	0,202	<0,0001
<i>Salmonella spp.</i>	Absent	Absent	-	-

Unde: * unitati formatoare de colonii; litere diferite in acelasi rand= diferente semnificative; SEM= eroarea standard a mediei

In ceea ce priveste analiza microbiologica a continutului cecal, putem observa in tabelul 7 ca reteta propusa pentru brevetare (E) administrata puilor a determinat reducerea semnificativa ($P < 0.05$) a numarului de unitati formatoare de colonii de bacterii patogene in cecum (*Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Stafilococci*). Totodata, numarul de lactobacilli a fost semnificativ ($P < 0.05$) mai mare in continutul cecal al puilor de la lotul experimental fata de cei de la lotul martor (tabelul 7). Acest rezultat demonstreaza ca utilizarea retetei propuse pentru brevetare are ca si consecinta mentinerea sanatatii tractului digestiv al puilor, pe de-o parte prin inhibarea multiplicarii bacteriilor patogene, iar pe de alta parte prin efectul prebiotic (multiplicarea bacteriilor lactice, benefice pentru asigurarea echilibrului dintre speciile bacteriene din intestin). In toate probele de continut, *Salmonella spp.* a fost absenta.

REVENDICARI:

1. *Reteta furajera care include un amestec de antioxidanti pentru puii de carne (1-28 de zile) crescuti in stres termic ridicat care are in structura sa, din 100 de procente: 1 % pulbere obtinuta din planta intrega uscata de macrisor (*Oxalis corniculata*) si 0,00002 % crom (sub forma de crom picolinat).*
2. *Reteta furajera care include un amestec de antioxidanti pentru puii de carne (1-28 de zile) crescuti in stres termic ridicat structurata in doua faze: faza starter (1-14 zile) caracterizata prin 23,35 % proteina bruta, 5,20 % grasime bruta, 2,084 mg EAG/g polifenoli totali, capacitate antioxidanta de 44,790 mM echivalent acid ascorbic si 47,434 mM echivalent Vit E, si pentru faza de crestere (14 - 28 zile) caracterizata prin 23,41 % proteina bruta, 5,99 % grasime bruta, 1,963 mg EAG/g polifenoli totali, capacitate antioxidanta de 44,407 mM echivalent acid ascorbic si 47,017 mM echivalent Vit E.*
3. *Reteta furajera care include un amestec de antioxidanti pentru puii de carne (1-28 de zile) crescuti in stres termic ridicat, care asigura mentinerea sanatatii tractului digestiv al puilor, pe de-o parte prin inhibarea multiplicarii bacteriilor patogene, iar pe de alta parte prin efectul prebiotic (multiplicarea bacteriilor lactice, benefice pentru asigurarea echilibrului dintre speciile bacteriene din intestin).*