



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAIMUNDA THYCIANA VASCONCELOS FERNANDES

**MICROALGA (*Dunaliella salina*): PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES
APLICADOS À NUTRIÇÃO DE POEDEIRAS**

MOSSORÓ

2017

RAIMUNDA THYCIANA VASCONCELOS FERNANDES

**MICROALGA *Dunaliella salina*: PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES
APLICADOS À NUTRIÇÃO DE POEDEIRAS**

Tese apresentada ao Doutorado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Produção e
Conservação Animal no Semiárido

Orientador: Prof. Dr. Alex Augusto
Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Martins
Varela de Arruda

MOSSORÓ

2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

V363m Vasconcelos Fernandes, Raimunda Thyciana.

Microalga *Dunaliella* salina: produção de carotenoides aplicados à nutrição de poedeiras / Raimunda Thyciana Vasconcelos Fernandes. - 2017.

107 f. : il.

Orientador: Alex Augusto Gonçalves. Coorientador: Alex Martins Varela de Arruda.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido,
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal,
2017.

1. Antioxidantes. 2. Biomassa. 3. Compostos bioativos. 4. Gema. 5. Pigmentação. I. Gonçalves, Alex Augusto, orient. II. Martins Varela de Arruda, Alex, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

RAIMUNDA THYCIANA VASCONCELOS FERNANDES

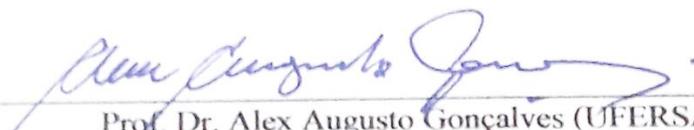
**MICROALGA *Dunaliella salina*: PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES
APLICADOS À NUTRIÇÃO DE POEDEIRAS**

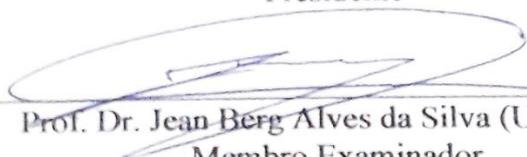
Tese apresentada ao Doutorado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

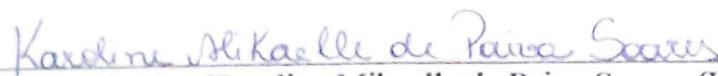
Linha de Pesquisa: Produção e
Conservação Animal no Semiárido

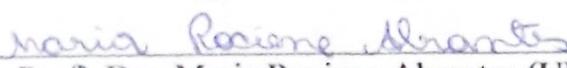
Defendida em: 30/11/2017.

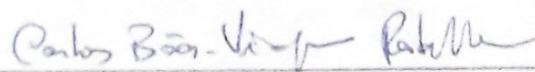
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Alex Augusto Gonçalves (UFERSA)
Presidente


Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Membro Examinador


Prof.ª. Dra. Karoline Mikaelle de Paiva Soares (UFERSA)
Membro Examinador


Prof.ª. Dra. Maria Rociene Abrantes (UFERSA)
Membro Examinador


Prof. Dr. Carlos Bôa-Viagem Rabello (UFRPE)
Membro Examinador

À minha mãe, que sempre foi doutora em transformar dificuldades em superações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Alex Martins Varela de Arruda, meu esposo e co-orientador, por nunca me deixar esquecer que é muito válido estudar e se dedicar ao máximo, buscar cada vez mais o auto aperfeiçoamento, com ética profissional acima de tudo. Obrigada pela consultoria ilimitada, por sempre ouvir os meus devaneios científicos, por acreditar nos meus insights, por dar todo o suporte científico, logístico, financeiro, operacional e, principalmente, por estar ao lado dos nossos filhos quando mais precisei estar ausente.

Agradeço aos meus filhos, Lorena e Levi, razões da minha existência, por fazerem da minha vida uma doce jornada. Hoje e sempre, tudo por vocês!

Agradeço ao meu irmão Rogério Taygra por ter me apresentado a essa microalga fantástica e com ela me trazer um mundo de possibilidades. Sem as suas incontáveis coletas de inóculo e suporte técnico, esse trabalho não estaria completo.

Agradeço aos meus pais Rogério e Rusenilda por estarem ao meu lado, incondicionalmente, por apoiarem as minhas escolhas e nunca duvidarem do meu potencial.

Agradeço ao meu Orientador, Professor Alex Augusto Gonçalves, por ter aceito o desafio da minha orientação, por ter acreditado nesse projeto, por sempre ouvir e respeitar as minhas escolhas. Por ser gentil em todos os momentos, por entender as minhas falhas como sua orientada (quando eu não podia falhar como mãe), por ler e corrigir meus manuscritos em tempo recorde e por ser um exemplo a ser seguido.

Agradeço as parceiras de trabalho e amigas queridas Aurora Melo e Jéssica Marinho por todo apoio técnico e companheirismo durante essa caminhada.

Agradeço aos Professoras Marcelle Araújo, Patrícia Lima, Patrícia Ligia e Carlos Bôa-Viagem, aos técnicos Odonil e Naama e ao funcionário do aviário Hélio pela disponibilidade dos laboratórios, setores produtivos e ajuda que me foi dedicada.

Aos membros conselheiros, os professores Jean Berg, Karoliene Soares, Rociene Abrantes e Carlos Bôa-Viagem por todo tempo dedicado a este trabalho, por tão valiosas contribuições e pela postura profissional e ética que levarei para minha vida.

“... Mas a palavra hebraica timshel - você poderá – te dá uma escolha. Pode ser a palavra mais importante do mundo. Isso diz que o caminho está aberto. Isso te dá o livre arbítrio. Pois se você pode, também é verdade que você não pode...”

John Steinbeck

RESUMO

Considerando que as microalgas contêm ampla variedade de componentes químicos e bioativos que possam ser utilizados na alimentação animal e humana, dois experimentos foram realizados. No primeiro experimento objetivou avaliar o crescimento da microalga *Dunaliella salina* em dois meios de cultivo, mensurando a sua curva de crescimento e produtividade e o seu valor nutricional. Para utilizou-se os meios de cultivo mixotrófico Conway e o autotrófico salino durante 14 dias. A *D. salina* em meio Conway apresentou fase exponencial mais precoce, com DCM (23.500 células/ml), produtividade e velocidade de crescimento maiores ($p < 0,05$) que o meio salino (18.200 células/ml), embora o diâmetro celular da *D. salina* tenha sido maior ($p < 0,05$) em meio salino ($25,5\mu\text{m} \pm 2,65$) do que em meio Conway ($21,25\mu\text{m} \pm 1,26$). A biomassa da *D. salina* em meio Conway obteve maiores valores ($P < 0,05$) de proteína (60,43%), nitrogênio (9,67mg/g), clorofila a (60,60mg/L), enquanto o meio salino propiciou maiores valores de lipídios (6,93%), açúcares (8,09%), energia bruta (3955kcal/kg), fósforo (8,40mg/g), potássio (128,66mg/g), magnésio (29,63mg/g), zinco (8,23mg/g), carotenoides totais (34,73mg/L), vitamina C (503,13mg/100g), polifenóis extraíveis totais (81,00mg/100g), antocianinas (30,87mg/100g) e flavonoides amarelos (45,30mg/100g). A utilização do meio salino para a microalga *D. salina*, embora tenha apresentado menores taxas de crescimento e produtividade, resultou numa alternativa viável ao meio mixotrófico Conway, pois, propiciou que a biomassa obtivesse valor nutricional semelhante ao do meio comercial, e, com maiores teores de antioxidantes. Por sua vez, para o segundo experimento, objetivou-se avaliar a produção, qualidade dos ovos e morfometria intestinal de poedeiras alimentadas com a microalga *D. salina*. Utilizou-se, então, 120 poedeiras foram alimentadas por 84 dias, divididos em três períodos (28 dias cada), com cinco níveis de inclusão de biomassa de *D. salina* (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%). Determinou-se o desempenho produtivo das galinhas, a qualidade físico-química dos ovos, as alterações morfométricas do intestino delgado e fígado. Os níveis de inclusão da biomassa da microalga *D. salina* tiveram efeito linear sobre o desempenho (peso dos ovos, massa dos ovos, conversão alimentar), parâmetros qualitativos (peso de gema, índice de gema), e físico-químico dos ovos (carotenoides totais, TBARS, e coloração da gema), além de aumentarem os comprimentos das vilosidades e a relação vilo/cripta dos segmentos duodeno e íleo, bem como a metabolização dos carotenoides no fígado. A inclusão de biomassa da microalga marinha *D. salina* em rações experimentais para poedeiras melhorou o desempenho, a saúde intestinal das aves e a qualidade físico-química dos ovos, além de conferir maior teor de carotenoides, coloração às gemas e protegê-las da oxidação lipídica.

Palavras-chave: Antioxidantes. Biomassa. Compostos bioativos. Gema. Pigmentação.

ABSTRACT

Considering that microalgae contain a wide variety of chemical and bioactive components that can be used in animal and human feeding, two experiments were performed. The first experiment aimed to evaluate the growth of the *Dunaliella salina* microalgae in two culture media, measuring its growth curve and productivity and its nutritional value. For the use of Conway mixotrophic and saline autotrophic culture media for 14 days. *D. salina* in Conway medium had an earlier exponential phase, with DCM (23,500 cells/mL), higher productivity and growth rate ($p < 0.05$) than saline medium (18,200 cells/mL), although the cell diameter of *D. salina* was higher ($p < 0.05$) in saline medium ($25.5 \mu\text{m} \pm 2.65$) than in Conway medium ($21.25 \mu\text{m} \pm 1.26$). The biomass of *D. salina* in Conway obtained higher values ($P < 0.05$) of protein (60.43%), nitrogen (9.67 mg/g), chlorophyll a (60.60 mg/L), while medium saline provided higher values of lipids (6.93%), sugars (8.09%), gross energy (3955 kcal/kg), phosphorus (8.40 mg/g), potassium (128.66 mg/g), magnesium, Total extracellular polyphenols (81.00 mg/100 g), anthocyanins (30 mg/kg), zinc (8.23 mg/g), total carotenoids (34.73 mg/L), vitamin C 87mg/100g and yellow flavonoids (45.30mg/100g). The use of the saline medium for the *D. salina* microalgae, although presenting lower rates of growth and productivity, resulted in a viable alternative to the Conway mixotrophic medium, because it allowed the biomass to obtain nutritional value similar to the commercial medium, and, with larger levels of antioxidants. For the second experiment, the objective was to evaluate the production, egg quality and intestinal morphometry of laying hens fed with the *D. salina* microalgae. A total of 120 laying hens were fed for 84 days, divided into three periods (28 days each), with five levels of inclusion of *D. salina* biomass (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1%). The productive performance of the chickens, the physical-chemical quality of the eggs, the morphometric alterations of the small intestine and liver were determined. The inclusion levels of the microalgae *D. salina* biomass had a linear effect on the performance (egg weight, egg mass, feed conversion), qualitative parameters (yolk weight, yolk index), and physicochemical parameters of eggs (total carotenoids, TBARS, and yolk color), as well as increasing the villi lengths and the villus/crypt ratio of the duodenum and ileum segments, as well as the metabolization of carotenoids in the liver. The inclusion of biomass of *D. salina* marine microalgae in experimental rations for laying hens improved the performance, the intestinal health of the birds and the physico-chemical quality of the eggs, besides conferring a higher carotenoid content, coloring the yolks and protecting them from oxidation lipid.

Keywords: Antioxidants. Biomass. Bioactive compounds. Egg yolk. Pigmentation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	– Cultivo de microalga <i>Dunaliella salina</i> em tanques a céu aberto.....	20
Figura 2	– Aparecimento da microalga <i>Dunaliella salina</i> em tanques salinos	21
Figura 3	– Tanques salinos destinados à produção de <i>Dunaliella salina</i>	23
Figura 4	– Curva de crescimento de microalgas em sistema fechado descontínuo.....	30
Figura 5	– União de uma célula móvel verde e outra vermelha da microalga <i>Dunaliella salina</i> para formação de um zigoto	32
Figura 6	– Fotomicrografia de células vermelhas da microalga <i>Dunaliella salina</i> em meio hiperosmótico (natural salino).....	33
Figura 7	– Fotomicrografia da célula da microalga <i>Dunaliella salina</i> em meio hipoosmótico (adição de água destilada ao meio natural salino).....	34
Figura 8	– Formação do portomícron no enterócito de poedeira.....	39
Figura 9	– Relação de antagonismo entre as vitaminas A e E pela absorção no intestino delgado.....	40
Figura 10	– Altura de albúmen para determinação da Unidade Haugh.....	44
Figura 11	– Leque colorimétrico utilizado para determinar a coloração das gemas dos ovos.....	46
Figura 12	– Distribuição de cores de acordo com o sistema CIELab.....	47
Figura 13	– Colorimetria da gema de acordo com o sistema CIELab, determinada através do uso de espectrofotômetro.....	47

CAPÍTULO 2

Figura 1	– Curva de crescimento da microalga <i>Dunaliella salina</i> em meios de cultivo Conway e salino.....	70
Figura 2	– Fotomicrografia em objetiva de 40x da microalga <i>D. salina</i> nos meios de cultivo.....	71

CAPÍTULO 3

Figura 1	– Comprimento das vilosidades do duodeno (μm) de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais.....	97
Figura 2	– Comprimento das vilosidades do íleo (μm) de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais.....	98
Figura 3	– Relação altura de vilosidades/profundidade de cripta do duodeno de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais.....	99
Figura 4	– Relação altura de vilosidades/profundidade de cripta do íleo de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais.....	99
Figura 5	– Fotomicrografia de corte histológico de fígado de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais.....	101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	– Soluções e modo de preparo do meio de cultivo Conway.....	24
----------	---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	– Produtividade (mg/L/dia), velocidade de crescimento (k) da microalga <i>Dunaliella salina</i> e densidade celular máxima (DCM; célula/mL).....	72
Tabela 2	– Composição químico-energética (em base seca) da biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em dois meios de cultivo.....	73
Tabela 3	– Conteúdo de macro e micronutrientes (em base seca) da biomassa da <i>Dunaliella salina</i> em dois meios cultivados	74
Tabela 4	– Teores de compostos bioativos (em base seca) presentes na biomassa da <i>Dunaliella salina</i> em dois meios de cultivo.....	75

CAPÍTULO 3

Tabela 1	– Composição em ingredientes (kg) e nutrientes (%) das rações controle (RCO), com 0,25 (R025), 0,50 (R050), 0,75 (R075) e 1% (R1) de inclusão de biomassa de <i>D. salina</i>	85
Tabela 2	– Composição nutricional da biomassa de <i>Dunaliella salina</i>	89
Tabela 3	– Parâmetros produtivos de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais durante 3 períodos de postura (28 dias cada).....	89
Tabela 4	– Parâmetros qualitativos de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais durante 3 períodos de postura (28 dias cada).....	91

Tabela 5	–	Parâmetros físico-químicos de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais durante 3 períodos de postura (28 dias cada).....	93
Tabela 6	–	Morfometria intestinal de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais.....	95
Tabela 7	–	Saturação de hepatócitos do fígado de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de <i>Dunaliella salina</i> em rações experimentais....	100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
3.1. Produção de microalgas.....	18
3.2. Curva de Crescimento.....	29
3.3. Microalga <i>D. salina</i>.....	31
3.4. Carotenoides.....	35
3.5. Qualidade do Ovo	41
3.6. Referências.....	49
4. CURVA DE CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E COMPOSTOS BIOATIVOS DA MICROALGA MARINHA <i>Dunaliella salina</i> EM CULTIVOS DESCONTÍNUOS	65
4.1. Introdução.....	67
4.2. Material e Métodos.....	67
4.3. Resultados e Discussão.....	70
4.4. Conclusão.....	77
4.5. Referências	77
5. PRODUÇÃO, QUALIDADE DE OVOS E MORFOMETRIA INTESTINAL DE POEDEIRAS ALIMENTADAS COM MICROALGA MARINHA.....	81
5.1 Introdução.....	83
5.2 Material e Métodos.....	84
5.3 Resultados e Discussão.....	88
5.4 Conclusão.....	101
5.5 Referências	102
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	107

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse pela utilização de microalgas em estudos e processos biotecnológicos, principalmente pela identificação de substâncias sintetizadas por estes organismos, que podem ser destinadas à produção de energia e obtenção de compostos de interesse para as indústrias química, cosmética, farmacêutica, alimentícia, como também no tratamento de águas residuais, tem fomentado pesquisas em diversas áreas (COSTA et al., 2003; DERNER et al., 2006; DAO-LUN; ZU-CHENG, 2006; WANG et al., 2007; AMBROSI et al., 2008; SILVA, 2008; CHU et al., 2010; MENDONÇA et al., 2012).

Dentre as microalgas com grande potencial biotecnológico, a espécie marinha *Dunaliella salina* é uma importante fonte de carotenoides (SKJÅNES et al., 2013). O seu cultivo comercial é realizado de maneira eficiente em tanques abertos, em regiões de salinas, onde a elevada incidência luminosa e a alta salinidade geram um estresse (desequilíbrio osmótico) nas células, que respondem com a síntese de glicerol e carotenoides (BOROWITZA; BOROWITZA, 1988). Este processo conhecido como carotenogênese permite que esta espécie seja uma fonte natural de antioxidantes para o uso na indústria de alimentos.

Por sua vez, as indústrias de rações e suplementos para animais buscam nas microalgas uma fonte de nutrientes e compostos bioativos para não apenas nutrir e melhorar o desempenho, como incorporar e enriquecer os produtos de origem animal, como carne, leite e ovos, fomentando pesquisas como ensaios de digestibilidade e performance produtiva (PARK et al., 2015).

Nesse contexto, o ovo comercial é o produto final da galinha postura, que consegue transformar recursos alimentares de valor biológico inferior em um produto de alta qualidade nutricional para o consumo humano (BERTECHINI, 2006). É considerado nutricionalmente completo, sendo uma fonte proteica rica, com baixo teor de gordura, contendo em seu componente lipídico maiores concentrações de ácidos graxos insaturados (SARCINELLI et al., 2007). O ovo é também uma excelente fonte dos carotenoides como luteína, zeaxantina (BRULC et al., 2013), β -caroteno e cantaxantina (RUTH et al., 2011), além de ser uma das principais fontes de vitamina A para a

população, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a deficiência dessa vitamina é uma questão de saúde pública (MINGUÉZ-MORQUERA, 2002).

O consumo de ovos, e a utilização de suas vantagens nutricionais pela população, está associado à qualidade do produto oferecido ao consumidor, que é determinada por um conjunto de características que podem influenciar a aceitabilidade do produto no mercado. Dessa forma, visando uma maior produtividade em biomassa e teores de compostos bioativos na microalga *D. salina*, bem como, melhorar a qualidade físico-química do ovo, aumentar a pigmentação e o teor de carotenoides da gema, de forma natural e sem prejudicar a saúde das aves, propõe-se cultivar a microalga *D. salina* em dois diferentes meios de cultivo e utilizar a sua biomassa como ingrediente na dieta de galinhas poedeiras.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar a produção de carotenoides da microalga *Dunaliella salina* em cultivos e sua aplicação à nutrição de poedeiras

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a curva de crescimento, produtividade, velocidade de crescimento e densidade celular máxima da microalga marinha *D. salina* em dois meios de cultivo.
- Determinar a composição nutricional e de compostos bioativos da biomassa de *D. salina* oriunda dos meios de cultivo.
- Avaliar o desempenho e a morfometria intestinal de poedeiras alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *D.salina*.
- Avaliar a qualidade físico-química, o teor de carotenoides, a pigmentação da gema e a oxidação lipídica de ovos de poedeiras alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *D.salina*.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1. Produção de Microalgas

A denominação microalgas inclui organismos com dois tipos de estrutura celular: procariótica e eucariótica. Os procarióticos têm representantes nas divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta. Já os eucarióticos possuem representantes nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta (DERNER et al. 2006; FERREIRA et al., 2013).

Dentre as características que fazem das microalgas organismos de grande importância, destacam-se a diversidade de metabólitos que produzem e a capacidade de alterarem rapidamente seu metabolismo como resposta às mudanças das condições ambientais. Como consequência, podem se ajustar com facilidade através da aclimação bioquímica e fisiológica, ocasionando a produção de uma variedade de substâncias, muitas de alto valor comercial (MATA et al., 2010), como os ácidos graxos poliinsaturados, carotenoides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas e esteróis (LAMERS et al., 2002; TINOCO et al., 2015).

3.1.1. Cultivo de microalgas

O cultivo comercial de microalgas direcionado à produção de biomassa e obtenção de compostos bioativos teve início na década de 60, e os principais gêneros de microalgas cultivados desde então são *Chlorella* e *Spirulina* para indústria farmacêutica e alimentícia, as espécies *Dunaliella salina* para β -caroteno e *Haematococcus pluvialis* para astaxantina e várias outras destinadas à aquicultura (GUEDES; MACALTA, 2012).

Para o cultivo desses microrganismos, existem vários sistemas possíveis para obtenção de biomassa, que são escolhidos de acordo com fatores como fisiologia da microalga, custo de elaboração e execução do layout para cultivo, intensidade do trabalho, custo de energia, disponibilidade de água, custo de nutrientes, adequação de clima (quando necessário), e especificação do produto final. Sistemas de cultivo em larga escala

devem ser comparados com base em indicadores como a eficiência de utilização da luz, controle de temperatura, estresse hidrodinâmico permitido, capacidade de manter culturas unimicroalgais e/ou axênicas e viabilidade de aumento de escala (GUEDES; MACALTA, 2012).

Uma decisão importante a ser tomada é quando usar sistemas fechados (fotobiorreatores) ou abrir lagoas para cultivar uma microalga específica. Estas lagoas podem ocupar uma área grande e são relativamente baratas de construir e, fáceis de operar, mas a contaminação é difícil de controlar, as condições ambientais (particularmente a temperatura) são difíceis de manter, e a densidade celular máxima é relativamente baixa devido aos efeitos anteriores combinados. Por outro lado, numa exploração comercial, extensas áreas de terra serão necessárias, além de custos significativos para coleta da biomassa (SCOTT et al., 2010; AMARO et al., 2011). A escolha final do sistema é sempre uma melhor combinação entre esses parâmetros, visando alcançar um resultado economicamente viável (BOROWITZKA, 1999).

Segundo Soong (1980) e Belay (1997), uma característica comum da maioria das espécies de microalgas produzidas comercialmente, principalmente dos gêneros *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella*, é que elas crescem em ambientes altamente seletivos, o que significa que podem ser cultivadas ao céu aberto e ainda permanecerem relativamente livres de contaminação por outras microalgas e protozoários. Espécies de microalgas que não possuem a vantagem da seletividade devem ser cultivadas em sistemas fechados, isso inclui a maioria das algas marinhas cultivadas como fonte de alimentos para a aquicultura (por exemplo, *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis* e *Isochrysis*), bem como o dinoflagelado *Cryptocodinium cohnii* (BOROWITZKA, 1999).

Os sistemas típicos utilizados em ambientes fechados para a produção de biomassa de microalgas incluem garrafas (10 a 20 L), sacos de polietileno (100 a 500 L) e tanques (1000 a 5000 L). Para volumes maiores, são preferidos tanques ou lagoas ao céu aberto, onde as alterações necessárias para manutenção do cultivo são realizadas semestralmente (temperatura, pH, nutrientes). Dependendo da sua escala, incubadoras podem produzir entre várias centenas a dezenas de milhares de litros de biomassa de microalgas por dia (SETLÍK, 1970). No entanto, os sistemas de cultivo empregados, necessitam de sofisticação, por exemplo, a *D. salina* é cultivada em grandes lagoas ao céu aberto (Figura 1), pouco profundas (até cerca de 250 ha) sem mistura artificial (GUEDES; MACALTA, 2012).

Figura 1. Cultivo de microalga *Dunaliella salina* em tanques a céu aberto, Eliat – Israel.



Fonte: Adaptado de Tinoco et al. (2015).

As microalgas como a *Dunaliella salina*, também podem aparecer naturalmente em regiões de lagos salinos como observados em tanques destinados a cristalização de sal no litoral do Rio Grande do Norte (observação da autora; Figura 2).

No entanto, poucos estudos foram dedicados à avaliação quantitativa das populações de *D. salina* nesses ambientes, bem como a dinâmica do seu aparecimento, declínio, e sua contribuição para a produção primária em seus habitats. Post (1977) reportou que durante o inverno, houve um aumento no número de cistos de *D. salina*, especialmente na camada mais profunda do lago Great Salt Lake, Utah – Estados Unidos.

A partir de 1980, através do monitoramento da densidade populacional em diferentes estações e profundidades no Mar Morto, foi possível observar claramente os fatores que determinam o desenvolvimento desta microalga num ambiente tão peculiar (OREN, 2005). Baas-Becking (1931) já havia relatado que altas concentrações de íons de magnésio e cálcio inibem o crescimento da *D. salina*, portanto, sua proliferação, ocorre no Mar Morto somente quando, durante invernos úmidos, as camadas superiores da água do lago tornam-se suficientemente diluídas para permitir o crescimento destes

microrganismos, e quando o fosfato (nutriente limitante) está disponível (OREN et al., 1995).

Figura 2. Aparecimento da microalga *Dunaliella salina* em tanques salinos no litoral do Rio Grande do Norte.



Fonte: Autoria própria.

1.2.1.1 Tipos de cultivo

As microalgas crescem autotroficamente utilizando luz e dióxido de carbono, e também podem ser cultivadas em sistema heterotrófico, ou ainda em sistema de cultivo mixotrófico (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Nos cultivos autotróficos, há o emprego de luz como exclusiva fonte de energia, para a fixação do CO_2 e liberação de O_2 . Neste tipo de cultivo, problemas com contaminação são menores quando comparado com as demais condições de cultivo (PALUDO, 2012).

Nos cultivos heterotróficos, não há utilização de luz, mas há o emprego de compostos orgânicos como fonte de carbono para biossíntese e energia. As principais fontes de carbono orgânico assimiladas por algumas espécies de microalgas são: glicose, acetato, glicerol, frutose, lactose, galactose e manose. Esse tipo de cultivo promove um aumento na produção de biomassa, no entanto, por fazer uso de uma fonte de carbono

proveniente de açúcares, os meios heterotróficos apresentam frequentemente problemas de contaminação por outros microrganismos (CHEN et al., 2011). É pouco utilizado em cultivos industriais, o que provavelmente está associado ao número limitado de espécies de microalgas heterotróficas disponíveis, maior contaminação por bactérias, inibição do crescimento em substratos com baixas concentrações de compostos orgânicos e incapacidade de produzir alguns produtos induzidos pela presença de luz, como pigmentos (GARCÍA et al., 2005; PALUDO, 2012).

Por sua vez, o cultivo mixotrófico, utiliza, simultaneamente, uma fonte luminosa e um substrato orgânico como fonte de carbono (DERNER, 2006), e apresenta uma excelente alternativa para produção de biomassa, quando comparado ao cultivo autotrófico. As taxas de crescimento e o aumento da concentração de biomassa aparentemente estão associados ao efeito sinérgico da luz e do substrato orgânico. Adicionalmente, os cultivos mixotróficos apresentam elevada produção de clorofilas, carotenoides e ácidos graxos, quando comparados aos cultivos autotróficos. Neste tipo de cultivo, ainda, ocorre uma menor perda de biomassa durante a fase escura, decorrência da adição do substrato orgânico ao meio de cultivo (BRENNAN; OWENDE, 2010; PALUDO, 2012).

3.1.2. Meios de cultivo

As microalgas podem ser cultivadas em meios de cultivo marinho, água doce e salobra. Os meios de cultivo são compostos por vitaminas e nutrientes, compostos por macroatômos (carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, silicato, enxofre e potássio) e microatômos (ferro, manganês, cobre, molibdênio, cobalto, zinco, entre outros) (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

Segundo Soares (2010) a composição dos meios de cultivo varia de acordo com a espécie. Não existe um único meio de cultivo viável para o crescimento de todas as espécies de microalgas, pois certas microalgas possuem necessidades específicas.

Para a produção de biomassa, os meios de cultivo são classificados como semidefinidos e definidos quanto à composição química. Os meios de cultivo semidefinidos são preparados com água do mar natural suplementada com nutrientes e vitaminas. Os meios de cultivo definidos são preparados a partir de água, deionizada ou destilada, suplementada com nutrientes, vitaminas e sais inorgânicos, a fim de simular a

composição da água do mar. Um exemplo de meio de cultivo definido amplamente utilizado é o meio Conway (LOURENÇO, 2006).

Atualmente, os meios de cultivo semidefinidos são os mais utilizados para a produção de microalgas marinhas em escala comercial, principalmente quando o sistema localiza-se próximo ao mar. Por exemplo, a BASF - *The chemical Company* - produz *Dunaliella salina* em tanques salinos (Figura 3) nos lagos Hutt e Whyalla, na região oeste e sul da Austrália, respectivamente.

Figura 3. Tanques salinos destinados à produção de *Dunaliella salina* nos lagos australianos Hutt e Whyalla.



Fonte: BASF – *The Chemical Company*.

3.1.3. Meio Conway

O meio Conway (Walne, 1966) é formado por quatro soluções denominadas de solução principal, solução de metais traços, solução de vitaminas e solução de silicato (Tabela 1), sendo a solução de silicato apenas utilizadas para espécies de diatomáceas, pois é usado especificamente para o crescimento destas microalgas que utilizam este composto para a formação de uma carapaça externa, chamada de frústula (SOARES, 2010).

Tabela 1. Soluções e modo de preparo do meio de cultivo Conway.

SOLUÇÃO PRINCIPAL	
(Modo de preparo: Diluir os componentes em 1L de água destilada)	
Reagente	Quantidade (g/L)
$C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	45,00
H_3BO_3	33,60
$NaNO_3$	100
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,36
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1,3
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	20
SOLUÇÃO DE METAIS TRAÇOS	
(Modo de preparo: Diluir os componentes em 10 mL de água destilada. Retirar 1 mL da solução e acrescentar à solução principal e descartar o restante da solução)	
$ZnCl_2$	0,21
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,2
$(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,09
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,2
SOLUÇÃO DE VITAMINAS	
(Modo de preparo: Diluir as vitaminas em 100 mL de água destilada e adicioná-la a solução principal)	
Cobalamina	0,005
Tiamina	0,1
SOLUÇÃO DE SILICATO	
(Modo de preparo: Diluir o silicato em 100 mL de água destilada e esterilizar a 121°C por 15 min)	
$Na_2OSiO_2 \cdot nH_2O$	4

Fonte: Walne (1966).

É importante destacar que de acordo com a divisão pertencente da microalga, quantidades diferentes das soluções podem ser adicionadas ao meio de cultivo. Havendo ainda a possibilidade de acrescentar uma fonte de carbono derivada de açúcares para cultivos mixotróficos (PALUDO, 2012).

3.1.4. Regimes de cultivo

Os regimes de cultivo aplicados na produção de microalgas variam de acordo com a forma de operação do sistema. Os três tipos básicos de operação de sistemas de cultivos de microalgas são: “batch” ou descontínuo, semicontínuo e contínuo (SOARES, 2010).

Nos cultivos “batch” (descontínuo, batelada ou estanque) as células de microalgas são inoculadas ao meio de cultivo e após inoculação não ocorre adição de nutrientes ao longo do desenvolvimento da cultura. O cultivo é encerrado quando os nutrientes da cultura se esgotam ou quando o produto desejado for produzido. Este tipo de cultivo é

caracterizado por apresentar fases distintas de crescimento. A duração de cada fase depende basicamente de fatores como a espécie cultivada e as condições de cultivo oferecidas (COUTTEAU, 1996; SOARES, 2010).

No cultivo semicontínuo, um volume conhecido de cultura microalgal é removido, periodicamente, e substituído por meio de cultivo novo. Neste tipo de cultivo, a composição química das células tende a sofrer poucas alterações ao longo do tempo (pois elas permanecem em condições de crescimento sem fatores limitantes), ao contrário do que acontece em cultivos “batch”. A repetição das diluições em dias consecutivos permite remover grande biomassa de alga diariamente. Teoricamente este processo pode ser operado indefinidamente, porém a manipulação frequente da cultura, ocasionada pelas diluições sucessivas, pode acarretar problemas de contaminação. Sendo assim, na prática, os cultivos semicontínuos devem ser reiniciados periodicamente (SOARES, 2010).

No cultivo contínuo, um fluxo constante de cultura microalgal é removido do biorreator simultaneamente com a entrada de meio de cultivo fresco. As taxas de crescimento são reguladas e a densidade celular é controlada automaticamente por sensores óticos. A concentração de células e nutrientes é mantida constante e o cultivo atinge estado estacionário. O cultivo pode permanecer em estado estacionário por um período prolongado, conseqüentemente, são produzidas grandes quantidades de células de alta qualidade e homogeneidade. No entanto, o cultivo contínuo tem um custo elevado devido à necessidade de automação e condições de temperatura e iluminação constantes (MATA et al., 2010).

3.1.5. Nutrientes necessários ao cultivo

Um dos fundamentos essenciais para o cultivo de microalgas é o que se refere ao conhecimento dos nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Desta forma, com o objetivo de minimizar os custos de produção da biomassa microalgal e/ou seus bioprodutos, muitos estudos estão sendo realizados utilizando fontes alternativas de nutrientes como glicose, melação (ANDRADE; COSTA, 2008) e glicerol (GARCÍA et al., 2005; PALUDO, 2012).

Dessa forma, será descrito abaixo alguns dos principais macronutrientes requeridos para o crescimento das microalgas.

▪ CARBONO

É considerado o macroelemento mais importante nos cultivos, uma vez que constitui cerca de 50% da biomassa, podendo atuar como fator limitante no crescimento microalgal (DERNER, 2006). Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui o componente mais importante de todas as substâncias sintetizadas pelas células (LOURENÇO, 2006). A fonte de carbono mais utilizada pelas microalgas é o dióxido de carbono (CO_2), provavelmente por ter uma rápida difusão da água para o interior das células. O dióxido de carbono contribui no crescimento fotossintético e autotrófico das microalgas, tanto que em alguns cultivos se faz necessário à adição de CO_2 (BORGHETTI, 2009), o qual pode ser proveniente do ar atmosférico injetado na forma de bolhas ou através de cilindros pressurizados contendo este gás (DERNER, 2006). Assim, o emprego de fontes de carbono alternativas, como o melaço de cana, utilizadas nos cultivos mixotróficos, surge como uma solução na redução dos custos dos meios de cultivo (ANDRADE; COSTA, 2007).

▪ NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos principais macroelementos para o desenvolvimento microalgal, constituindo as proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. Desta forma, quando o suprimento de nitrogênio é abundante, verifica-se a tendência do aumento nas concentrações de proteínas e clorofila nas células. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio são baixas, verifica-se uma diminuição marcante da taxa de divisão celular, além da redução das concentrações de proteínas e clorofila. Assim, o nitrogênio é um dos elementos limitantes ao desenvolvimento de produtores primários fotossintetizantes no mar (LOURENÇO, 2006). Em cultivos artificiais, os sais de nitrato, de amônio e de ureia são as fontes mais empregadas (PALUDO, 2012).

▪ FÓSFORO

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento de microalgas, uma vez que participa de todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células, síntese de ácidos nucléicos e reações associadas à divisão celular. Assim, ao lado do nitrogênio, o fósforo também é considerado um dos principais fatores limitantes no desenvolvimento microalgal. Em cultivos, o fósforo tende a ser adicionado aos meios de cultivo em altas concentrações, como fosfatos ou com pentóxido de fósforo (P_2O_5). Em alguns meios, o

fosfato é adicionado como glicerofosfato de sódio, que é menos susceptível à precipitação em presença de metais traços (LOURENÇO, 2006).

▪ **SILÍCIO**

Apenas as microalgas pertencentes à classe das diatomáceas e silicoflagelados necessitam de silício em altas concentrações, pois este é um componente estrutural fundamental de revestimento externo. Em situações de limitação, verifica-se uma diminuição da espessura da parede celular dessas microalgas. Nos meios de cultivo, o silício geralmente é adicionado na forma de sais de silicato de sódio hidratado (LOURENÇO, 2006; BARROS, 2010; PALUDO, 2012).

3.1.6. Fatores limitantes ao cultivo de microalgas

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como a possível influência de organismos contaminantes. Quanto aos fatores físico-químicos que afetam o crescimento das microalgas, são principalmente reportados estudos sobre luminosidade, temperatura, pH e salinidade (OHSE et al., 2008; PALUDO, 2012).

▪ **LUMINOSIDADE**

A influência da luz no desenvolvimento das microalgas está relacionada ao fotoperíodo (tempo de exposição à luz), intensidade, qualidade (comprimento de onda) e tipo de luz (cor). O fato da luz variar tanto no espaço (profundidade e latitude) quanto no tempo (diariamente e sazonalmente), também é um fator limitante ao seu crescimento (DARLEY, 1982; DUBINSKY, 1990; BARROS, 2010). A qualidade do espectro luminoso e a irradiação também podem causar efeitos diferenciados no crescimento celular, em especial, na composição bioquímica, principalmente quanto ao teor de proteínas, polissacarídeos e clorofila (RIVKIN, 1989).

Os cultivos microalgais podem ser iluminados artificialmente por lâmpadas fluorescentes, luz natural ou uma combinação de diferentes fontes de luz (CHEN et al., 2011). Níveis extremos de luminosidade no cultivo de microalgas podem conduzir a dois

processos desfavoráveis, a fotoinibição e a fotolimitação (BEZERRA, 2006; PALUDO, 2012).

A fotoinibição ocorre quando o fluxo de fótons absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Esses elétrons de alta energia reagem com a água, formando peróxido de hidrogênio, tóxico às células. Já a fotolimitação ou sombreamento ocorre devido ao aumento da concentração de biomassa, diminuindo a profundidade de penetração da luz no cultivo. Desta forma, os microrganismos localizados na superfície são altamente iluminados, e os localizados em profundidades maiores não recebem energia luminosa suficiente para garantir uma boa condição fotossintética (BEZERRA, 2006; PALUDO, 2012)

▪ **TEMPERATURA**

A temperatura é o fator restritivo mais importante, depois da luz, para o cultivo de microalgas, exercendo forte influência sobre as reações metabólicas e conseqüentemente sobre a taxa de crescimento. Os efeitos da temperatura em muitas espécies de microalgas em laboratório são bem documentados, mas a magnitude de efeitos de temperatura na produção de biomassa anual ao ar livre ainda não é suficientemente conhecida (BARROS et al., 2010). De maneira geral, a maioria das microalgas apresenta crescimento em temperaturas que variam de 15-25°C (KARAM; SOCCOL, 2007). A atividade fotossintética diminui com a queda na temperatura, sendo que acima de 35°C a concentração de proteínas e especificamente de pigmentos fotossintéticos proteicos decresce e ocorre um aumento nas concentrações de carboidratos e lipídeos (TOMASELLI et al., 1993).

Muitas microalgas podem tolerar facilmente temperaturas de 8 a 15 °C mais baixo do que a sua temperatura ótima de crescimento, mas temperaturas elevadas, aproximadamente 4° C acima do ponto ótimo de crescimento pode resultar na perda total da cultura (MATA et al., 2010; BARROS et al., 2010).

▪ **pH**

O pH do meio é um dos fatores mais importantes no cultivo de microalgas, determinando a solubilidade do dióxido de carbono e minerais, influenciando, assim, no metabolismo das microalgas. O pH ainda depende de fatores como: composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido,

temperatura e atividade metabólica das células (KARAM; SOCCOL, 2007). Os valores podem variar em decorrência de diversas proporções de gás carbônico, carbonato e bicarbonato dissolvido no meio de cultivo (BEZERRA, 2006). Segundo Lourenço (2006), o pH afeta diretamente os componentes do meio, e conseqüentemente determina a disponibilidade de vários elementos químicos para a cultura.

▪ SALINIDADE

Esse fator pode afetar o crescimento e a composição da célula de microalgas, seja em sistemas abertos ou fechados. Cada alga tem uma concentração de salinidade ótima. Em cultivos abertos esta concentração pode variar de acordo com as condições do tempo, estando mais concentrado em dias quentes devido à evaporação (MATA et al., 2010).

Essa variação na salinidade, normalmente prejudica o crescimento da biomassa em virtude do estresse osmótico e iônico e das modificações nas proporções iônicas celulares devido à permeabilidade seletiva da membrana aos íons (BRAND 1984; GLASS, 1983). No entanto, em espécies como a *Dunaliella salina*, altas salinidades podem desencadear a produção de metabólitos antioxidantes numa tentativa de adaptação desses microrganismos ao meio (TINOCO et al., 2015).

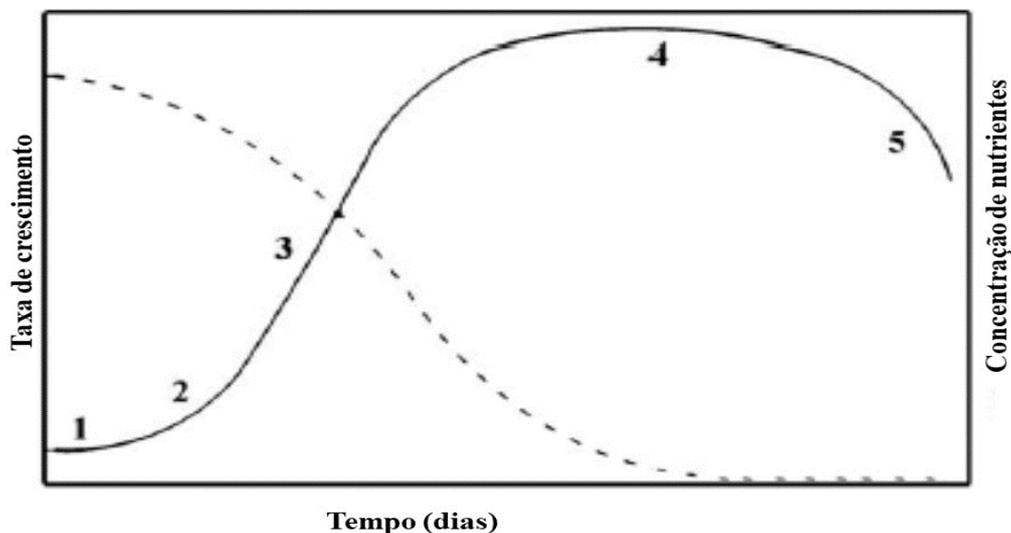
3.2. Curva de crescimento

A análise da curva de crescimento é o método mais empregado para avaliação do crescimento populacional de microalgas em cultivo, sendo expressa pela relação entre o número de organismos num determinado volume (densidade celular) pelo tempo (dias) (DERNER et al., 2006).

Esta curva pode apresentar até cinco fases distintas (Figura 4), eis elas: (1) Fase de Indução, ocorre logo após a inoculação da célula, sendo um período de adaptação onde não existe incremento populacional, podendo ocorrer redução na densidade celular, e ainda, não acontecer ou ocorrer muito rapidamente; (2) Fase Exponencial, expressada pelo crescimento logarítmico, nesta fase a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos de tempo regulares e a velocidade de crescimento alcança seu ritmo máximo; (3) Fase de Diminuição do Crescimento Relativo, onde acontece uma redução na taxa de crescimento celular, aumentando o tempo de duplicação; (4) Fase Estacionária, observada pela constância da densidade celular, a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade, ela pode ser caracterizada por pequenos acréscimos e decréscimos na

população microalgal, mas ao ajustar a curva (regressão logística) esta fase é representada graficamente por uma reta; (5) Fase de Morte da Cultura, que acontece devido ao esgotamento dos nutrientes, impossibilitando o crescimento (DERNER, 1995, 2004; DERNER et al., 2006; BARROS, 2010; MATA et al., 2010).

Figura 4. Curva de crescimento de microalgas em sistema fechado descontínuo. 1-Fase de indução, 2- Fase exponencial, 3- Fase de diminuição do crescimento relativo, 4-Fase estacionária, 5- Fase de morte da cultura. Linha sólida representa a curva de crescimento em sistema de cultivo fechado descontínuo. Linha pontilhada representa a concentração de nutrientes em sistema de cultivo fechado descontínuo.



Fonte: Adaptado de Mata et al. (2010).

Segundo Chisti (2007), em condições climáticas e concentração de nutrientes adequadas, as microalgas podem crescer consideravelmente, e geralmente, dobram sua biomassa em 24h (ou até menos), sendo que durante a fase de crescimento exponencial elas podem atingir um ciclo de vida dentro de 2 a 4h.

Outras medidas de crescimento são a densidade celular máxima, que é o maior valor obtido em número de células por mililitro, e a velocidade de crescimento, que representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (OLIVEIRA, 1993). Por sua vez, o tempo de cultivo é definido como o período transcorrido entre o início do cultivo e o momento no qual a cultura alcançou a densidade celular máxima, ou que a biomassa apresentou o maior conteúdo de um determinado composto de interesse no menor espaço de tempo possível. Esse último parâmetro de

avaliação do crescimento é considerado muito importante para cultivos em grande escala, uma vez que o tempo é decisivo para a escolha de uma determinada espécie, do seu processo de produção e da infraestrutura necessária para o seu cultivo (BROWN et al., 1997; TREDICI, 2004; BARROS, 2010).

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (MOHEIMANI, 2005; BARROS, 2010). As respostas das células a essas condições ambientais definem esses fatores como limitantes ou otimizantes. Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas da espécie cultivada, a possível influência de outros organismos sobre o seu desenvolvimento e a idade do inóculo (PELIZER et al., 2003). Quanto aos fatores físico-químicos os mais observados são a luz (DARLEY, 1982), a temperatura (COLLA et al., 2007), a quantidade e o tipo de aeração (CONVERTI et al., 2006; ONCEL; SUKAN, 2008), a disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975), a salinidade (LOURENÇO; MARQUES JUNIOR, 2002) e o pH (LOURENÇO, 2006). Todos esses fatores podem influenciar no valor nutricional das microalgas, incluindo a sua forma e tamanho, digestibilidade (relacionada à estrutura e composição da parede celular), composição bioquímica (nutrientes, enzimas, toxinas se presentes) e os requerimentos dos organismos alvo da alimentação (BARROS, 2010).

3.3. Microalga *Dunaliella salina*

Pertencentes ao filo Chlorophyta, as espécies do gênero *Dunaliella* são eucarióticas, fotossintéticas, unicelulares, biflageladas e com flagelos do tamanho aproximado ao de sua célula. Sua reprodução pode ocorrer por divisão longitudinal de uma célula móvel ou por fusão de duas células móveis para formar um zigoto (Figura 5).

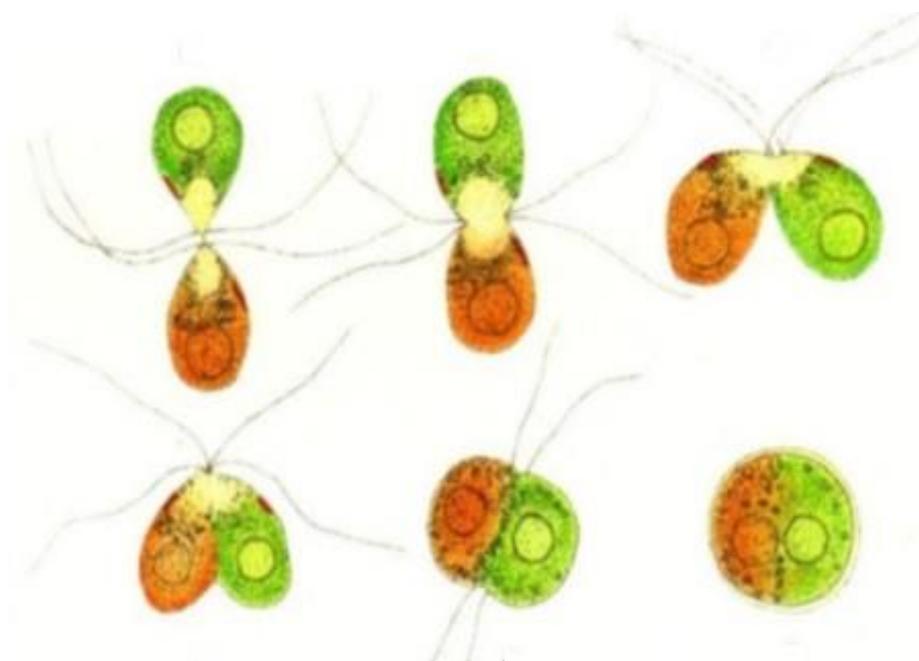
Como são capazes de crescer em meios com ampla faixa de concentração salina, de 0 a 19% de saturação, e em condições extremas de temperatura, entre 5° a 40°C, os habitats naturais de *Dunaliella* incluem oceanos, lagos de água salgada e salinas. Assim, são responsáveis pela maior parte da produção primária (ou formação de substâncias orgânicas ricas em energia a partir de material inorgânico) em ambientes hipersalinos de todo o mundo (OREN 2005; TINOCO et al., 2015).

Uma tendência observada é que a salinidade real dos ambientes a partir dos quais as espécies do gênero *Dunaliella* são isoladas sempre são muito maiores do que a concentração salina ideal observada em experimentos laboratoriais. O que provavelmente

está relacionado ao fato que, embora o crescimento de um organismo ocorra em um determinado ambiente não necessariamente significa que esse ambiente é ideal para o seu desenvolvimento, mas sim que o organismo atua melhor do que todos os seus concorrentes (OREN, 2005).

As espécies mais relatadas deste gênero são aquelas capazes de acumular grandes concentrações de β -caroteno nos cloroplastos, principalmente *D. bardawil* e *D. salina*.

Figura 5. Ilustração da junção de uma célula móvel verde e outra vermelha da microalga *Dunaliella salina* para formação de um zigoto.



Fonte: Adaptada de OREN (2005).

Dunaliella salina, é uma microalga marinha que em condições favoráveis ao seu crescimento, apresenta-se verde e biflagelada, pois possui apenas os pigmentos necessários para a fotossíntese e em concentrações não muito elevadas. No entanto, em condições ambientais extremas, como limitação de nutrientes, baixa temperatura, alta luminosidade, alta salinidade, é desencadeada a produção de espécies reativas de oxigênio e suas células sofrem alterações morfológicas e bioquímicas como estratégias de sobrevivência (BEN-AMOTZ; AVRON, 1983; GÓMEZ; GONZÁLEZ, 2005).

É nesse momento que a célula passa a produzir componentes antioxidantes como os carotenoides, polifenóis, flavonoides, tocoferóis, ácido ascórbico, glutatona, aminoácidos e enzimas antioxidativas (McCORD; FRIDOVICH 1969; SHAISH et al.,

1993; KOBAYASHI et al., 1997; JEFFREY et al., 1999; SAHA et al., 2003; OREN; GUNDE-CIMERMAN, 2007; WANG et al., 2011; SAHA et al., 2013).

As células de *D. salina* não possuem uma parede celular rígida, sendo envolta apenas por uma fina membrana plasmática elástica, desprovida de celulose. Assim, a morfologia das células é fortemente influenciada por mudanças osmóticas (OREN, 2005). Através do mecanismo de osmorregulação, os choques hiperosmóticos desencadeiam a produção de glicerol e carotenoides (Figura 6), enquanto em situações de choque hipoosmótico (Figura 7), o glicerol presente na célula é eliminado (BEN-AMOTZ; AVRON, 1983; TINOCO et al., 2015).

Figura 6. Fotomicrografia de células vermelhas da microalga *Dunaliella salina* em meio hiperosmótico (natural salino), coletadas em tanques salinos na região de Porto do Mangue -RN. Aumento de 40x.



Fonte: Autoria própria.

Figura 7. Fotomicrografia da célula da microalga *Dunaliella salina* em meio hiposmótico (adição de água destilada ao meio natural salino), após coleta em tanques salinos na região de Porto do Mangue-RN. Aumento de 40x.



Fonte: Autoria própria.

3.3.1. Biossíntese de carotenoides na *D. salina*

Os carotenoides podem ser sintetizados naturalmente por microrganismos fotossintéticos (incluindo plantas, algas e cianobactérias), e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos, e a esse processo denomina-se carotenogênese (BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006). A carotenogênese na microalga *D. salina* pode sofrer influência de diversos fatores a composição do meio de cultivo, a fonte de carbono e nitrogênio, presença de metais e sais e agentes químicos, além das condições ambientais como a luminosidade, agitação, aeração e pH (VALDUGA et al., 2009).

Além das clorofilas a e b, a microalga *D. salina* contém valiosos carotenoides tais como β -caroteno, α -caroteno, criptoxantina, violaxantina, zeaxantina e luteína (TAFRESHI et al., 2009). O β -caroteno, é carotenoide mais sintetizado pela *D. salina*,

sendo algumas cepas capazes de acumular grandes quantidades desse composto, sendo reportado concentrações de até 13,8%, com base na matéria seca (OREN, 2005). Nesse contexto, a *D. salina* é largamente usada para a produção de antioxidantes e corantes provenientes do β -caroteno. Os produtos mais comuns incluem o β -caroteno concentrado, a biomassa da microalga para alimentação humana e animal, os suplementos alimentares, devido ao elevado teor de proteínas e antioxidantes, bem como o concentrado proteico, para inclusão em alimentos industrializados (BECKER, 2007).

Segundo Yeum e Russel (2002), o β -caroteno extraído da *D. salina* é adicionado a rações de animais de estimação e de interesse zootécnico, podendo prover pigmentação a pele de frangos, gema do ovo, peixes e crustáceos. Estes autores afirmam ainda, que o β -caroteno de origem microalgal é mais viável do que o sintético, por ser a combinação dos isômeros cis e trans, o que confere uma maior biodisponibilidade deste antioxidante para o animal.

3.4. Carotenoides

Carotenoides são isoprenoides lipofílicos sintetizados por todos os microrganismos fotossintéticos, e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. Duas classes de carotenoides são encontradas na natureza: os carotenos, tais como β -caroteno, e as xantofilas como a luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina (VALDUGA et al., 2009). Os carotenos, formados exclusivamente por hidrocarbonos, são precursores de vitamina A. Já as xantofilas são substâncias derivadas dos carotenos e possuem átomos de oxigênio em suas moléculas (CARNEIRO, 2013). Dos mais de 750 carotenoides conhecidos (BRITTON et al., 2004), apenas 50 são precursores de vitamina A. Destes, o β -caroteno é o mais abundante nos alimentos e o que apresenta maior capacidade de síntese dessa vitamina (AMBRÓSIO et al., 2006).

Devido à vasta distribuição, diversidade estrutural e inúmeras funções, como potencializadores da resposta imune e ação antioxidante, os carotenoides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentantes naturais (MELENDEZ-MARTINEZ et al., 2004; AMBROSIO et al., 2006). São responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelho, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração. No entanto, somente os carotenoides que possuem grupos funcionais e oxigênio na molécula têm capacidade pigmentante (MÍNGUEZ-MORQUERA et al., 2002). Para que a cor amarela apareça são necessárias, no mínimo, sete duplas ligações conjugadas. À medida

que o número de ligações aumenta mais avermelhado os carotenoides se tornam. Aqueles com menos de sete ligações são incolores (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004; CARNEIRO, 2013).

Além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos (VALDUGA et al., 2009), os carotenoides são compostos bioativos, não nutrientes, encontrados em frutas, vegetais, grãos e outras plantas comestíveis, ligados a uma redução no risco da maioria das doenças crônicas (LIU, 2008). A importância desses compostos no aumento da expectativa de vida deve ser ressaltada, uma vez que podem também ser considerados nutracêuticos, ou seja, alimentos ou parte de um alimento que proporcionam benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças (HUNGENHOLTZ; SMID, 2002).

Os carotenoides são, assim, compostos de grande importância dietética, não só como precursores de vitamina A, mas também como moléculas que fazem parte de proteção da célula e atração do consumidor, pois conferem cor aos alimentos, que é a primeira característica perceptível de consumo de um alimento, conferindo expectativas de qualidade e sabor (MAYER, 2014). Consequentemente, o conteúdo e a composição de carotenoides são importantes fatores na avaliação nutricional de frutas, verduras e alimentos em geral (MÍNGUEZ-MOSQUEIRA et al., 2002). Apesar do reconhecimento do papel benéfico dos carotenoides na saúde animal e humana, os mesmos não são considerados como nutrientes essenciais, dessa forma, as recomendações de ingestão diária desses compostos não são conhecidas (RAO; RAO, 2007).

Além de serem eficientes corantes, os carotenoides ainda possuem ação antioxidante. Como a geração de radicais livres no organismo constitui uma ação fisiológica contínua, quando a produção é elevada, eles se acumulam causando o chamado “estresse oxidativo” que pode lesar as células se esse acúmulo for mantido no organismo por período prolongado (CARNEIRO, 2013). Eles podem induzir o desenvolvimento de várias doenças, como cardiopatias, catarata, artrite reumatoide, Alzheimer, diabetes entre outras (SHAMI, 2004). Para se defender dos radicais livres, o organismo utiliza os antioxidantes endógenos como a enzima superóxido dismutase, ou os exógenos, como os carotenoides obtidos através da alimentação (MACHADO et al., 2006; LIMA et al., 2012; CARNEIRO, 2013).

3.4.1. Carotenoides na alimentação de poedeiras

Experimentos comprovam a capacidade antioxidante dos carotenoides, como o realizado por Fontana et al. (2000) que observaram a capacidade de combater radicais livres da astaxantina, conferindo propriedades antioxidantes aos ovos de aves alimentadas com ração contendo esse carotenoide. Spada et al. (2012), verificando a qualidade de ovos armazenados, por meio da preservação da viscosidade do albúmen, observaram que o albúmen dos ovos das galinhas que receberam ração com 1,5% ou 2% de urucum *in natura* tiveram a viscosidade preservada por mais tempo do que os provenientes de ovos de galinha que receberam ração sem o carotenoide.

A importância fundamental dos carotenoides na nutrição de aves reside no fato de serem estas substâncias os principais grupos de compostos responsáveis pela coloração da gema do ovo e da pele do frango, podendo essa coloração ser influenciada pela dieta ofertada aos animais (CARVALHO et al., 2006). A coloração da gema do ovo se deve à deposição de carotenoides xantofílicos ou carotenos (como o β -caroteno) que podem ser encontrados de forma natural em alimentos como milho, urucum, cenoura, entre outros, ou provir de substâncias sintéticas. O grau de pigmentação obtido depende da concentração desses compostos no alimento, da composição da ração e, ainda, das condições de saúde da ave (GARCIA et al., 2002).

Nesse contexto, a dieta de poedeiras é constituída principalmente do binômio milho e soja, e o aporte de milho contribui para a produção de ovos com gema pigmentada (CHEEKE, 2004) devido à grande quantidade de xantofilas luteína e zeaxantina presente nesse cereal. Entretanto, se os processos de colheita, moagem ou armazenamento desses grãos forem inadequados, a qualidade e a quantidade desses pigmentos a serem absorvidos e depositados nos tecidos, especialmente na gema do ovo, serão prejudicados (CARNEIRO, 2013). Quando se utiliza alguma fonte alternativa ao milho como sorgo, milheto, quirera de arroz ou trigo, que são pobres em carotenoides (CHEEKE, 2004; OLIVEIRA et al., 2007), faz-se necessário a adição de algum pigmentante à ração (ASSUENA et al., 2008; GARCIA et al., 2009; CARNEIRO, 2013).

A escolha do pigmentante utilizado deve ser cuidadosa, pois a inclusão de qualquer aditivo à dieta não deve alterar negativamente as características organolépticas dos ovos, como odor e sabor (CARVALHO et al., 2005). O sabor, mais que a cor, é importante na decisão do consumidor para a aquisição de um produto. Nesse sentido, é

importante ressaltar que as características sensoriais do ovo *in natura* sofrem influência da composição da ração ingerida (ORMENESE et al., 2004; CARNEIRO, 2013).

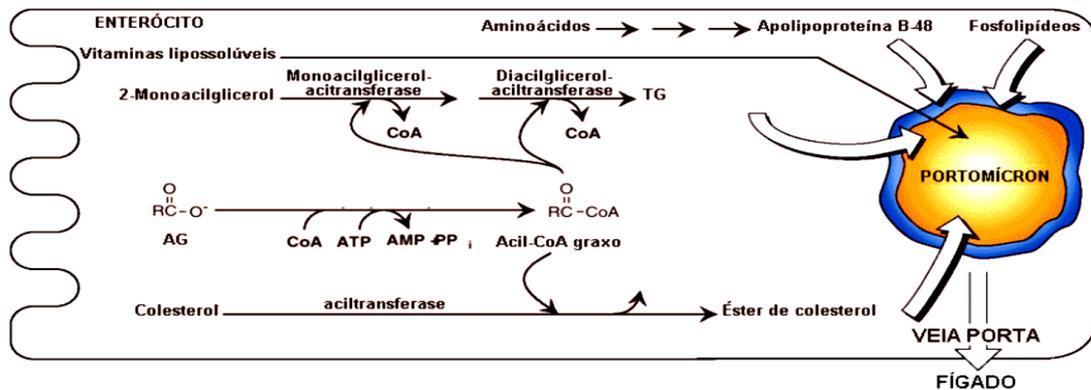
Segundo Garcia et al. (2002) e Carneiro (2006), os carotenoides utilizados como aditivos na ração de poedeiras são classificados em sintético amarelo e vermelho e, natural amarelo-avermelhado e vermelho. O sintético amarelo é um produto metabólico, cuja forma comercial é o etil-ester-beta-apo-8-caroteno (apocaroteno). O sintético vermelho, a cantaxantina, embora exista na natureza, aquela utilizada na ração é sintetizada pela indústria, sendo por isto classificada como corante sintético. O natural amarelo-avermelhado, a capsantina, é obtida do pimentão e o vermelho, a bixina, é obtida do urucum (GARCIA et al., 2002). Outros carotenoides naturais de origem microalgais como β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina, criptoxantina também podem conferir coloração que varia do amarelo ao laranja-avermelhado e serem utilizados como aditivos às dietas de poedeiras (CARVALHO et al., 2006).

3.4.2. Transporte de carotenoides para a gema do ovo

O transporte de compostos lipídicos, dentre eles os carotenoides, são realizados por lipoproteínas plasmáticas, que são complexos macromoleculares esféricos de lipídios e proteínas específicas, apolipoproteínas ou apoproteínas, cuja função é manter os lipídios em solução durante o seu transporte entre os tecidos (STRYER, 1996). As principais lipoproteínas das aves são: portomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Os portomícrons, responsáveis por transportar os lipídios dietéticos do intestino delgado, receberam esta denominação porque, como as aves não possuem o sistema linfático bem desenvolvido, estes passam através da veia porta (Figura 8) e são entregues diretamente ao fígado antes de entrarem no plasma (TARUGI et al., 1990; ROCHA, 2011).

Figura 8. Formação do portomícron no enterócito de poedeiras. Após a absorção no enterócito, os lipídios migram para o retículo endoplasmático para a biossíntese de lipídios complexos, por serem bastante hidrofóbicos, necessitam portanto, serem embalados em portomícrons que são liberados pelos enterócitos na veia porta e seguem para o fígado.



Fonte: Adaptado de Champe et al. (2006) e Rocha (2011).

Durante a fase de postura, são encontradas lipoproteínas de muito baixa densidade modificadas no plasma das galinhas, conhecidas como VLDLg. Esta VLDLg é produzida por ação do estrógeno e é diferente da VLDL encontrada no plasma de frangas e de galos (GORNALL; KUKSIS, 1973; GRIFFIN et al., 1982).

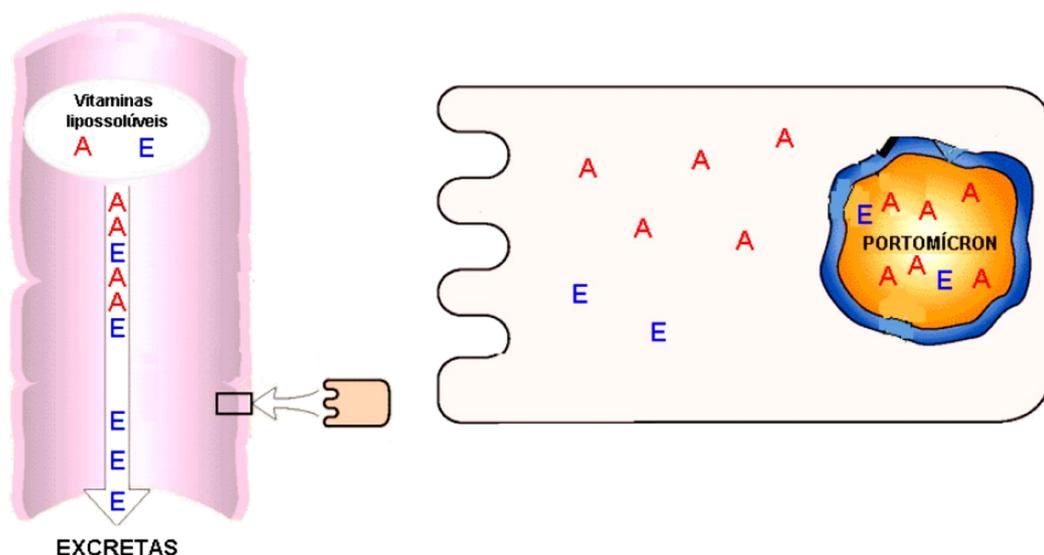
Os carotenoides ingeridos através das dietas das poedeiras, são absorvidos pelos enterócitos no intestino delgado onde migram para o retículo endoplasmático (do enterócito) para a biossíntese de lipídios complexos. Os carotenoides são bastante hidrofóbicos, necessitando, portanto, serem envolvidos em portomícrons que são liberados pelos enterócitos na veia porta e seguem para o fígado. Uma vez no fígado, os hepatócitos secretam lipoproteínas modificadas para deposição na gema (VLDLg) que farão o transporte desses carotenoides à gema do ovo (CHAMPE et al., 2006).

Nesse contexto, Carvalho et al. (2006) relataram que os carotenoides são depositados na gema do ovo em proporção direta à sua concentração na dieta, sendo que alguns podem ser depositados em outros tecidos ou não absorvidos. Segundo Leeson e Summers (2001), a conversão estimada de β -caroteno em vitamina A em poedeiras é de 3 a 4 moles de β -caroteno para 1 μg de vitamina A. Ben-Amotz et al. (1986) verificaram que a adição de um grama da alga *Dunaliella bardawil* por quilo de dieta de pintos correspondia a um suprimento de aproximadamente 30 mg de β -caroteno/kg.

Menos de 10% dos carotenoides pró-vitâmicos podem ser convertidos em vitamina A, sendo que nas aves somente o α , β -carotenos e a criptoxantina, presentes nos alimentos naturais, são capazes de contribuir com o suprimento desta vitamina. Uma porção dos carotenoides com atividade pró-vitâminica é convertida em vitamina A na mucosa intestinal e uma pequena parte escapa à conversão e entra na corrente sanguínea para ser depositada na gema de ovos e ou na pele de poedeiras (SURAI et al. 2001; ROCHA et al., 2013).

Relatos na literatura demonstram que há um antagonismo entre os carotenoides precursores da vitamina A e a vitamina E (Figura 9). Combs Jr. (1976) demonstrou que esses carotenoides, ou a própria vitamina A, quando presente em excesso em dietas para poedeiras reduzem a quantidade de vitamina E transportada à gema do ovo. Esse antagonismo reduz a absorção da vitamina E ainda no intestino delgado e aumenta sua excreção. Por sua vez, os carotenoides não precursores de vitamina A não competem com a vitamina E pela absorção no enterócito e, alguns autores ressaltam a sinergia que ocorre entre estes compostos (SURAI et al., 2001; SURAI; SPARKS, 2001; ROCHA, 2011).

Figura 9. Relação de antagonismo entre as vitaminas A e E pela absorção no intestino delgado.



Fonte: Adaptado de Champe et al. (2006) e Rocha (2011).

Uma correlação entre os teores de vitamina A, E, carotenoides e ácido ascórbico nos tecidos da galinha e do embrião, e também na gema dos ovos, foram reportadas por Surai et al. (1998) ao fornecerem rações suplementadas com 0, 3, 30 e 120 mg/kg de

vitamina A na forma de acetato de retinol às poedeiras. Tais autores observaram ainda que, os maiores níveis de vitamina A na ração reduziram significativamente tanto as concentrações de vitamina E, e carotenoides na gema do ovo como as concentrações desses e de ácido ascórbico no fígado das galinhas e do embrião. Esta redução acarretou aumento na susceptibilidade do fígado do embrião à peroxidação lipídica espontânea, ou seja, o excesso de vitamina A na dieta da matriz está associado à redução da eficiência do sistema antioxidante do fígado do embrião em desenvolvimento e do pinto de um dia.

Uma correlação negativa entre a suplementação de vitamina A na dieta de galinhas sobre a concentração de alfa-tocoferol na gema dos ovos também foram observadas por Grobas et al. (2002), que atribuíram esse resultado ao antagonismo existente entre essas vitaminas durante a sua absorção nos enterócitos.

Por sua vez, Carneiro (2013) não observou alteração da função hepática e renal ao suplementar a dieta de poedeiras com farelo de urucum (carotenoide natural) na concentração de 3% e a mistura de carotenoides sintéticos (8mg/g de cantaxantina + 25mg/g de apocaroteno). Tal resultado ratifica as afirmações anteriores, demonstrando que a adição de carotenoides como pigmentantes de gema, ou antioxidantes naturais, não comprometem a saúde das aves.

3.5. Qualidade do ovo

Levantamentos feitos pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2017) mostram que a produção brasileira de ovos totalizou no ano de 2016, 39,5 bilhões de unidades, recorde histórico que superou em 6,1% a produção registrada no ano de 2015. Com o expressivo aumento da produção e o aquecimento do mercado interno, o consumo de ovos no Brasil em 2015 chegou a 191,7 unidades per capita, número 5,2% superior ao obtido em 2014, que era de 182 ovos.

Com essa crescente demanda, a qualidade dos ovos tem recebido mais atenção, sendo ela definida por propriedades funcionais, estéticas e microbiológicas (PAS et al., 2017). Como todos os produtos de origem animal, o ovo é perecível, e começa a perder sua qualidade interna após a postura, caso não sejam tomadas medidas adequadas para sua conservação. Assim, a perda de qualidade é um fenômeno inevitável que ocorre de forma contínua ao longo do tempo e pode ser agravado pela temperatura, umidade relativa e estado nutricional da poedeira (LANA et al., 2017).

A qualidade do ovo é uma medida das características desejadas e valorizadas pelos consumidores, sendo percebida pelos atributos sensoriais, nutricionais, tecnológicos, sanitária, ausência de resíduos químicos, éticos e de preservação ambiental. Essas variáveis a serem consideradas devem atender à necessidade dos produtores, consumidores e processadores. Para os produtores a qualidade do ovo está relacionada com o peso e aparência da casca, tais como sujeira, defeito, trincas e manchas de sangue, para os consumidores prazo de validade e características sensoriais, como por exemplo, a cor da gema e casca. Já para os processadores, qualidade significa facilidade de remoção da casca, cor da gema e propriedades funcionais (ALLEONI; ANTUNES, 2001).

3.5.1. Composição do ovo

A composição do ovo depende de vários fatores. Cabe ressaltar que a idade da ave influi no tamanho do ovo e na qualidade da casca, mas não em sua composição. Por sua vez, a dieta influencia a composição proteica, de ácidos graxos e o conteúdo de compostos presentes na gema (MELO et al., 2015).

A casca é constituída por 94% de carbonato de cálcio (CaCO_3), 1,4% de carbonato de Magnésio (MgCO_3), 3% de glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos, e 0,9% de fosfato de cálcio (ORNELLAS, 2001). O albúmen é constituído de 88,5% de água e 13,5% de proteínas, vitaminas do complexo B (Riboflavina – B2) e traços de gorduras (FAO, 2010), adicionalmente, o albúmen possui também pequenas quantidades de glicoproteínas, glicose e sais minerais.

As principais proteínas presentes no albúmen são: ovalbumina, conalbumina, ovomucóide, ovomucina e lisozima. Dentre estas proteínas a ovalbumina e a conalbumina representam 70% do total de proteínas, e são responsáveis pela gelatinização do albúmen (RAMOS, 2008). O albúmen deve apresentar-se límpido, transparente, homogêneo e viscoso, em forma de gel, com uma porção fluida que circunda a gema e a clara espessa.

A gema é uma emulsão de lipídios em água (52%) composta por um terço de proteínas (16%), dois terços de lipídios (34%), vitaminas lipossolúveis, A, D, E e K, glicose, lecitina e sais minerais. A porção lipídica é constituída por 66% de triacilgliceróis, 28% de fosfolipídios e 5% de colesterol. Entre os ácidos graxos que compõe a porção lipídica 64% são insaturados com predominância de ácido oléico e linoleico (CLOSA, 1999).

As proteínas da gema do ovo geralmente são ligadas aos lipídios e são denominadas de lipoproteínas. A gema é rica em pigmentos, sendo que os carotenoides e a riboflavina constituem 0,02% do peso seco do ovo. Os componentes da gema são dispostos em anéis concêntricos que variam de cor conforme o regime alimentar das poedeiras, ou seja, dos pigmentos presente no milho ou sintéticos adicionados à ração. A coloração amarelada da gema deve-se principalmente à presença de riboflavina, xantofilas e β -caroteno (RAMOS, 2008).

3.5.2. Parâmetros físico-químicos

Embora a qualidade dos ovos seja influenciada por fatores como a genética, idade da ave, ambiente, manejo e nutrição, o estabelecimento de padrões físico-químicos permite o desenvolvimento de estratégias de manipulação desses fatores, seja em conjunto ou isoladamente, de acordo com o objetivo desejado, resultando na melhoria da qualidade dos ovos (FRANCO; SAKAMOTO, 2007). Alguns dos parâmetros mais importantes para determinação da qualidade dos ovos serão abordados abaixo.

3.5.2.1. Peso do ovo e percentagem de casca

O peso do ovo é uma medida usada para classificá-lo em seis categorias: jumbo com peso maior ou igual a 66g/unidade, extra com peso de 60 a 65g/unidade, grande com peso de 55 a 59g/unidade, médio com 50 a 54g/unidade, pequeno de 45 a 49g/unidade e, industrial com menos de 45g, que são destinados à diversos ramos da indústria de alimentos (BRASIL, 2003).

Por sua vez, a percentagem da casca é obtida após a quebra do ovo, lavagem e secagem da casca em estufa à 55°C por 24h ou ao ambiente por um período de 48 horas. Após isso, a casca é pesada em balança eletrônica com precisão de 0,01g. Este parâmetro é obtido ao dividir o peso da casca seca pelo peso do ovo inteiro e multiplicado por 100 (SILVERSIDES et al. 1993; LIN et al., 2004).

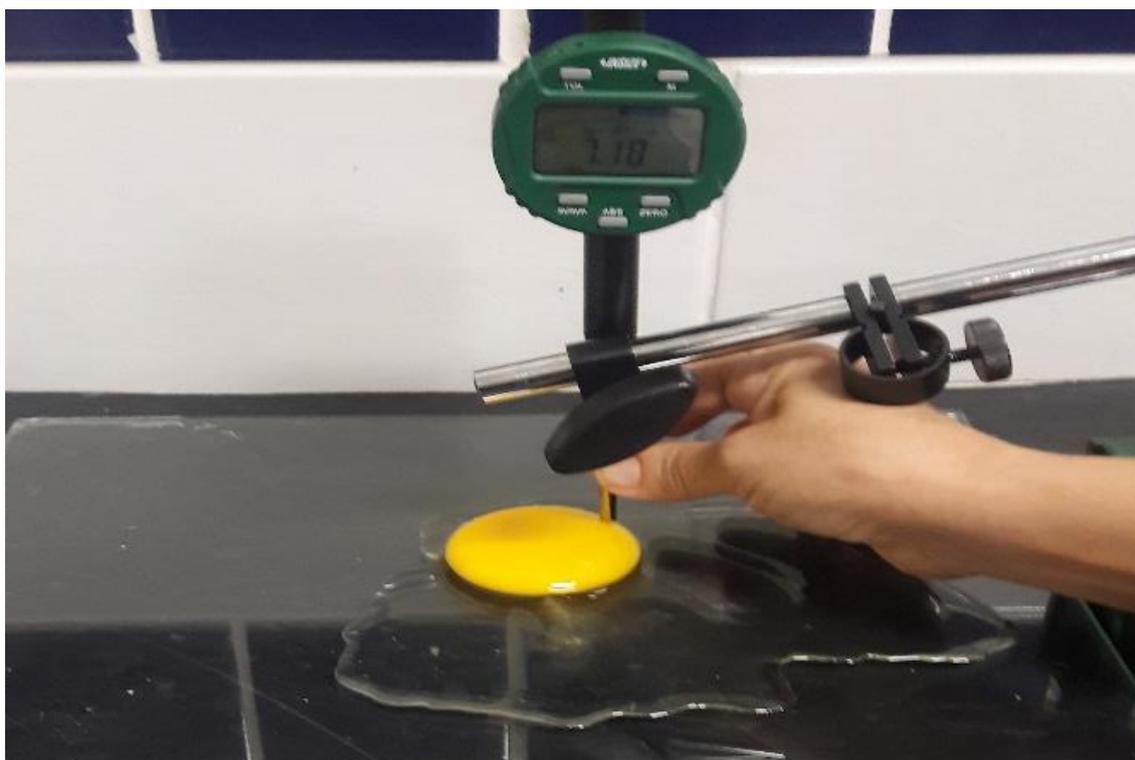
3.5.2.2. Unidade Haugh e Índice de gema

Para determinar a qualidade do ovo vários métodos são citados na literatura e a unidade Haugh é uma das mais utilizadas. Foi proposta por HAUGH (1937) ao observar

que a qualidade do ovo variava com o logaritmo da altura do albúmen espesso. Sendo assim, ele desenvolveu um fator de correção para o peso do ovo, que multiplicado pelo logaritmo da altura do albúmen espesso e corrigida por 100, resultou na denominada Unidade Haugh (MAGALHÃES, 2007).

Posteriormente a fórmula original foi modificada com o objetivo de torná-la mais simples e de cálculo mais rápido por BRANT et al. (1951). Ela é calculada a partir do peso do ovo quebrado em superfície plana (Figura 10) e da altura do albúmen, utilizando a fórmula: $UH = 100\log (H + 7,57 - 1,7 W^{0,37})$, onde H é a altura do albúmen em milímetros, W é o peso do ovo em gramas, 7,57 = fator de correção para altura do albúmen e 1,7 = fator de correção para peso do ovo. E assim pode-se concluir que quanto maior o valor da UH, melhor será a qualidade dos ovos, que, segundo USDA Egg-Grading Manual (2005), são classificados em ovos tipo AA - Superiores a 72, A entre 71 e 60, B entre 59 e 30) e C entre 29 e 0 (SALVADOR, 2011).

Figura 10. Altura de albúmen para determinação da Unidade Haugh.



Fonte: A autoria própria.

De acordo com Silversides e Villeneuve (1994), a correção do peso do ovo na fórmula da UH é inadequada. A inadequação ocorre, principalmente, se forem comparados ovos frescos por diferentes linhagens de poedeiras, como também, se for

avaliada a qualidade do albúmen de ovos armazenados por diferentes períodos. Mas apesar de críticas de alguns autores, ela é considerada uma medida padrão de qualidade e usada, praticamente, por toda a indústria avícola (SALVADOR, 2011).

O índice gema (IG) é uma medida de qualidade da gema: equivale a sua altura dividida pelo diâmetro. Segundo Souza (1997), os valores ótimos de índice de gema para ovos frescos devem estar entre 0,40 e 0,42. Já Lana et al. (2017) recomendam valores entre 0,30 a 0,50 para esse índice.

3.5.2.3. Pigmentação da gema

A cor da gema é um importante critério para a escolha dos ovos pelo consumidor. Ela é utilizada como uma ferramenta para avaliar a qualidade dos ovos e tem uma função muito importante na percepção do alimento (HERNANDEZ; BLANCH, 2000; SEEMANN, 2000). A cor desejada para a gema do ovo varia entre os mercados consumidores, mas, de modo geral, pode-se dizer que cores entre amarelo e dourado são geralmente consideradas como indicadores de ovos de melhor qualidade (KLJAK et al., 2012; SANDESKI, 2013).

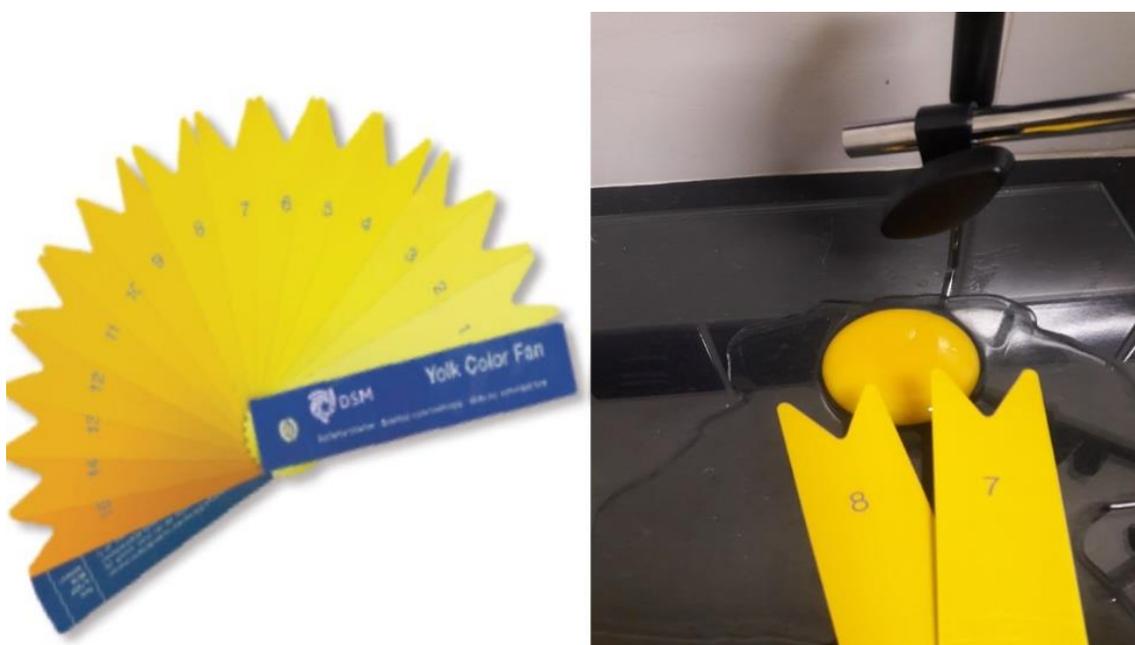
A preferência por ovos contendo gemas bem pigmentadas ainda é evidente em alguns mercados e, por isso, é comum a prática de adição de corantes nas dietas de galinhas poedeiras como um meio para melhorar a atratividade desses produtos (SANDESKI, 2013). Existem dois componentes para a pigmentação da gema do ovo. O primeiro (conhecido como fase de saturação) envolve a deposição dos carotenoides amarelos para criar uma base amarela correspondente à faixa aproximada de do número 7 no leque (DSM Yolk Color Fan). Essa base amarela é muito importante para uma boa saturação da cor final. Uma vez estabelecida a base amarela, a adição de um carotenoide vermelho muda o matiz da cor para uma coloração mais vermelho-alaranjada – e esse é o segundo componente ou fase de pigmentação. A resposta ao carotenoide vermelho é dependente da dose utilizada na dieta, e é mais alta do que a resposta aos carotenoides amarelos. Assim, a combinação de carotenoides amarelo e vermelho dá um melhor custo/benefício para a pigmentação da gema do ovo (DSM, 2013).

A determinação da cor da gema é utilizada na avaliação da qualidade física do ovo. A técnica tradicional consiste em sobrepor a gema sobre um fundo preto ou branco, seguida da comparação da sua cor com as do leque colorimétrico. A tonalidade é expressa em uma escala graduada (escores) de 1 a 15, que corresponde à graduação de cores que

vai do amarelo claro ao alaranjado. É uma avaliação subjetiva, uma vez que depende da acuidade visual do indivíduo que está realizando a leitura, o que reduz a exatidão da avaliação da cor conferida pelo pigmentante em teste (CARNEIRO et al., 2013).

Segundo Mendes (2010), a exigência do mercado brasileiro para cor da gema está entre o número 9 e 10 do Leque Colorimétrico (DSM Yolk Color fan, Figura 11) para ovos comuns. Já no comércio de ovos particulares ou marca de grandes redes de supermercados, do número 11 a 12 do leque e, número maior do que 12 do RCF para ovos de qualidade superior.

Figura 11. Leque colorimétrico utilizado para determinar a coloração das gemas dos ovos.

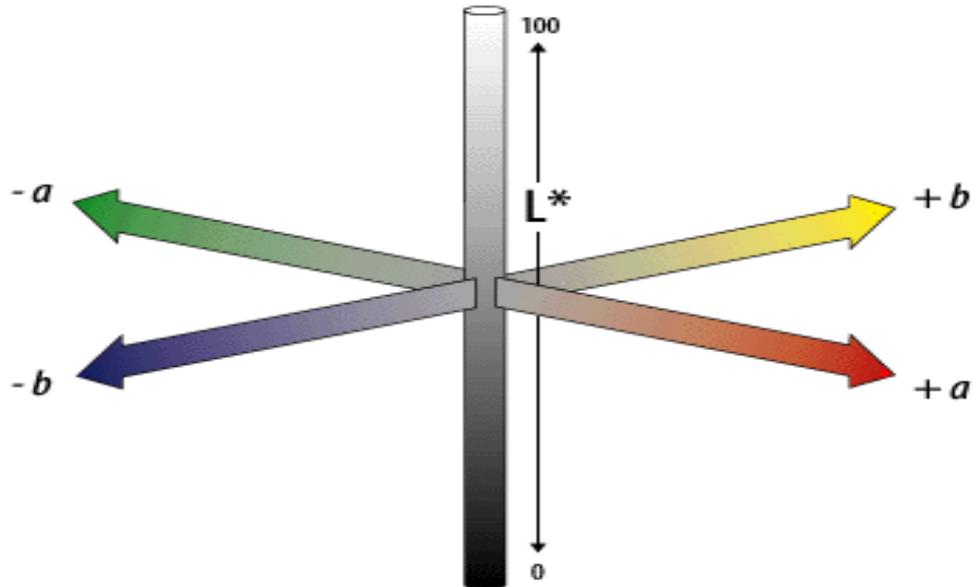


Fonte: Autoria própria.

Para a cor ser considerada um parâmetro de qualidade e ser interpretada de forma correta, a Comissão Internacional de Iluminação (CIE) definiu critérios baseados na percepção do olho humano, utilizando um triplo estímulo. Em 1976, a comissão desenvolveu o modelo colorimétrico $L^*a^*b^*$ (conhecido como CIELab) no qual as cores são interpretadas como: -L - luminância expressa em porcentagem variando 0 (preto) a 100 (branco); -a e b - duas gamas de cor que vão, respectivamente, do verde ao vermelho e do azul ao amarelo com valores variando de -120 a +120 (Figura 12). Por isso, ovos que não contem tonalidade vermelha (a^*) possuem valores negativos para a gama de cor

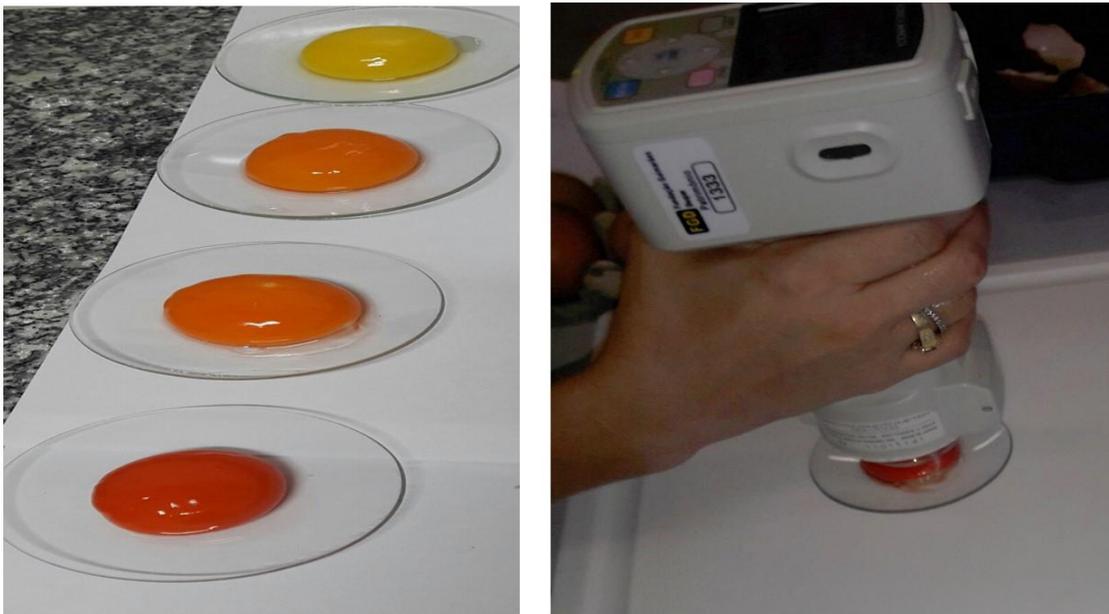
(SOUZA, 2016). Esse modelo colorimétrico pode ser determinado com auxílio do espectrofotômetro através da verificação da coloração da gema (Figura 13).

Figura 12. Distribuição de cores de acordo com o sistema CIELab



Fonte: CIE

Figura 13. Colorimetria da gema de acordo com o sistema CIELab, determinada através do uso de espectrofotômetro.



Fonte: Autoria própria.

3.5.2.4. TBARS e pH

Uma análise química utilizada como parâmetro de perda de qualidade é a oxidação lipídica, conhecida como TBARS que indica quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A oxidação é um fenômeno inevitável que realmente altera a qualidade nutricional do alimento, sendo a peroxidação lipídica é a principal causa de deterioração de lipídios. Souza (2016) afirmou que durante o armazenamento, os compostos lipídicos sofrem alterações do tipo oxidativas que modificam o sabor do alimento, o que confere sabor rançoso. As substâncias tóxicas produzidas pelo processo de oxidação lipídica são cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos e hidrocarbonetos, responsáveis pelo odor e sabor característico de ranço (OLIVO, 2006). A exposição à luz ou calor, natureza oxidativa (íons metálicos, por exemplo) ou antioxidante do alimento, número e tipo das insaturações e a relação entre os lipídeos e oxigênio são fatores que interferem negativa ou positivamente na oxidação.

A oxidação lipídica em ovos é avaliada por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pelo método de extração acidoaquosa, conforme Kang et al. (2001), e o número de substâncias reativas na amostra é expresso como miligrama de malonaldeído por quilograma de gema (FREITAS et al., 2013).

Imediatamente após a postura a qualidade interna do ovo altera-se, devido a fatores como perda de água, consequente perda de peso e CO₂ através da casca, liquefação do albúmen, movimentação de líquidos entre os compartimentos, distensão e flacidez da membrana vitelina da gema, que pode vir a romper (MAGALHÃES, 2007; SALVADOR, 2011). Nesse contexto, o aumento do pH do albúmen, cuja faixa de variação em ovos frescos é de 7,6 a 8,5, é causado pela perda de CO₂ através dos poros da casca. O pH do albúmen é dependente do equilíbrio entre dióxido de carbono dissolvido, íons de carbonato e bicarbonato e proteína.

Alleoni (1997), estudando o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento em ovos de poedeiras comerciais verificou que o pH do albúmen de ovos frescos foi menor do que o pH do albúmen de ovos armazenados em diferentes temperaturas, independente do período de armazenamento.

3.6. Referências

ALLEONI, A.C.C. **Efeito da temperatura e do período de armazenamento na qualidade do ovo, nos teores de s-ovalbumina e nas propriedades funcionais das proteínas da clara do ovo.** 1997. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

ALLEONI, A. C. C., ANTUNES, A. J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. **Scientia Agrícola**, v. 58, p.681– 685, 2001. Doi:10.1590/S0103-90162001000400005

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011. Doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.014

AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição PUC**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006. Doi: 10.1590/S1415-52732006000200010

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 115-123, 2008.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1551-1556, 2008. 10.1590/S1413-70542008000500029

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. Relatório Anual, 2017. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzi_do.pdf. Acesso em: 05 out. 2017.

ASSUENA, V.; FILARDI, R. S.; JUNQUEIRA, O. M.; CASARTELLI, E. M.; LAURENTIZ, A. C.; DUARTE, K. F. Substituição do milho pelo sorgo em rações para poedeiras comerciais formuladas com diferentes critérios de atendimento das exigências em aminoácidos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 93-99, 2008.

BAAS-BECKING, L. G. M. Salt effects on swarmers of *Dunaliella viridis* Teod. **The Journal of General Physiology**, v.14, p.765-779, 1931

BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. 2010. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, PB, 2010.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v.25, p. 207–210, 2007. Doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors - the Earthrise Farms experience. In: VONSHAK, A. (Ed.), ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology**. Taylor & Francis, London, 1997. p. 131-158.

BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. On the factors which determine massive-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. **Plant Physiology**, v.72, n.3 p. 593–597, 1983. Doi: 10.1104/pp.72.3.593

BEN-AMOTZ, A.; EDELSTEIN, S.; AVRON, A. Use of the b-carotene rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol. **British Poultry Science**, v. 27, p. 613-619, 1986. Doi:10.1080/00071668608416920

BENITES, C. I.; FURTADO, P. B. S.; SEIBEL, N. F. Características e aspectos nutricionais do ovo. In: SOUZ-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: UFPEL, 2005, p 57-64.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogátricos**. Lavras, MG: UFLA, 2006. 301p.

BEZERRA, R. P. **Influência do tempo de alimentação e intensidade no cultivo de *Spirulina platensis* sob alimentação com cloreto de amônio**. 2006. 153 f. Dissertação - (Mestrado na área de Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), São Paulo, 2006.

BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (Eds). **Microalgal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. 477p.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and Fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p.313–321, 1999.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v.126, p.369-381, 2006. Doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00632.x

BRAND, L. E. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. Estuarine, **Coastal and Shelf Science**. v. 18, n. 5, p. 543-556, 1984. Doi: 10.1016/0272-7714(84)90089-1

BRANT, A.W.; OTTE, A.W.; NORRIS, K.H. Recommended standards for scoring and measuring opened egg quality. **Food Technology**, v.5, p.356-361,1951.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária e departamento de inspeção de produto de origem animal. Resolução nº 01, de 9 de janeiro de 2003. Aprova a uniformização da nomenclatura de produtos cárneos não formulados em uso para aves e coelhos, suídeos, caprinos, ovinos, bubalinos, eqüídeos, ovos e outras espécies de animais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2003. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 22 out. 2017.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557 - 577, 2010. Doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, p. 315-331, 1997. Doi: 10.1016/S0044-8486(96)01501-3

BRULC, L.; SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; GLAVNIK, V. Determination of egg yolk xanthophylls by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1318, p.134- 141, 2013. Doi: 10.1016/j.chroma.2013.09.074

CARVALHO, P. R.; PITA, M. C. G.; PIBER-NETO, E.; MIRANDOLA, R. M. S.; MENDONÇA-JÚNIOR, C. X. Influência da adição de fontes marinhas de carotenoides à dieta de galinhas poedeiras na pigmentação da gema do ovo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 654-663, 2006.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 533p.

CHEEKE, P. R. **Applied animal nutrition: Feeds and feeding**. 3. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2004. 624 p.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; SIMON, K. Y.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1649 - 1655, 2011. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.062

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v.3, p. 21-34. Doi: 10.3923/biotech.2004.21.34

CHU, W.L.; LIM, Y.W; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P.E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p.1472-6882, 2010. Doi: 10.1186/1472-6882-10-53

CLOSA, S. J.; MARCHESICH, C.; CABRERA, M.; MORALES, J. C. M. Composición de huevos de gallina y codorniz. **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, v. 49, n.2. 1999.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature

and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.030

COMBS JR., G. F. Differential effects of high dietary levels of vitamin A on the vitamin E selenium nutrition of young and adult chickens. **Journal of Nutrition**, v. 106, p. 967-975, 1976.

CONVERTI, C.; LODI, A.; BORGHI, A. D.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p.13-18, 2006. Doi: 10.1016/j.bej.2006.08.013

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. **Zeitschrift fur Naturforsch**, v.58, p. 76-80, 2003.

DAO-LUN, F.; ZU-CHENG, W. Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 1, p. 34-37, 2006. Doi: 10.1631/jzus.2006.B0034

DARLEY, W. M. Algal Biology: a physical approach. In: WILKINSON, J. F. (ed.) **Basic Microbiology**, Blackwell Scientific Publications, p. 30-52, 1982.

DERNER, R. B. **Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe Bacillariophyceae) sob diferentes regimes de iluminação, na Região Sul do Brasil.** 1995. 108 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.

DERNER, R. B. Cultivo de plantas aquáticas. In: VINATEA ARANA, L. (ed.) **Fundamentos de Aquicultura**. Florianópolis: UFSC, p. 85-10, 2004.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006. Doi: 10.1590/S0103-84782006000600050

DSM Nutritional Products Ltd. **Diretrizes DSM para a pigmentação da gema do ovo com CAROPHYLL.** 2013. Disponível em: https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/carophyll_guidelines_amended_PORT_web.pdf. Acesso em: 11 out. 2017.

DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, p. 101-116. 1990.

EL BOUSHY, A. R.; RATERINK, R. Egg yolk pigmentation. **World Review of Animal Production**, v. 27, p. 49-62, 1992.

FAO. AGRIBUSINESS HANDBOOK - **Poultry Meat & Eggs**, 2010 [online], 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/al175e/al175e.pdf>. Acesso em: 20 out. 2017.

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J. A. V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias**, v.36, p. 275-287, 2013.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. Carotenoides: cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 1, p. 48-54, 2000. Doi:

FRANCO, J.R. G. & SAKAMOTO, M. I. Qualidade dos ovos: uma visão geral dos fatores que a influenciam. **Revista AveWorld**, 2007. Disponível em: <http://www.aveworld.com.br/index.php?documento=102>. Acesso em 15 out. 2017.

FREITAS, E. R.; BORGES, A. S.; TREVISAN, M. T. S.; CUNHA, A. L.; BRAZ, N. M.; WATANABE, P. H.; NASCIMENTO, G. A. J. Extratos etanólicos de manga como antioxidantes na alimentação de poedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p.714-721, 2013. Doi: 10.1590/S0100-204X2013000700003

GARCÍA, M. C. C.; MIRÓN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297-305, 2005. Doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.016

GARCIA E. A.; MENDES A. A.; PIZZOLANTE C. C.; GONÇALVES H. C.; OLIVEIRA R. P.; SILVA M. A. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, p.1-7, 2002. Doi:10.1590/S1516-635X2002000100007

GARCIA, E. A.; MOLINO, A. B.; BERTO, D. A.; PELÍCIA, K.; OSERA, R. H.; FAITARONE, A. B. G. Desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais alimentadas com semente de urucum (*Bixa orellana* L.) moída na dieta. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 16, p. 689-697, 2009.

GLASS, A. D. M. Regulation of ion transport. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 311-326, 1983. Doi: 10.1146/annurev.pp.34.060183.001523

GÓMEZ, P. I., GONZÁLEZ, M. A. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. **Biological Research**, v.38, p.151–162, 2005. Doi:10.4067/S0716-97602005000200005

GORNALL, D.A.; KUKSIS, A. Alterations in lipid composition of plasma lipoproteins during deposition of egg yolk. **Journal of Lipid Research**, v. 14, p. 197-205, 1973.

GRIFFIN, H.; GRANT, G.; PERRY, M. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase in vitro. **Biochemistry Journal**, v. 206, p. 647-654, 1982.

GROBAS, S.; MÉNDEZ, J.; BOTE, C.L.; DE BLAS, C.; MATEOS, G.G. Effect of vitamin E and supplementation on egg yolk alfa-tocopherol concentration. *Poultry Science*, v. 81, p. 376-381, 2002. Doi: 10.1093/ps/81.3.376

GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Nutritional value and uses of microalgae in Aquaculture. In: MUCHLISIN, Z. (Ed.) **Aquaculture**, InTech, 2012. p.60-68. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/aquaculture/nutritional-value-and-uses-of-microalgae-in-aquaculture>. Acesso em 06 out. de 2017.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHARLEY, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum, p. 29-60. 1975.

HAUGH, R.R. The Haugh unit for measuring egg quality. **United States Egg Poultry Magazine**, v.43, p.552-555, 1937.

HU, Z.; ZHANG, X.; WU, Z.; QI, H.; WANG, Z. Export of intracellular *Monascus* pigments by two-stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous solution. **Journal of Biotechnology**, 31 (Suppl 162), p. 202-209, 2012. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.10.004

HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 497-507, 2002. Doi: 10.1016/S0958-1669(02)00367-1

JEFFREY, S.W.; MAC TAVISH, H.S.; DUNLAP, W.C. VESK, M.; GROENEWOUD, K. Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae. **Marine Ecology-Progress Series**, v.189, p.35–51, 1999.

KANG, K. R.; CHERIAN, G.; SIM, J. S. Dietary palm oil alters the lipid stability of polyunsaturated fatty acid-modified poultry products. **Poultry Science**, v.80, p.228-234, 2001.

KARAM, L. M.; SOCCOL, C. R. Efeito da temperatura e do pH no cultivo de *Spirulina major*. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zootecnia**, v. 10, p. 5-7, 2007.

KLJAK, K.; DRDIC, M.; KAROLYI, D.; GRBESA, D. Pigmentation Efficiency of Croatian Corn Hybrids in Egg Production. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**, v.7, p.23-27, 2012.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. NAGAI, S.; KURIMURA, Y.; TSUJI, Y. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.351–356, 1997. Doi: 10.1007/s002530051061

LANA, S.R.V.; LANA, G. R. Q.; SALVADOR, E. L.; QUINTÃO, A. M.; CUNHA, F. S. A.; MARINHO, A. L. Qualidade de ovos de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.18, p.140-151, 2017. Doi:10.1590/S1519-99402017000100013

LEESON, E.; SUMMERS, J. D. **Scott's nutrition of the chicken**. 4 th ed. Guelph: University Books, 2001. p. 199.

LIMA, J. P.; LOPES, C. O.; DIAS, N. A. A.; PEREIRA, M. C. A. Atividade e biodisponibilidade dos carotenoides no organismo (artigo de revisão). **Revista Ciências em Saúde**, v. 2, n.1, p. 65-73, 2012. Doi: 10.21876/rcsfmit.v2i1.75

LIN, H.; MERTENS, K.; KEMPS, B.; GOVAERTS, T.; DE KETELAERE, B.; DE BAERDEMAEKER, J.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: mechanical and material properties of eggshell and membrane. **British Poultry Science**, v.45, n. 4, p. 476-482, 2004. Doi: 10.1080/00071660400001173

LIU J.; GOYER, L. A.; WAALKES, M. P. Toxic effects of metals. In: KLASSEN C. D. **Casarett and Doull's toxicology: The Basic science of poisons**. United States: Mc Graw Hill, 2008, 1309 p.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Paulo: Rima, 2006. 606 p.

LOURENÇO, S. O.; MARQUES JUNIOR, A. N. Produção primária marinha. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 195-227. 2002.

MACHADO, F. M. V. F, CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. S. Avaliação da disponibilidade de ferro em ovo, cenoura e couve e em suas misturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 610-618, 2006. Doi: 10.1590/S0101-20612006000300020.

MAGALHÃES, A. P. C. **Qualidade de ovos comerciais de acordo com a integridade da casca, tipo de embalagem e tempo de armazenamento**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica, 2007.

MARUSICH, W. L.; BAUERNFEIND, J. C. Oxycarotenoids in poultry feeds. In: BAUERNFEIND, J. C. (Ed.). **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: technological and nutritional applications**. New York: Academic Press, 1981. p. 327.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010. Doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020

MAYER, J. K. **Comparação do perfil de carotenoides, vitaminas A e E da gema de ovos comercializados como orgânicos, caipiras e convencionais na grande Florianópolis**. 2014. 46 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049–6055, 1969.

MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARI, I. M.; HEREDIA, F. J. Importância nutricional de pigmentos carotenoides. **Archives Latino-American of Nutrition**, v. 54, p. 149-55, 2004.

MELO, A. S.; FERNANDES, R. T. V.; OLIVEIRA, V. R. M.; QUEIROZ, J. P. A. F.; DIAS, F. K. D.; SOUZA, R. F.; MARINHO, J. B. M.; SOUZA, A. O. V.; SANTOS FILHO, C. A. Características físico-químicas e sensoriais de aves e ovos. **Pubvet**, v.9, p.537-543, 2015.

MENDES, F. R. **Qualidade física, química e microbiológica de ovos lavados armazenados sob duas temperaturas e experimentalmente contaminados com *Pseudomonas aeruginosa***. 2010.72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2010.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L. Prospecção tecnológica da utilização da *Spirulina platensis*. **Cadernos de Prospecção**, v.5, p.44-52, 2012. Doi: 10.9771/S.CPROSP.2012.005.005

MÍNGUEZ-MOSQUEIRA, I. M.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and Provitamin A in Functional Foods. In: Hurst, W. J. **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**. CRC Press LLC, 2002. Doi: 10.1201/9781420014679.ch3

MOHEIMANI, N. R. **The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation**. 2005. 247 p. Theises (Ph. D.), Murdoch University, Australia, 2005.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P. LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, p.7-18, 2008. Doi: 10.5007/2175-7925.2008v21n2p7

OLIVERA, A. **Crescimento das diatomáceas *bacillariophyceae* *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade.** 1993. 204 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

OLIVEIRA, N. T. E.; FONSECA, J. B.; SOARES, R. T. R. N.; FERREIRA, K. S.; THIÉBAUT, J. T. L. Pigmentação de gemas de ovos de codornas japonesas alimentadas com rações contendo colorífico. **Ciências. Agrotecnicas**, v. 31, n. 5, p. 1525-1531, 2007.

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In: SHIMOKOMAKI, M. (Ed.). **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes.** São Paulo: Varela, 2006. cap.15, p. 155-162.

ONCEL, S.; SUKAN, F. V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Biorsource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4755-4760, 2008. Doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.068

OREN, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. **Saline Systems**, v.1, p.1-14, 2005. Doi:10.1186/1746-1448-1-2

OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? **Microbiology Letters**, v.269, p.1–10, 2007. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x

OREN, A.; GUREVICH, P. ANATI, D.; BARKAN, E.; LUZ, B. A bloom of *Dunaliella parva* in the Dead Sea in 1992: biological and biogeochemical aspects. **Hydrobiologia**, v.297, p.173-185, 1995. Doi: doi.org/10.1007/BF00019283

ORMENESE, R. C. S. C.; MISUMI, L.; ZAMBRANO, F.; FARIA, E. V. Influência do uso de ovo líquido pasteurizado e ovo desidratado nas características da massa alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 255-260, 2004.

ORNELLAS, L. H. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos.** 7. ed. São Paulo: Editora Metha, 2001. 330 p.

PALUDO, M. P. **Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: Impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico.** 2012. 74f. Dissertação (Mestrado

em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2012.

PARK, J. H.; UPADHAYA, S. D.; KIM, I. H. Effect of Dietary Marine Microalgae (Schizochytrium) Powder on Egg Production, Blood Lipid Profiles, Egg Quality, and Fatty Acid Composition of Egg Yolk in Layers. **Asian- Australasian Journal of Animal Sciences**, v.28, p. 391-397, 2015. Doi:10.5713/ajas.14.0463

PAS, L. S.; STURZA, D. F.; GIACOMINI, L.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Presença de manchas de sangue e pontos de carne em ovos de galinhas poedeiras alimentadas com dietas contendo aflatoxinas, flumonisininas e toxina T- 2. **Avicultura Industrial**, ed. 1266, n.5, p.45-47, 2017.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G. A.; RANGEL, C. O. A.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003. Doi: 10.1016/S0260-8774(02)00209-1

POST, F. J. The microbial ecology of the Great Salt Lake. **Microbial Ecology**, v.3, p.143-165, 1977. Doi: 10.1007/BF02010403

RAMOS, B. F. S. **Gema de ovo composição em aminas biogénicas e influência da gema na fração volátil de creme de pasteleiro**. 2008.111f. Dissertação (Mestrado em Controlo de qualidade) – Faculdade de farmácia, Universidade do Porto, Porto. 2008.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2004. 196 p.

RIVKIN, R. B. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. 1. Photosynthesis, chemical composition and growth. **Marine Ecology Progress Series**, v. 55, p. 291-304, 1989

ROCHA, J. S. R. **Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário**. 2011. 81p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

RUTH, S. V.; ALEWIJN, M.; ROGERS, K.; NEWTON-SMITH, E.; TENA, N.; BOLLEN, M.; KOOT, A.; Authentication of organic and conventional eggs by carotenoid profiling. **Food Chemistry**, v.126, p.1299-1305, 2011. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.081

SAHA, S. K.; DARMSTADT, G. L.; RUHULAMIN, M.; HANIF, M.; EL ARIFEEN, F.; SANTOSHAM, M.; OISHI, K.; NAGATAKE, T.; BLACK, R. E. Comparison of antibiotic resistance and serotype composition of carriage and invasive pneumococci among Bangladeshi children: implications for treatment policy and vaccine formulation. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5582-5587, 2003. Doi: 10.1128/JCM.41.12.5582-5587.2003

SAHA, S. K.; HAYES, J.; MOANE, S. MURRAY, P. Tagging of biomolecules with deuterated water (D₂O) in commercially important microalgae. **Biotechnology Letters**, v.35, p.1067–1072, 2013. Doi:10.1007/s10529-013-1176-8

SALVADOR, E. L. **Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem**. 2011.99f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL. 2011.

SANDESKI, L. M. **Otimização da pigmentação da gema do ovo**. 2013. 60f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp. Araçatuba, SP. 2013.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. **Característica do Ovo**. Boletim Técnico - Universidade Federal do Espírito Santo – ES. 7p, 2007.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 277-286, 2010. Doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.005

SETLÍK, I.; VELADIMIR, S. MALEK, I. Dual purpose open circulation units for large scale culture of algae in temperate zones. I. Basic design considerations and scheme of pilot plant. **Algology Studies** (Trebou), v.1, p. 11, 1970.

SHAISH, A.; AVRON, M.; PICK, U. BENZ-AMOTZ, A. Are active oxygen species involved in induction of b-carotene in *Dunaliella bardawil*? **Planta**, v.190, p.363–368, 1993. Doi:10.1007/BF00196965

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. Revista de Nutrição PUC, Campinas, v. 17, n. 2, p. 277-236, 2004. Doi: 10.1590/S1415-52732004000200009

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

SILVERSIDES, F. G., TWIZEYIMANA, F., VILLENEUVE, P. Research note: a study relating to the validity of the Haugh unit correction for egg weight in fresh eggs. **Poultry Science**, v. 72, p.760-764, 1993.

SILVERSIDES, F. G.; VILLENEUVE, P. Is the Haugh unit correction for egg weight valid for eggs stored at room temperature? **Poultry Science**. v.73, p.50–55, 1994.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.33, n.2, p.172–215, 2013. Doi: 10.3109/07388551.2012.681625

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107f. Dissertação (Mestre em Ciências - Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

SOLOMON, S.E. **Egg and eggshell quality**. London: Wolfe Publishing Ltd, 1991. 149p.

SOONG, P. Production and development of Chlorella and Spirulina in Taiwan. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. (Eds.), **Algae Biomass**. Elsevier, Amsterdam, 1980. p. 97-113.

SOUZA, P.A. Efeito da idade da galinha na qualidade dos ovos mantidos sob condições de ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.49-52, 1997.

SOUZA, R. A. **Qualidade interna de ovos armazenados sob diferentes períodos e temperaturas**. 2016. 70f. Dissertação (Mestre em Produção Animal Sustentável) - Programa de Pós-graduação em Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP. 2016.

SPADA, F. P.; CANNIATTI BRAZACA, S. G.; COELHO, A. D.; SAVINO, V. J. M.; FRANÇA, L. C.; CORRER, E.; MARTINS, E.; FISCHER, F. S.; LEMES, D. E. A. Adição de carotenoides naturais e artificiais na alimentação de galinhas poedeiras: efeitos na qualidade de ovos frescos e armazenados. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 346-353, 2012. Doi:10.1590/S0103-84782012000200025

STRYER, L. Biossíntese de lipídeos de membrana e esteroides. In: **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. p. 652-678.

SURAI, P.F.; IONOV, I.A.; KUKLENKO, T.V.; KOSTJUK, I.A.; MACPHERSON, A.; SPEAKE, B.K.; NOBLE, R.C.; SPARKS, N.H.C. Effect of supplementing the hen's diet with vitamin A on the accumulation of vitamins A and E, ascorbic acid and retinoids in the egg yolk and in the embryonic liver. **British Poultry Science**, v. 39, p. 257-263, 1998. Doi:10.1080/00071669889222

SURAI, P.F.; SPARKS, N.H.C. Comparative evaluation of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. **British Poultry Science**, v. 42, p. 252-259, 2001. Doi:10.1080/00071660120048519

SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. *Journal of Poultry Science*, v. 38, p. 1-27, 2001.

TAFRESHI, A. H.; SHARIATI, M. Dunaliella biotechnology: methods and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.14-35, 2009. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x

TARUGI, P.; ALBERTAZZI, L.; NICOLINI, S.; CALANDRA, S. Absence of apolipoprotein B-48 in the chick, *Gallus domesticus*. **Journal of Lipid Research**, v. 31, p. 417-427, 1990.

TINOCO, N. A. B.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; REZENDE, C. M. O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 7, p.1421-1440, 2015. Doi: 10.5935/1984-6835.20150078

TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina* sp. **Bulletin de Institut Océanographique Monaco**, v. 12, p. 65-75, 1993.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.178-214. 2004.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.; FÚRIGO JÚNIOR, A. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v.32, p.2429-2436, 2009. Doi:10.1590/S0100-40422009000900036

WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v. 25, p. 1-53, 1966.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v.105, p.36–41, 2007. Doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.054

WANG, J.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Cloning and expression of isoenzymes of superoxide dismutase in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under oxidative stress. **Journal of Applied Phycology**, v.23, p.995–1003, 2011. Doi: 10.1007/s10811-010-9631-6

WILLIAMS, K. C. Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh Unit score. **World Poultry Science Journal London**, v.48, p.5- 16, 1992.

YEUM, K. J.; RUSSELL, R.M; Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.483–504, 2002. Doi: 10.1146/annurev.nutr.22.010402.102834

4. CURVA DE CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E COMPOSTOS BIOATIVOS DA MICROALGA MARINHA *Dunaliella salina* EM CULTIVOS DESCONTÍNUOS

RESUMO: Considerando que as microalgas contêm ampla variedade de componentes químicos e bioativos que possam ser utilizados na alimentação animal e humana, o presente estudo objetivou avaliar o crescimento, a composição química e de compostos bioativos da microalga *Dunaliella salina*, em dois meios de cultivo, um mixotrófico, Conway, e outro autotrófico, salino. Para isso, mensurou-se a curva de crescimento, diâmetro celular, velocidade de crescimento (k), produtividade (mg/L/dia), densidade celular máxima (DCM; célula/mL), e valor nutricional através da composição centesimal, de macro e micronutrientes e compostos bioativos. A *D. salina* em meio Conway apresentou fase exponencial mais precoce, com DCM (23.500 células/ml), produtividade e velocidade de crescimento maiores ($p < 0,05$) que o meio salino (18.200 células/ml), embora o diâmetro celular da *D. salina* tenha sido maior ($p < 0,05$) em meio salino ($25,5\mu\text{m} \pm 2,65$) do que em meio Conway ($21,25\mu\text{m} \pm 1,26$). A biomassa da *D. salina* em meio Conway obteve maiores valores ($P < 0,05$) de proteína (60,43%), nitrogênio (9,67mg/g), clorofila a (60,60mg/L), enquanto o meio salino propiciou maiores valores de lipídios (6,93%), açúcares (8,09%), energia bruta (3955kcal/kg), fósforo (8,40mg/g), potássio (128,66mg/g), magnésio (29,63mg/g), zinco (8,23mg/g), carotenoides totais (34,73mg/L), vitamina C (503,13mg/100g), polifenóis extraíveis totais (81,00mg/100g), antocianinas (30,87mg/100g) e flavonoides amarelos (45,30mg/100g). A utilização do meio salino para a microalga *D. salina* resultou numa alternativa viável ao meio mixotrófico Conway, pois, propiciou biomassa com maiores teores de antioxidantes. Devido ao seu valor nutricional e perfil de compostos bioativos, a biomassa da microalga *D. salina* pode ser destinada à nutrição animal e humana.

Palavras-chave: Antioxidantes. Biomassa. Compostos bioativos. Microalga. Produtividade. Velocidade de crescimento.

GROWTH CURVE, BIOACTIVE COMPOUNDS AND CHEMICAL COMPOSITION OF MARINE MICROALGA *Dunaliella salina* IN BATCH CULTURES

ABSTRACT: Because microalgae contain a wide variety of chemical and bioactive components that can be used to feed animals and humans, the present study aimed to evaluate the growth the chemical composition and bioactive compounds of the microalga *Dunaliella salina*, in two culture media, a mixotrophic, Conway, and another autotrophic, saline. For this, the growth rate (k), productivity (mg/L/day), maximum cell density (MCD), and nutritional value were evaluated through the centesimal composition of macro and micronutrients and bioactive compounds. The *D. salina* in Conway medium had an earlier exponential phase and higher MCD (23,500 cells/ml), productivity, and growth rate ($P < 0.05$) than saline medium (18,200 cells/ml), although the cell diameter of *D. salina* was greater ($P < 0.05$) in saline ($25.5 \mu\text{m} \pm 2.65$) than in Conway medium ($21.25 \mu\text{m} \pm 1.26$). The biomass of *D. salina* in Conway medium obtained greater values ($P < 0.05$) of protein (60.43%), nitrogen (9.67 mg/g), and chlorophyll a (60.60 mg/L), whereas saline medium provided greater values of lipids (6.93%), sugars (8.09%), gross energy (3955 kcal/kg), phosphorus (8.40 mg/g), potassium (128.66 mg/g), magnesium (29.23 mg/g), zinc (8.23 mg/g), total carotenoids (34.73 mg/L), vitamin C (87 mg/100g), total polyphenols (81.00 mg/100 g), anthocyanins (30 mg/kg), and yellow flavonoids (45.30 mg/100g). The use of the autotrophic saline medium for the *D. salina* microalga resulted in a viable alternative to the Conway mixotrophic medium, because it provided biomass with higher levels of antioxidants. Due to its nutritional value and profile of bioactive compounds, the biomass of the *D. salina* microalga can be destined to animal and human nutrition

Keywords: Antioxidants. Biomass. Bioactive compounds. Microalgae productivity. Growth rate.

4.1. Introdução

As microalgas contêm ampla variedade de componentes químicos dentre os quais se encontram os carotenoides, ácidos graxos, polissacarídeos, vitaminas, minerais e outros compostos bioativos, que têm sido utilizados durante muito tempo para a alimentação animal e humana (OLIVARRÍA et al., 2010). Nesse contexto, a microalga *Dunaliella salina* é uma das mais utilizadas para obtenção desses compostos.

A *D. salina* é uma microalga marinha distribuída amplamente em todo o mundo (DENER et al., 2006). Em condições favoráveis ao seu crescimento, apresenta-se verde e biflagelada, no entanto, em condições ambientais extremas (limitação de nutrientes, baixa temperatura, alta luminosidade, alta salinidade) estas células sofrem alterações morfológicas e bioquímicas como estratégias de sobrevivência tornando-se vermelha e aflagelada (GÓMEZ; GONZÁLEZ, 2005). É durante essa fase que a *D. salina* passa a ser uma fonte significativa e natural de carotenoides e outros compostos bioativos, os quais podem ser usados na indústria alimentícia ou farmacêutica (DUFOSSÉ et al., 2005; RAJA et al., 2007; LAMERS et al., 2008; SAHA et al., 2013).

Diante do supracitado, e da escassez de informações sobre as condições ideais de cultivo para obtenção de maior biomassa e concentração de nutrientes e compostos bioativos, objetivou-se avaliar o crescimento, a composição química e os compostos bioativos da microalga marinha *Dunaliella salina* em cultivos descontínuos.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Coleta da *D. salina*

A microalga *Dunaliella salina* foi coletada em tanques salinos no Estado do Rio Grande do Norte (Latitude 5° 4'S; Longitude 37° 16' O), com auxílio de rede de plâncton com 20 µm de abertura de malha, por meio de arrastos horizontais na subsuperfície da coluna d'água (BICUDO; MENEZES, 2006). As amostras coletadas foram imediatamente acondicionadas em tubos de Falcon, sendo mantidas vivas para posterior identificação e isolamento (GUEVARA et al., 2005). Para obtenção do sobrenadante, utilizou-se centrífuga a 4000 rpm por 10min.

4.2.2. Cultivo *in vitro*

Para o cultivo da microalga *Dunaliella salina*, foram testados dois diferentes meios de cultura, com três repetições cada. Utilizou-se o meio mixotrófico Conway indicado para este tipo de microalga (WALNE, 1966), com salinidade máxima de 10%, ausência da solução de silicato, e adição de melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Como alternativa, desenvolveu-se um meio autotrófico salino (salinidade média de 26%), a partir da água coletada juntamente com a microalga em tanques salinos, contendo os teores 0,25g/L de Ca, 25,16g/L de SO₄, 17,63g/L de Mg, 153,3g/L de Cl, 5,27g/L de K, 74,96g/L de Na e 0,95g/L de Br.

O método de cultivo utilizado foi o descontínuo (batch), onde não há renovação de nutrientes após adição do meio de cultura e do inóculo (CARVALHO et al., 2004), para os dois tratamentos. O cultivo foi desenvolvido em Erlemeyers de um litro com aeração constante e pH inicial de 7,5 e 7,8 para os meios Conway e salino, respectivamente. A temperatura foi controlada (25°C) e o fotoperíodo utilizado foi de 12 horas, fornecido por lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Para o meio Conway utilizou-se 400 mL do meio de cultura, 4 mL do inóculo (*Dunaliella salina*), e 40 mL de melaço de cana-de-açúcar, enquanto para o meio salino utilizou-se 400 mL de água de tanques salinos (meio onde foi coletada a microalga *D. salina* para desenvolvimento do inóculo) e 4 mL do inóculo (*Dunaliella salina*). A densidade celular inicial para os dois meios foi de 6×10^3 cel/mL (GOMES et al., 2003). O período de cultivo teve duração de 14 dias.

Para a coleta das amostras utilizou-se pipetas “Pasteurs” esterilizadas. As contagens celulares foram realizadas diariamente no mesmo horário do início do cultivo (início do período de luz) com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio ótico com objetiva de 40x. Os parâmetros analisados em ambos os tratamentos foram: curva de crescimento (estimada através da equação de regressão polinomial), a densidade celular máxima (mensurada através do momento em que o número de células por mL atingiu o valor máximo), a produtividade (obtida através da equação estabelecida por LOURENÇO, 2006), a velocidade de crescimento diário (K, sendo representada pelo número de divisões celulares/dia e determinada através da equação reportada por STEIN, 1973), e o diâmetro celular (mensurado através imagens fotográficas realizadas em microscópio ótico com objetiva de 40x, processadas pelo programa Cheese® e pelo software IMAGE J).

4.2.3. Composição química e compostos bioativos

Ao final do período de inoculação, a biomassa de *D. salina* foi obtida através da centrifugação e posterior secagem (AOAC, 2011) dos meios de cultivo, para que fossem determinados os valores nutricionais de cada meio.

Para as análises de composição química utilizou-se as seguintes metodologias:

Composição centesimal (umidade, proteína, lipídios, matéria mineral e fibra) conforme a AOAC (2011); Análise do teor de açúcares: realizada em espectrometria próxima do infravermelho (NIRS), com o comprimento de onda de 1200 a 2400 nm e intensidade 0 a 55mil. Análise de energia bruta (EB): realizada através de bomba calorimétrica adiabática.

Análise de macro e micronutrientes: seguindo metodologia de Bacchan et al. (1995), determinou-se quantitativamente os teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn) através de espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite.

Análises de compostos bioativos: carotenoides totais foram determinados de acordo com Higby (1962), para polifenóis extraíveis totais seguiu-se a metodologia proposta por Larrauri et al. (1997), já antocianinas, flavonoides amarelos, segundo Francis (1982). Por sua vez, o teor de vitamina C foi determinado de acordo com Strohecker e Henning (1967) e a análise de clorofila a foi realizada através do método proposto por Lorenzen (1967), em espectrofotômetro de fluorescência.

4.2.4. Análise estatística

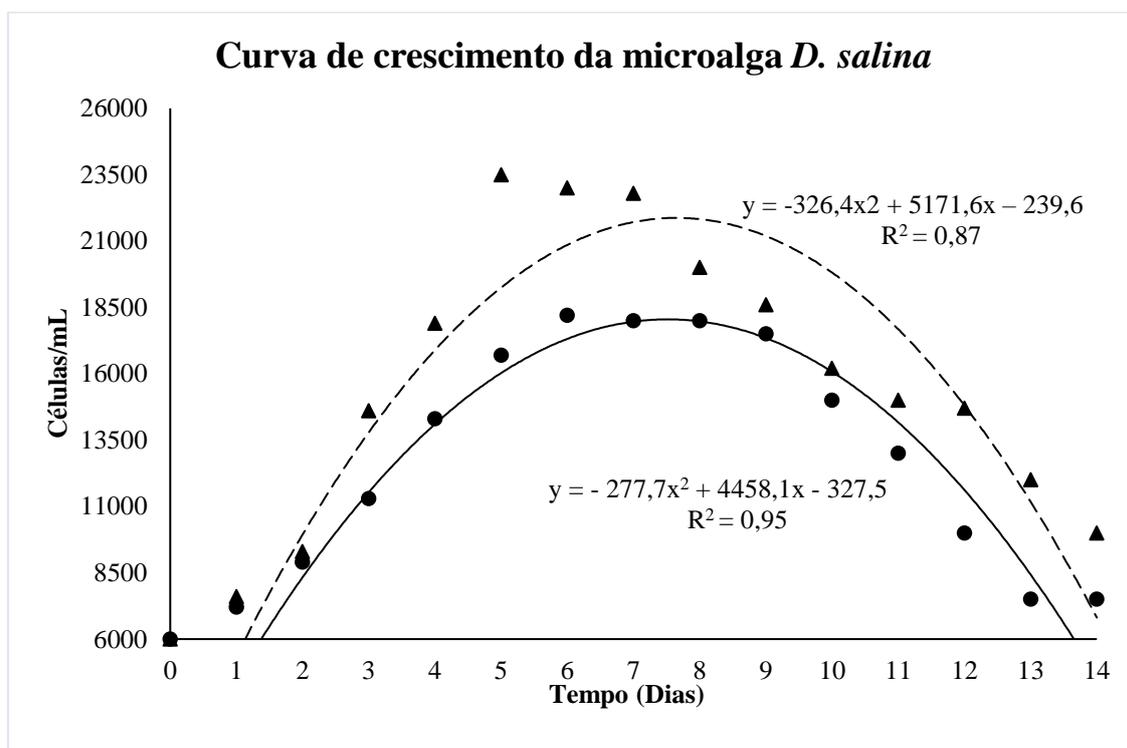
A normalidade e homocedasticidade das variâncias dos dados foram determinados pelos testes Cramer-von Mises e Levene, respectivamente. Os dados referentes à curva de crescimento foram submetidos à Análise de Variância e regressão polinomial a 5% de probabilidade, enquanto os dados referentes ao valor nutricional foram submetidos à Análise de Variância e Teste Fisher 5% de probabilidade.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Cultivo *in vitro*

O crescimento da microalga *D. salina* diferiu nos dois meios de cultivos após 24 horas da inoculação e no período compreendido entre o 8º e 14º dia, com a fase de crescimento exponencial para o meio Conway entre o 2º e 6º dia e para o meio salino entre o 2º e o 7º dia (Figura 1).

Figura 1. Curva de crescimento da microalga *Dunaliella salina* em meios de cultivo Conway e Salino. Cada triângulo representa a média de três repetições \pm erro padrão do número de células por dia de cultivo em meio Conway. A linha tracejada representa a tendência a regressão polinomial de ordem 2. A equação de regressão $y = -326,4x^2 + 5171,6x - 239,6$ ($R^2=0,87$) representa a curva de crescimento da microalga *D. salina* por dia de cultivo em meio Conway. Cada círculo representa a média de três repetições \pm erro padrão do número de células por dia de cultivo em meio Salino. A linha contínua representa a tendência a regressão polinomial de ordem 2. A equação de regressão $y = -277,7x^2 + 4458,1x - 327,5$ ($R^2 = 0,95$) representa a curva de crescimento da microalga *D. salina* por dia de cultivo em meio Salino.

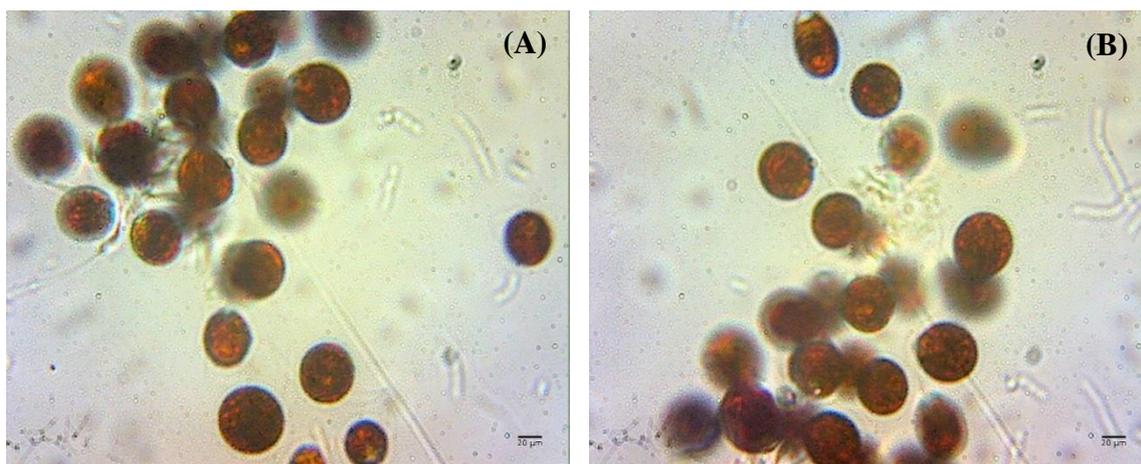


Fonte: Autoria própria.

Olivarría et al. (2010) ao avaliarem o crescimento de *Dunaliella* sp. durante 10 dias em meios de cultura (controle, com nitratos, e meios com limitações de nitrogênio), observaram densidade celular máxima de $1,2 \times 10^6$ célula/mL para o meio controle aos 6 dias de cultivo. Tais autores observaram que embora a maior densidade celular tenha ocorrido no meio controle, que dispõe de nitratos como fonte de nitrogênio, os meios com limitações crescentes de nitrogênio apresentaram um aumento significativo na produção de biomassa dessa microalga.

Observou-se que o meio salino utilizado nesse estudo propiciou *D. salina* com maiores diâmetros celulares com média de $25,5\mu\text{m}$ ($\pm 2,65$), enquanto o meio Conway propiciou células microalgais com $21,25\mu\text{m}$ ($\pm 1,26$) de diâmetro (Figura 2 a-b).

Figura 2. Fotomicrografia em objetiva de 40x da microalga *D. salina* nos meios de cultivo: (A) Conway e, (B) Salino. Escala micrográfica: $20\mu\text{m}$.



Fonte: Autor

Corroborando com esse resultado, Said (2009) afirma que algumas espécies de microalga sofrem alterações morfológicas, como aumento do tamanho celular, para sobreviverem num ambiente com limitação de nutrientes.

A produtividade, velocidade de crescimento diário (k) e a densidade celular máxima (DCM), diferiram entre os meios de cultivo (Tabela 1).

Observou-se maior produtividade de biomassa (mg/L/dia) para a microalga cultivada em meio Conway nos períodos compreendidos entre o 2° e 6° dia, bem como, 10° e 14° dia após inoculação da *D. salina*. O pico de produtividade foi observado no 5° para os dois meios de cultivo. Por sua vez, foi verificada maior velocidade de crescimento

diário (k) para o meio Conway, no 3º dia, enquanto o meio salino foi mais tardio, 4º dia após inoculação, e também apresentou um menor valor para velocidade de crescimento.

Tabela 1. Produtividade (mg/L/dia), velocidade de crescimento (k) da microalga *Dunaliella salina* e densidade celular máxima (DCM; célula/mL).

Tempo (dias)	Produtividade (mg/L/dia)			Velocidade de Crescimento (k)		
	Meio Conway	Meio Salino	P	Meio Conway	Meio Salino	P
1	16,00 ± 0,25	12,00 ± 0,41	0,604	0,34 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,001*
2	16,50 ± 0,05	14,50 ± 0,25	0,006*	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,954
3	28,66 ± 0,12	17,66 ± 0,06	0,001*	0,42 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,005*
4	29,75 ± 0,07	20,75 ± 0,16	0,001*	0,39 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,108
5	35,00 ± 0,50	21,40 ± 0,10	0,002*	0,39 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,179
6	28,33 ± 0,08	20,33 ± 0,11	0,036*	0,32 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,817
7	24,00 ± 0,25	17,14 ± 0,02	0,439	0,27 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,111
8	17,50 ± 0,18	15,00 ± 0,05	0,832	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,007*
9	14,00 ± 0,20	12,77 ± 0,06	0,143	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,001*
10	10,20 ± 0,05	9,00 ± 0,05	0,033*	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,001*
11	8,18 ± 0,06	6,36 ± 0,02	0,008*	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,002*
12	7,25 ± 0,07	3,33 ± 0,01	0,001*	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,006*
13	4,61 ± 0,03	1,15 ± 0,01	0,001*	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,001*
14	2,85 ± 0,07	1,07 ± 0,01	0,001*	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,007*
DCM (células/mL)		DCM (células/mL)		DP	P	
Meio Conway		Meio Salino				
23.500		18.200		±3,74	0,002*	

*Efeito significativo pelo teste F ($P < 0,05$) na linha; DP- Desvio Padrão; P- Probabilidade

O método de cultivo descontínuo, ou “batch”, adotado para os dois meios de cultura assegura que a partir da inoculação nos meios escolhidos, até o período final do experimento, os meios não recebam nenhuma reposição de nutrientes (CARVALHO et al., 2004). No entanto, o meio mixotrófico Conway possui em sua composição fontes de nitrogênio, cobre, cobalto, zinco, sódio e vitaminas do complexo B (WALNE, 1966), além de ter sido acrescido o melaço de cana como fonte de carbono no momento da inoculação, em proporções que possibilitam um melhor desempenho e produção de biomassa (COÊLHO et al., 2013).

Antagonicamente, meios de cultivo autotróficos, que apresentam depleção de alguns nutrientes como o nitrogênio, desencadeiam uma série de reações metabólicas que asseguram a sobrevivência da microalga *D. salina*, em detrimento do seu crescimento exponencial (SAHA et al., 2013), como observado no meio salino.

4.3.2. Composição química e compostos bioativos

A composição nutricional observada para a biomassa da *D. salina* pode ser observada na Tabela 2. Os teores de proteína observados na biomassa dois meios de cultivo foram os componentes mais abundantes da composição centesimal. Por sua vez, as concentrações de açúcares nos dois meios, e lipídeos no meio Conway foram mais baixas se comparadas com os dados reportados por Muhaemin e Kaswadji (2010).

Tabela 2. Composição químico-energética (em base seca) da biomassa de *Dunaliella salina* em dois meios de cultivo

Nutrientes	Meio Conway	Meio Salino	P	EP	CV (%)
Umidade (%)	1,13	1,40	0,3891	0,34	7,07
Proteína (%)*	60,43	55,36	0,0017	0,82	1,43
Lipídios (%)*	4,43	6,93	0,0002	0,13	2,36
Fibra (%)	1,73	1,89	0,0181	0,04	2,32
Açúcares (%)*	7,59	8,09	0,0370	0,20	2,57
Cinzas (%)	15,23	14,90	0,4199	0,45	3,01
Energia Bruta (kcal/kg)*	3873	3955	0,0004	9,60	1,24

*Efeito significativo pelo teste F ($P < 0,05$) na linha; P- Probabilidade; EP- Erro padrão; CV (%) Coeficiente de variação

Essa condição pode ser uma consequência da grande disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura Conway (WALNE, 1966), uma vez que compostos nitrogenados são utilizados pelas microalgas para biossíntese de proteínas e aminoácidos (HORNES et al., 2010), o que pode ter propiciado a *D. salina* elevada produção de proteínas e menor síntese de carboidratos e lipídeos.

Concentrações relativamente baixas de carboidratos e lipídeos refletem o acoplamento entre o metabolismo de carbono e de nitrogênio, pois a acumulação de nitrogênio e proteínas naturalmente acarreta redução de substâncias de reserva (CAMPOS et al., 2010). Por sua vez, relação inversa foi observada no meio salino, onde os baixos teores dos compostos nitrogenados propiciaram maiores teores de lipídios e açúcares.

A energia bruta é o ponto de partida para avaliação energética do alimento e nutrientes, apresentando relação inversa entre gordura, a proteína e açúcares (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). Essa relação inversamente proporcional foi verificada nesse estudo, e o meio salino propiciou biomassa microalgal com maior valor energético.

Os conteúdos de macro e micronutrientes da biomassa da *D. salina* nos dois meios de cultivos observados (Tabela 3). Observou-se diferença entre as biomassas dos meios de cultivo para o nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), Magnésio (Mg) e Zinco (Zn).

Tabela 3. Conteúdo de macro e micronutrientes (em base seca) da biomassa da *Dunaliella salina* em dois meios cultivos

Nutrientes (mg/g)	Meio Conway	Meio Salino	P	EP	CV(%)
Nitrogênio (N)*	9,67	8,86	0,0321	0,26	1,76
Fósforo (P)*	6,66	8,40	0,0020	0,24	2,79
Potássio (K)*	123,66	128,33	0,0004	0,24	1,07
Sódio (Na)	83,66	84,10	0,5624	0,44	1,49
Cálcio (Ca)	61,23	60,70	0,4190	0,73	1,19
Magnésio (Mg)*	28,97	29,63	0,0421	0,27	1,93
Cobre (Cu)	2,36	2,50	0,6507	0,33	13,73
Zinco (Zn)*	6,56	8,23	0,0040	0,34	4,64
Ferro (Fe)	48,03	45,50	0,0008	0,34	1,73
Manganês (Mn)	24,43	24,26	0,5593	0,39	1,58

*Efeito significativo pelo teste F ($P < 0,05$) na linha; P- Probabilidade; EP- Erro padrão; CV(%) Coeficiente de variação

O nitrogênio é componente básico na formação de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes, constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário e pode ser encontrado em concentrações variáveis no interior das células algáceas na forma inorgânica, nitrito, nitrato e amônio (BOUGARAN et al., 2010). As concentrações de proteínas e clorofilas nas células são diretamente proporcionais ao suprimento de nitrogênio (LOURENÇO, 2006), sendo então justificado o maior teor desse macronutriente na biomassa obtida pelo meio de cultivo mixotrófico Conway, pois esse apresenta maior teor de compostos nitrogenados quando comparado ao meio salino.

O teor de fósforo observado na biomassa microalgal do meio salino foi superior ao meio Conway, Assim como o nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes para as microalgas. Ele é importante na regulação do metabolismo celular (síntese de lipídeos e carboidratos) e no fornecimento de fosfatos para a geração de energia e na constituição de moléculas estruturais como ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). Dessa forma, esse resultado está perfeitamente correlacionado com teor de lipídios observado para o meio salino, que também foi superior ao meio Conway.

O potássio é regulador da pressão osmótica, estimula a respiração em pH reduzido, é cofator de várias enzimas e na co-formação e estabilidade de proteínas, enquanto o magnésio é elemento essencial para as microalgas por ser constituinte da molécula de clorofila, é cofator de várias enzimas, participa na ativação das enzimas glicolíticas, estimula a síntese de ácidos graxos essenciais, regula os níveis iônicos celulares e, quando há deficiência, ocorre a perda do conteúdo pigmentar da célula, processo denominado clorose (LOURENÇO, 2006). O zinco é componente estrutural da anidrase carbônica (transporte e fixação de CO₂), de enzimas envolvidas na transcrição do DNA e da fosfatase alcalina (SAHA et al., 2003). A presença desses minerais em maior quantidade na biomassa microalgal inoculada em meio salino pode estar associada as concentrações iniciais desses macros e micronutrientes naturalmente presentes nesse meio, em comparação ao meio Conway que apenas fornece uma solução de zinco em pequena concentração em sua composição (WALNE, 1966).

Os teores dos principais compostos bioativos presentes na biomassa da *D. salina* em dois meios de cultivo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Teores de compostos bioativos (em base seca) presentes na biomassa da *Dunaliella salina* em dois meios de cultivo

Compostos bioativos	Meio Conway	Meio salino	P	EP	CV(%)
Clorofila a (mg/L)*	60,60	40,93	7,916 ⁻⁰⁸	0,26	1,07
Carotenoides totais (mg/L)*	28,56	34,73	8,54e ⁻⁰⁶	0,26	1,83
Vitamina C (mg/100g)*	490,50	503,13	3,25e ⁻⁰⁶	0,42	1,08
Polifenóis extraíveis totais (mg/100g)*	70,96	81,00	9,09e ⁻⁰⁶	0,43	1,57
Antocianinas (mg/100g)*	27,70	30,87	0,0022	0,56	1,91
Flavonoides amarelos (mg/100g)*	41,40	45,30	9,09e ⁻⁰⁶	0,43	1,99

* Efeito significativo pelo teste F (P<0,05) na linha; P- Probabilidade; EP- Erro padrão; CV(%) Coeficiente de variação

As concentrações de proteínas e clorofilas nas células são diretamente proporcionais ao suprimento de nitrogênio, com isso, a diminuição da concentração de proteína ocasiona aumento significativo no percentual de açúcares, enquanto a diminuição da clorofila aumenta a concentração de carotenoides gerando mudança de coloração no cultivo, que tendem ao aspecto amarelado (LOURENÇO, 2006). Dessa forma, é possível estabelecer uma correlação entre o teor de nitrogênio presente na biomassa microalgal dos meios de cultivo estudados e as concentrações de clorofila a e

carotenoides totais, onde o meio mixotrófico Conway obteve biomassa com maior teor de nitrogênio, de clorofila a e o meio salino maior teor de açúcares e de carotenoides totais.

Os teores de clorofila a e carotenoides totais dos dois meios de cultivo observados foram superiores aos valores reportados na literatura. Saha et al. (2013) encontraram concentrações de 18,10 e 13,50 mg/L para clorofila a e carotenoides totais, respectivamente. Também observaram que a relação entre clorofila a:carotenoides foi de 1,34, enquanto no presente estudo essa relação foi de 1,83. Tais autores afirmaram que esta relação é um indicativo de condições ideais de estresse e desencadeamento do processo de carotenogênese para algumas espécies de microalga, assim quanto menor o valor obtido através dessa relação, mais intenso é este processo.

Guevara et al. (2005), encontraram valores máximos para clorofila a, 7,00 mg/L, e carotenoides totais, 40,00 mg/L, ao avaliarem cinco diferentes cepas de *D. salina* em lagoas salinas da Venezuela. Por sua vez, Gómez et al. (2003) referenciaram a concentração mínima de 6,90 e máxima de 29,50 mg/L de carotenoides totais na biomassa de *D. salina* ao testarem salinidades crescentes no meio de cultivo. Esse resultado evidencia que fatores como alta salinidade, temperatura, radiação e limitações nutricionais durante o cultivo desencadeiam e intensificam a produção de carotenoides, que por possuírem função antioxidante, funcionam como um mecanismo de defesa celular para essa espécie (GOMÉZ; GONZÁLES, 2005; SAHA et al., 2013).

A biomassa da *D. salina* proveniente do meio salino apresentou maiores concentrações de vitamina C, polifenóis, antocianinas e flavonoides amarelos quando comparado ao meio Conway ($P < 0,05$). Não são relatados na literatura os teores destes compostos em microalgas do gênero *Dunaliella* sp., no entanto, sabe-se que a depleção de alguns nutrientes no meio de cultivo, principalmente do nitrogênio como ocorreu no meio salino, pode desencadear na célula microalgal um mecanismo de combate as espécies reativas de oxigênio através da produção de diversos antioxidantes e de enzimas, como a superóxido dismutase (SAHA et al., 2013).

Embora o interesse por microalgas tenha aumentado significativamente na última década, não são referenciados resultados de pesquisas que avaliaram a microalga *D. salina*, nas mesmas condições de cultivo, ou os mesmos parâmetros apresentados nesse estudo, o que evidencia a relevância do desenvolvimento de pesquisas futuras como forma de fomento à produção de biomassa microalgal para nutrição animal e humana.

4.4. Conclusão

A utilização do meio autotrófico salino para a microalga *Dunaliella salina* resultou numa viável alternativa ao meio mixotrófico Conway, pois propiciou uma biomassa com maiores teores de carotenoides e antioxidantes. Devido ao seu valor nutricional e perfil de compostos bioativos, a biomassa da microalga *D. salina* pode ser destinada à para a nutrição animal e humana.

4.5. Referências

AOAC. International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18 ed. 4 rev. Gaithersburg: AOAC, 2011. 1505p.

BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v.25, p.207–210, 2007. Doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. 2006. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**: Chave para identificação e descrições. 2. ed. São Carlos: RiMa.

BOUGARAN, G.; BERNARD, O.; SCIANDRA, A. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. **Journal of Theoretical Biology**, v. 265, n. 3, p. 443-454, 2010. Doi: 10.1016/j.jtbi.2010.04.018.0

CARVALHO, J. C. M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rates. **Journal of Phycology**, v.40, p.589-597, 2004. Doi: 10.1111/j.1529-8817.2004.03167.x

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. D. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.339-347, 2010.

COÊLHO, A. A. C.; BARROS, M. U. G.; BEZERRA, J. H. C.; DA SILVA, J. W. A.; MOREIRA, R. L.; FARIAS, W. R. L. Crescimento da microalga *Tetraselmis tetraele* e depleção de nitrato em meio de cultivo Guillard f/2 e Conway. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.35, p.163-168, 2013. Doi:10.4025/actascibiols.v35i2.13971

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELA, S.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, p.1959-1967, 2006.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; KOTAMBALLI, N.; MURTHY, C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v.16, n.9, p.389 – 406, 2005. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic, p. 181-207, 1982.

GÓMEZ, P.; BARRIGA, A.; CIFUENTES, A S.; GONZÁLEZ, M. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. **Biological Research**, v.36, p.185-192, 2003. Doi:10.4067/S0716-97602003000200008

GÓMEZ, P. I.; GONZÁLEZ, M. A. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. **Biological Research**, v.38, p.151–162, 2005. Doi:10.4067/S0716-97602005000200005

GUEVARA, M.; LODEIROS, C; GOMEZ, O.; LEMUS, N.; NUÑES, P.; ROMERO, L.; VÁSQUEZ A.; ROSALES, N. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 53, p.331-337, 2005.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natura and carotene – fortified orange juice. **Journal of Food Science**, v. 27, p. 42-49, 1962. Doi:10.1111/j.1365-2621.1962.tb00055.x

HORNES, M.; SILVA, A. G.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Food Science and Technology** (Campinas), v.30, p.364-371, 2010. Doi: [10.1590/S0101-20612010000200012](https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000200012)

LAMERS, P. P.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol.* 26, 631–638, 2008. Doi:10.1016/j.tibtech.2008.07.002

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1390-1393, 1997. Doi:10.1021/jf960282f

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, v.12, p. 343-346, 1967. Doi:10.4319/lo.1967.12.2.0343

LOURENÇO, S. O. 2006. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 587 p.

MUHAEMIN, M.; KASWADJI, R. F. Biomass Nutrient Profiles of Marine Microalgae *Dunaliella salina*. **Jurnal Penelitian Sains**, v. 13, p. 64-67, 2010. Doi:10.1021/jf0010376

OLIVARRÍA, D. F.; CASTILLO, L. R. M.; LÓPEZ, A. M.; ELÍAS, J. A. L. Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. **Biotecnia**, v.12, p.58-66, 2010.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; BALASUBRAMANYAM, D.; RENGASAMY, R. 2007. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. **Microbiological Research**, v.162, p.177–184. Doi: 10.1016/j.micres.2006.03.009

SAHA, S. K.; HAYES, J.; MOANE, S.; MURRAY, P. Tagging of biomolecules with deuterated water (D₂O) in commercially important microalgae. **Biotechnology Letters**, v.35, p.1067–1072, 2013. Doi:10.1007/s10529-013-1176-8

SAHA, S.K., UMA, L., SUBRAMANIAN, G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiology Ecology**, v.45, p. 263–272, 2003. Doi: 10.1016/S0168-6496(03)00162-4

SAID, H. S. Changes in levels of cellular constituents of *Dunaliella parva* associated with inorganic phosphate depletion. Middle. **East Journal of Scientific Research**, v. 4, p. 94-99, 2009.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) KORSIKOV (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n.1, p.111-118, 2009.

STEIN, J. **Handbook of phycological methods**; Culture methods and growth measurements, 1973. Cambridge: University Press.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Análises de vitaminas**: métodos comprovados. Madrid: Paz Montalvo, 1967, 428p.

TANG, Y.; WANG, C. H.; HUANG, D. Analysis of the mineral element contents of axenic and natural *Dunaliella salina*. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v.30, p.1956-1959, 2010.

WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v.25, p.1-53, 1966.

5. PRODUÇÃO, QUALIDADE DE OVOS E MORFOMETRIA INTESTINAL DE POEDEIRAS ALIMENTADAS COM MICROALGA MARINHA.

RESUMO: Para atender um novo perfil de consumidores, que buscam alimentos que forneçam benefícios adicionais à saúde, além de suas funções nutricionais básicas, foram utilizadas estratégias nutricionais para as aves poedeiras que melhoraram o valor nutritivo dos ovos. Nesse contexto, o uso de microalgas em rações de poedeiras vem crescendo nos últimos anos, e por ser a *Dunaliella salina* uma microalga rica em compostos bioativos, objetivou-se avaliar a produção e qualidade dos ovos, bem como a morfometria intestinal de poedeiras alimentadas com a essa microalga marinha. Dessa forma, 120 poedeiras foram alimentadas por 84 dias, divididos em três períodos (28 dias cada), com cinco níveis de inclusão de biomassa de *D. salina* (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%). Determinou-se o desempenho produtivo das galinhas, a qualidade físico-química dos ovos, as alterações morfométricas do intestino delgado e fígado. Os níveis de inclusão da biomassa de *D. salina* tiveram efeito linear sobre o desempenho (peso dos ovos, massa dos ovos, conversão alimentar), parâmetros qualitativos (peso de gema, índice de gema), e físico-químico dos ovos (carotenoides totais, TBARS, e coloração da gema), além de aumentarem os comprimentos das vilosidades e a relação vilo/cripta dos segmentos duodeno e íleo, bem como a metabolização dos carotenoides no fígado. Assim, a inclusão da biomassa da microalga marinha *D. salina* em rações experimentais para poedeiras melhorou o desempenho, a saúde intestinal das aves e a qualidade físico-química dos ovos, além de conferir maior teor de carotenoides, coloração às gemas e protegê-las da oxidação lipídica.

Palavras-chave: Antioxidantes. Carotenoides. *Dunaliella salina*. Fígado. Gema. Pigmentação.

PRODUCTION, EGG QUALITY AND INTESTINAL MORPHOMETRY OF LAYING HENS FED WITH MARINE MICROALGAE.

ABSTRACT: To meet a new consumer profile, who seek foods that provide additional health benefits, in addition to their basic nutritional functions, nutritional strategies were used for laying hens that improved the nutritive value of eggs. In this context, the use of microalgae in laying hens diets has been increasing in recent years, and because *Dunaliella salina* is a microalgae rich in bioactive compounds, the objective was to evaluate production and egg quality, as well the intestinal morphometry of laying hens fed with this marine microalga. Thus, 120 laying hens were fed for 84 days, divided into three periods (28 days each), with five levels of inclusion of biomass of *D. salina* (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1%). The productive performance of the laying hens, the physical-chemical quality of the eggs, the morphometric alterations of the small intestine and liver were determined. The inclusion levels of *D. salina* biomass had a linear effect on the performance (egg weight, egg mass, feed conversion), qualitative parameters (yolk weight, yolk index), and physicochemical parameters of eggs (total carotenoids, TBARS, and yolk color), as well as increasing the villi lengths and the villus/crypt ratio of the duodenum and ileum segments, and the metabolization of carotenoids in the liver. Thus, the inclusion of marine microalgae *D. salina* biomass in experimental diets for laying hens improved the performance, the intestinal health and the physical-chemical quality of the eggs, besides conferring a higher carotenoid content, and protect them from lipid oxidation.

Key words: Antioxidants. Carotenoids. *Dunaliella salina*. Liver. Yolk. Pigmentation.

5.1. Introdução

A busca por alimentos que forneçam benefícios à saúde, além de suas funções nutricionais básicas, aliada a grande oferta e baixo custo de aquisição, fizeram do ovo um alimento funcional em potencial. Ovos contém uma grande variedade de nutrientes essenciais e compostos bioativos que podem contribuir para a saúde humana (MIRANDA et al., 2015). Com apenas 72 kcal, são uma boa fonte de proteína de alto valor biológico, ácidos graxos, vitaminas do complexo B, minerais e colina, e ainda proporcionam menos gordura saturada por grama quando comparada a outra fonte de proteína animal (USDA, 2015).

Para atender a demanda desse novo mercado consumidor, criou-se o conceito de ovos enriquecidos, onde estratégias nutricionais são desenvolvidas através da inclusão de matérias-primas, ingredientes ou de suplementos nutritivos à dieta das aves, resultando num maior valor nutritivo dos ovos (LEESON; CASTON, 2003).

Nesse contexto, o uso de microalgas como ingrediente ou aditivo para rações de poedeiras vem crescendo nos últimos anos, sendo essa uma das mais recentes apostas da indústria de suplementos alimentares, fomentando pesquisas em todo mundo (FRAEYE et al., 2012). Rica em antioxidantes, ácidos graxos, vitaminas, minerais e outros compostos bioativos, a microalga marinha *Dunaliella salina* (OLIVARRÍA et al., 2010), além de ser uma excelente fonte desses nutrientes, apresenta alto poder de pigmentação devido à sua elevada concentração de carotenoides (YE et al., 2008; FU et al., 2013), o que vem a ser mais um atrativo para compor a dieta de galinhas em fase de postura, já que a pigmentação da gema do ovo é um dos atributos sensoriais mais procurados pelos consumidores (CARVALHO et al., 2006; KLJAK et al., 2012).

Embora a *D. salina* possua teores de compostos bioativos desejáveis à nutrição de poedeiras, o mecanismo de digestão, metabolismo e absorção desses nutrientes pelas aves, bem como o padrão de deposição e conseqüentemente, o enriquecimento dos ovos pode não ser proporcional ao nível de inclusão ou período de consumo dessas dietas. Assim, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que possam preencher essas lacunas. Partindo desse princípio, objetivou-se avaliar a produção e qualidade dos ovos, bem como a morfometria intestinal de poedeiras alimentadas com a essa microalga marinha.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Localização experimental

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA-UFERSA 23091.006877/2015-22), e conduzido no setor de Avicultura da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró/RN, Brasil (5° 11' latitude sul, 37° 22' longitude oeste, 16 m altitude). Durante a fase experimental, a temperatura média do ar foi 31,7°C, com umidade de 63,8%.

5.2.2. Aquisição e composição nutricional da biomassa de microalga

A biomassa liofilizada da microalga marinha *D. salina* utilizada nesse estudo foi cultivada (para a produção máxima de carotenoides) e liofilizada pela BASF- The Chemical Company - em águas salinas dos lagos Hutt e Whyalla, no oeste e sul da Austrália, respectivamente.

Após aquisição, uma amostra da biomassa foi submetida às análises de composição química (AOAC, 2011), de carotenoides totais (HIGBY, 1962) e de energia bruta (EB) através de bomba calorimétrica adiabática.

5.2.3. Animais e tratamentos

Foram utilizadas 120 poedeiras comerciais da linhagem Bankiva (GLK Avifran), no período de 40 a 52 semanas de idade e com peso médio 1800g. As aves foram alojadas em gaiolas de arame galvanizado (25x40x30 cm), com bebedouros do tipo “nipple”, comedouros do tipo calha e densidade de uma ave por gaiola. Durante todo o período experimental, as galinhas receberam água à vontade, 120g de ração/ave/dia, sendo fracionadas em duas porções (08:00 e 16:00hs), e não foi adotado qualquer programa de luz artificial.

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 6 repetições de 4 aves por tratamento. O experimento foi dividido em três períodos de quatro semanas cada, totalizando 84 dias. Os períodos 1, 2 e 3 foram

compreendidos entre a 40^a e 44^a, 44^a e 48^a e 48^a e 52^a semanas de idade das aves, respectivamente.

Os tratamentos consistiram de uma ração controle, sem adição da biomassa de *D. salina* (RCO), e as demais rações com níveis crescentes de inclusão da biomassa de *D. salina* 0,25 (R025), 0,50 (R050), 0,75 (R075) e 1% (R1), através da substituição do inerte (areia lavada). Todas as rações foram formuladas de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2011) para linhagens semipesadas, baseadas na produtividade por massa de ovos (Tabela 1).

Tabela 1. Composição em ingredientes (kg) e nutrientes (%) das rações controle (RCO), com 0,25 (R025), 0,50 (R050), 0,75 (R075) e 1% (R1) de inclusão de biomassa de *D. salina*.

Ingredientes (kg)	Rações experimentais				
	RCO	R025	R050	R075	R1
Farelo de soja	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00
Milho moído	55,00	55,00	55,00	55,00	55,00
<i>Dunaliella salina</i>	0,00	0,25	0,500	0,750	1,00
Calcário calcítico	9,05	9,05	9,05	9,05	9,05
Fosfato bicálcico	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
Óleo de soja	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Sal marinho	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix mineral ¹	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico ²	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Salinomicina	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
L-lisina Hd	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
DL-metionina	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Inerte (areia lavada)	1,00	0,75	0,50	0,25	0,00
Nutrientes (%)*					
Matéria seca (MS)	89,64	89,64	89,65	89,65	89,65
Matéria mineral (MM)	2,27	2,32	2,37	2,42	2,47
Extrato etéreo (EE)	7,44	7,46	7,47	7,49	7,50
Fibra detergente neutro (FDN)	10,28	10,29	10,29	10,30	10,30
Fibra detergente ácido (FDA)	4,04	4,04	4,04	4,04	4,04
Proteína bruta (PB)	16,87	17,01	17,16	17,30	17,45
Energia bruta (EB) kcal/kg	2927	2937	2947	2957	2966
Lisina digestível	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09
Metionina digestível	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Cálcio (Ca)	3,92	4,08	4,24	4,40	4,56
Ácido linoleico	3,92	3,94	3,96	3,98	4,00
Fósforo disponível (P _{disp})	0,32	0,35	0,37	0,39	0,41
Cloro (Cl)	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Sódio (Na)	0,21	0,43	0,65	0,87	1,09
Potássio (K)	0,65	0,98	1,30	1,63	1,95

Premix mineral¹ (kg produto) = Fe: 80g; Cu: 10g; Co: 2g; Mn: 80g; Zn: 50g; I: 1g. Premix vitamínico² (kg produto) = vit.A:10.000.000UI.; vit.D3: 2.000.000UI.; vit.E: 30.000UI.; vit.B1: 2 g; vit.B2: 6 g; vit.B6: 4 g; vit.B12:0,015g; ác. pantotênico: 12g; biotina: 0,1g; vit.K3: 3 g; ác. fólico: 1 g; ác. nicotínico: 50,0g; Se:250 mg ; *Calculados de acordo com Rostagno et al. (2011).

5.2.4. Produção e qualidade dos ovos

As variáveis de desempenho das poedeiras foram avaliadas diariamente por meio do consumo de ração (diferença entre a ração fornecida e o peso das sobras; g/ave/dia), produção de ovos (número de ovos dividido pelo número de galinhas por tratamento; %/ave/dia), peso do ovo (g), massa de ovos (através da multiplicação do peso médio dos ovos no período pela percentagem de postura; g/ave/dia) e conversão alimentar (medida em quilogramas de ração consumida por quilogramas de ovos produzidos; kg/kg).

Para avaliação referente à produção, todos os ovos íntegros foram coletados diariamente nas últimas 72 horas de cada período de postura, identificados e armazenados em sala com temperatura controlada (25°C). No dia seguinte foram então pesados, em balança de precisão de 0,01g, para obtenção do peso médio (g).

A avaliação da qualidade dos ovos foi realizada ao final de cada semana durante todo o período experimental. Para isso, todos os ovos de cada repetição foram coletados, e três deles foram selecionados para serem avaliados, aleatoriamente, sendo evitado os ovos quebrados ou trincados (FREITAS et al., 2013). Após serem pesados os ovos foram quebrados cuidadosamente para preservar a integridade da gema. As cascas foram lavadas e após secarem por 24 horas em estufa de circulação forçada de ar (55°C), foram pesadas.

Foram analisadas as características internas dos ovos através do diâmetro do albúmen e da gema com uso de paquímetro digital. Para altura do albúmen e da gema os ovos foram quebrados sobre uma superfície de vidro, por meio de um micrômetro de profundidade digital. O peso da gema e peso da casca foram aferidos através de balança de precisão de 0,01g. O peso do albúmen foi calculado por diferença entre o peso do ovo, peso da gema e da casca.

Os dados da altura do albúmen e do peso dos ovos foram utilizados no cálculo do valor da unidade Haugh (UH), pela equação descrita por Pardi (1977), $UH = 100 \log (H + 7,57 - 1,7 W^{0,37})$, onde H é a altura do albúmen (mm), e W é o peso do ovo em g. Por sua vez, o índice de gema foi calculado dividindo-se a altura da gema pelo seu diâmetro (Lana et al., 2017).

Para determinação da coloração, logo após a quebra e a realização das análises de qualidade iniciais, as gemas foram, inicialmente, classificadas pelo método tradicional, utilizando o leque colorimétrico (DSM Yolk Color fan). Posteriormente, a coloração da gema foi verificada com auxílio do espectrofotômetro Minolta CM-700d, que utiliza o

sistema CIELab (L^* , a^* e b^*). Foram avaliados os parâmetros luminosidade (L^*), intensidade de vermelho (a^*) e intensidade de amarelo (b^*).

O teor de carotenoides totais (mg/L) e o pH foram determinados ao final de cada período de postura, onde foram selecionados aleatoriamente três ovos por repetição, realizado um *pool* das gemas para extração dos carotenoides de acordo com Higby (1962) e homogeneização do albúmen para medição do pH através de um pHmetro digital munido de eletrodo e haste inoxidável de penetração (em triplicata).

A oxidação lipídica foi avaliada por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pelo método de extração ácido aquosa, conforme Kang et al. (2001). Ao final de cada período de postura, foram coletados os ovos produzidos dos últimos cinco dias, dos quais foram selecionados aleatoriamente cinco ovos por repetição. As gemas foram separadas da clara, colocadas em béquer, homogeneizadas e levadas para análise. O número de substâncias reativas na amostra foi expresso como miligrama de malonaldeído por quilograma de gema (FREITAS et al., 2013).

5.2.5. Abate dos animais

Ao final do 3º período, após jejum de 12 horas, 6 aves de cada tratamento foram submetidas à eutanásia em abatedouro certificado seguindo protocolo de abate comercial, com insensibilização elétrica (55 volts por 10 segundos) e sangria através de um corte unilateral na veia jugular e artéria carótida. Posteriormente realizou-se a coleta dos segmentos do intestino delgado e fígado.

5.2.6. Morfometria intestinal e saturação dos hepatócitos

Para análise morfométrica do intestino coletou-se fragmentos de 2 cm da porção medial das três regiões do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo). Os seguimentos foram fixados em solução de Bouin e cortados com 5 μ m de espessura, posteriormente corados com hematoxilina e eosina (HE), seguindo o processamento histológico padrão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os cortes foram examinados com analisador de imagem, que permitiu avaliar o efeito dos tratamentos sobre o epitélio intestinal e altura das vilosidades. A altura da vilosidade foi medida a partir da região basal do vilão, coincidente com a porção superior das criptas, até ao seu ápice. As criptas foram medidas

da sua base até a região de transição cripta:vilosidade (PELICANO et al., 2003). A relação vilo:cripta foi determinada dividindo-se o comprimento da vilosidade pela profundidade da cripta.

O tecido hepático foi fixado em solução de formaldeído e processados segundo a técnica clássica de inclusão em parafina. Com o uso de micrótomo rotativo, cortes de 7 μm foram obtidos e corados com HE. As lâminas de fígado foram avaliadas quanto à possíveis saturações dos hepatócitos por carotenoides, considerando as alterações presentes nas duas amostras de cada ave (lobos hepáticos).

5.2.7. Análise estatística

Os dados obtidos na avaliação produtiva, qualidade, parâmetros físico-químicos dos ovos e morfometria intestinal foram submetidos à análise de variância e, quando houve diferença significativa, à regressão polinomial ($P < 0,05$). Para avaliação da saturação dos hepatócitos por carotenoides utilizou-se o teste Cramer-von Mises (normalidade), teste Qui-quadrado para testar a independência das variáveis através das frequências e, posteriormente, o teste não paramétrico Exato de Fisher ($P < 0,05$). Os dados foram avaliados através do software estatístico R – Development Core Team (2011).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1 Composição nutricional da microalga *D. salina*

A composição nutricional observada para biomassa da microalga de *D. salina* encontra-se na tabela 2. Tal composição nos permite inferir que a microalga pode não apenas ser um aditivo, ao levar em consideração o teor de carotenoides totais como fonte de antioxidantes e pigmentantes, como também pode vir a substituir parcialmente a fonte proteica e energética das rações para poedeiras. Valores semelhantes foram reportados por Becker (2004), para biomassa de *D. salina* (concentrações de 57% de PB e 7% de EE).

Tabela 2. Composição nutricional da biomassa de *Dunaliella salina*

Nutrientes (%)	Biomassa de <i>D. salina</i>
Matéria seca	99,40
Proteína bruta	58,60
Extrato etéreo	5,87
Fibra Detergente Neutro	1,90
Fibra Detergente Ácido	0,38
Carotenoides totais (mg/L)	29,8
β -caroteno*	10,0
α -caroteno*	3,5
Luteína, zeaxantina e criptoxantina*	2,0
Ácido linoleico*	7,7
Energia bruta (kcal/kg)	3906

*Níveis de garantia informados pela BASF-The Chemical Company

5.3.2 Desempenho e qualidade dos ovos

Nos três períodos de produção, a inclusão de até 1% de biomassa da microalga *D. salina* às dietas, não alterou o desempenho das aves em relação ao consumo de ração e produção de ovos (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros produtivos de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais durante 3 períodos de postura (28 dias cada)

Parâmetros Produtivos	Inclusão da biomassa de <i>D. salina</i> na dieta (%)					Análise estatística			
	0	0,25	0,50	0,75	1,00	ER	CV (%)	EP	P
1° Período (40 a 44 semanas)									
Consumo de ração (g/ave/dia)	107,73	108,66	108,06	108,33	108,73	NS	7,88	3,11	0,8880
Produção de ovos (%/ave/dia)	85,95	87,61	87,14	87,61	88,81	NS	9,65	3,93	0,6791
Peso do ovo (g) ¹	53,27	56,60	57,80	59,80	61,60	RL	13,99	2,39	0,0001
Massa de ovos (g) ²	46,16	49,05	51,33	53,96	55,44	RL	16,34	2,09	0,0001
Conversão alimentar (kg/kg)	2,03	1,93	1,87	1,81	1,76	NS	11,56	0,09	0,6500
2° Período (44 a 48 semanas)									
Consumo de ração (g/ave/dia)	108,60	108,80	108,26	109,07	108,93	NS	7,85	2,55	0,6555
Produção de ovos (%/ave/dia)	86,19	87,25	87,34	87,48	87,86	NS	9,90	4,23	0,4511
Peso do ovo (g) ³	56,87	57,93	60,27	61,87	64,00	RL	13,99	2,77	0,0001
Massa de ovos (g) ⁴	47,16	50,76	52,52	54,21	56,84	RL	17,03	2,46	0,0001
Conversão alimentar (kg/kg) ⁵	1,98	1,88	1,79	1,77	1,71	RL	12,08	0,08	0,0001

3º Período (48 a 52 semanas)									
Consumo de ração (g/ave/dia)	108,87	109,47	109,07	108,60	108,80	NS	7,15	2,03	0,5472
Produção de ovos (%/ave/dia)	86,90	86,67	86,79	83,33	88,81	NS	9,76	3,76	0,0791
Peso do ovo (g) ⁶	57,13	58,20	61,33	62,66	65,80	RL	14,00	1,93	0,0001
Massa de ovos (g) ⁷	49,24	50,16	52,43	53,57	57,81	RL	17,29	1,80	0,0001
Conversão alimentar (kg/kg) ⁸	1,91	1,88	1,78	1,73	1,66	RL	11,87	0,06	0,0001

¹($y = 53,840 + 7,947x$, $R^2 = 0,59$); ²($y = 46,498 + 9,384x$, $R^2 = 0,72$); ³($y = 55,35 + 8,88x$, $R^2 = 0,57$); ⁴($y = 47,736 + 9,122x$, $R^2 = 0,64$); ⁵($y = 1,9597 - 0,2655x$, $R^2 = 0,55$); ⁶($y = 56,67 + 8,72x$, $R^2 = 0,72$); ⁷($y = 48,534 + 8,214x$, $R^2 = 0,73$); ⁸($y = 1,921 - 0,259x$, $R^2 = 0,67$); ER= Equação de Regressão; CV= Coeficiente de variação; Erro padrão da média; Probabilidade; NS - Análise de regressão polinomial não significativa ($P > 0,05$); RL- Regressão linear ($P < 0,05$).

A quantidade de alimento ingerido voluntariamente pelas aves está diretamente relacionada à palatabilidade (LEESON; SUMMERS, 2001; FREITAS et al., 2013), à fração fibrosa e ao teor energético da ração (FERNANDES et al., 2015).

Não havendo diferença significativa para o parâmetro consumo, pode-se inferir que a adição dos níveis crescentes da biomassa de *D. salina* não alterou significativamente a palatabilidade, ou os valores de energia bruta e fração fibrosa das rações experimentais. Embora a *D. salina* seja uma microalga de elevado valor proteico, e a sua inclusão em níveis de até 1% nas dietas tenha elevado o teor de proteína bruta das rações, esse aumento isoladamente não foi suficiente para interferir na produção de ovos.

Adicionalmente, ressalta-se que o fato das dietas serem isonutritivas (com exceção do teor de proteína bruta), bem como o consumo semelhante das rações experimentais, podem ter contribuído para que produção de ovos não sofresse influência das dietas. Resultados semelhantes foram observados por Pavan et al. (2005) que ao testarem níveis de proteína bruta e aminoácidos sulfurados sobre o desempenho de poedeiras, não observaram alteração na postura.

Verificou-se efeito linear com a inclusão de até 1% de biomassa de *D. salina* nas rações experimentais (Tabela 3) para os parâmetros peso (g) e massa de ovos (g) nos períodos de postura 1 ($y = 53,840 + 7,947x$, $R^2 = 0,59$ e $y = 46,498 + 9,384x$, $R^2 = 0,72$, respectivamente), 2 ($y = 55,35 + 8,88x$, $R^2 = 0,57$ e $y = 47,736 + 9,122x$, $R^2 = 0,64$, respectivamente) e 3 ($y = 56,67 + 8,72x$, $R^2 = 0,72$ e $y = 48,534 + 8,214x$, $R^2 = 0,73$, respectivamente).

Esse aumento observado no peso e massa de ovos pode ser atribuído ao maior teor de carotenoides e compostos lipídicos disponibilizados às poedeiras através da inclusão da biomassa de *D. salina* nas rações R025, R050, R075 e R1, que ao serem absorvidos no intestino são transferidos ao fígado e tecidos através dos portomícrons, e à gema do ovo pelas lipoproteínas modificadas para deposição nas gemas, ou VLDLg,

(BJORNEBOE et al., 1990; ROCHA, 2011). Esses compostos presentes em maior quantidade elevam o peso da gema e consequentemente, o próprio peso do ovo, que também é fator constituinte para determinar a massa de ovos.

Não foi observado efeito da inclusão da microalga na dieta sobre a conversão alimentar no 1º período de postura (Tabela 3), enquanto houve efeito linear para os períodos 2 ($y=1,9597 - 0,2655x$, $R^2=0,55$) e 3 ($y=1,921 - 0,259x$, $R^2=0,67$). Como a conversão alimentar é um parâmetro que depende do consumo de ração e peso dos ovos, o fato da inclusão da biomassa não ter afetado o consumo desencadeou a ausência de efeito significativo para a conversão no primeiro período de postura.

Por sua vez, o aumento do peso dos ovos observados para todos os tratamentos nos períodos 2, 3, considerado uma consequência natural ocasionada pelo avanço da idade das aves (GARCIA et al., 2010), promoveu uma melhora da conversão alimentar de acordo com o nível crescente de *D. salina* nas rações.

Quanto aos parâmetros qualitativos dos ovos (Tabela 4), não foram observados efeitos da inclusão de até 1% da biomassa de *D. salina* nas rações para peso da casca, albúmen ou Unidade Haugh em nenhum dos períodos de postura avaliados.

Tabela 4. Parâmetros qualitativos de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais durante 3 períodos de postura (28 dias cada)

Parâmetros Qualitativos	Inclusão da biomassa de <i>D.salina</i> na dieta (%)					Análise estatística			
	0	0,25	0,50	0,75	1,00	ER	CV (%)	EP	P
1º Período (40 a 44 semanas)									
Casca (g)	7,50	6,83	8,17	7,50	7,0	NS	15,80	0,95	0,7872
Gema (g) ¹	15,66	16,06	17,00	18,53	19,93	RL	13,45	0,99	0,0001
Albúmen (g)	30,33	35,50	32,33	33,17	35,00	NS	16,15	2,64	0,3865
Índice de gema ²	0,39	0,42	0,45	0,48	0,51	RL	14,84	0,01	0,0001
Unidade Haugh	89,99	90,86	91,69	90,32	89,75	NS	17,65	3,02	0,6773
2º Período (44 a 48 semanas)									
Casca (g)	6,17	6,83	6,67	7,00	7,50	NS	14,67	0,99	0,8480
Gema (g) ³	15,40	16,47	17,13	18,73	20,00	RL	14,30	0,92	0,0001
Albúmen (g)	32,67	34,50	36,00	37,33	34,33	NS	17,10	2,66	0,0833
Índice de gema ⁴	0,39	0,42	0,45	0,48	0,51	RL	13,80	0,01	0,0001
Unidade Haugh	90,89	91,09	90,76	90,09	90,69	NS	19,60	2,89	0,5530
3º Período (48 a 52 semanas)									
Casca (g)	8,50	7,17	7,17	8,16	7,33	NS	15,65	1,09	0,3538
Gema (g) ⁵	15,60	17,0	17,73	18,93	20,33	RL	13,50	0,81	0,0001
Albúmen (g)	30,83	33,17	36,67	35,00	33,50	NS	16,90	2,75	0,0534
Índice de gema ⁶	0,39	0,42	0,45	0,49	0,51	RL	14,20	0,01	0,0001
Unidade Haugh	91,93	91,28	90,99	90,13	90,19	NS	18,89	2,89	0,0536

¹($y= 15,24 + 4,40x$, $R^2= 0,71$); ²($y= 0,3885 + 0,1222x$, $R^2=0,94$); ³($y= 15,253 + 4,587x$, $R^2=0,76$); ⁴($y= 0,3904 + 0,1215x$, $R^2=0,91$); ⁵($y= 15,64 + 4,56x$, $R^2=0,80$); ⁶($y= 0,3907 + 0,1242x$, $R^2=0,97$); ER= Equação de Regressão; CV= Coeficiente de variação; Erro padrão da média; Probabilidade; NS - Análise de regressão polinomial não significativa ($P>0,05$); RL- Regressão linear ($P<0,05$).

A ausência de influência significativa de fontes naturais de antioxidantes e compostos bioativos sobre parâmetros qualitativos dos ovos, como peso da casca e albúmen, é comum (ÖZEKU et al., 2011; BOZKURT et al., 2012; FREITAS et al., 2013), principalmente devido aos baixos níveis de inclusão nas dietas das poedeiras.

Sabe-se que Unidade Haugh é uma medida que faz correlação entre altura de albúmen e peso do ovo, e quanto maior o valor obtido maior será a qualidade do mesmo, sendo característica de ovos fresco ou livres do processo de oxidação proteica e lipídica valores superiores a 70 (FIGUEIREDO et al., 2011). O uso de antioxidantes em dietas para aves pode retardar esse processo natural de oxidação dos componentes do ovo, no entanto, muitos não possuem ação direta sobre o albúmen, e dessa forma não possuem influência sobre a Unidade Haugh, como pôde ser observado nesse estudo. Todos os ovos avaliados apresentaram Unidade Haugh acima de 70, ou seja, considerados frescos e de excelente qualidade (USDA, 2000).

A inclusão de até 1% da microalga *D. salina* nas rações experimentais propiciou efeito linear sobre o peso da gema e índice de gema (Tabela 4) nos períodos de postura 1 ($y = 15,24 + 4,40x$, $R^2 = 0,71$ e $y = 0,3885 + 0,1222x$, $R^2 = 0,94$, respectivamente), 2 ($y = 15,253 + 4,587x$, $R^2 = 0,76$ e $y = 0,3904 + 0,1215x$, $R^2 = 0,91$) e 3 ($y = 15,64 + 4,56x$, $R^2 = 0,80$). O aumento do peso da gema observado em resposta aos níveis crescente de biomassa nas dietas pode ser atribuído a maior quantidade de carotenoides transferidos à gema ou estar relacionado a maior deposição de elementos como as proteínas e os lipídeos (CARNEIRO et al., 2013), promovido pelos pigmentos existentes naturalmente na microalga.

Por sua vez, o índice de gema por ser uma relação entre a altura e o diâmetro da gema, sofre também a influência desses compostos lipídicos presentes na *D. salina* que mantem a gema mais consistente, com menor diâmetro e maior altura. Valores desejáveis para o índice de gema encontram-se entre 0,30 e 0,50 (LANA et al., 2017), dessa forma, os valores observados para esse parâmetro estão dentro dos padrões estabelecidos para todos os tratamentos.

Observou-se efeito linear para o teor de carotenoides totais presentes na gema dos ovos com a inclusão de até 1% da biomassa de *D. salina* nas rações experimentais (Tabela 5) para os períodos de postura 1 ($y = 195,1 + 234,5x$, $R^2 = 0,97$), 2 ($y = 197,1 + 245,9x$, $R^2 = 0,97$) e 3 ($y = 185,1 + 270,6x$, $R^2 = 0,88$).

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais durante 3 períodos de postura (28 dias cada)

Parâmetros Físico-químicos	Inclusão da biomassa de <i>D.salina</i> na dieta (%)					Análise estatística			
	0	0,25	0,50	0,75	1,00	ER	CV (%)	EP	P
1° Período (40 a 44 semanas)									
Carotenoides totais (mg/L) ¹	190,1	246,6	323,1	390,5	411,3	RL	2,53	14,02	0,0001
pH	7,55	7,70	7,62	7,67	7,71	NS	10,81	0,16	0,1642
TBARS (mg de MDA/kg) ²	0,98	0,91	0,85	0,79	0,64	RL	3,78	0,02	0,0001
Yolk color (Leque DSM) ³	5,33	7,17	14,33	15,0	15,0	RL	3,40	1,95	0,0001
L*	54,24	56,12	52,28	50,64	49,10	NS	5,20	4,30	0,1667
a* ⁴	3,69	19,67	27,71	29,99	31,16	RL	4,85	4,99	0,0001
b*	34,15	40,99	35,30	35,81	33,16	NS	4,60	4,55	0,2338
2° Período (44 a 48 semanas)									
Carotenoides totais (mg/L) ⁵	189,1	250,3	339,3	399,5	421,9	RL	7,26	16,5	0,0001
pH	7,63	7,68	7,68	7,70	7,63	NS	1,98	0,17	0,9384
TBARS (mg de MDA/kg) ⁶	0,97	0,91	0,85	0,79	0,65	RL	4,13	0,02	0,0001
Cor da gema (Leque DSM) ⁷	5,33	7,17	14,33	15,0	15,0	RL	3,80	1,95	0,0001
L*	53,21	46,30	49,48	49,63	45,19	NS	4,90	7,12	0,1779
a* ⁸	4,41	21,81	25,89	28,10	32,37	RL	3,85	4,39	0,0001
b*	32,45	31,68	33,10	37,13	26,64	NS	4,35	5,49	0,3906
3° Período (48 a 52 semanas)									
Carotenoides totais (mg/L) ⁹	162,6	261,9	344,5	403,1	430,1	RL	3,56	36,25	0,0001
pH	7,57	7,68	7,78	7,73	7,77	NS	9,33	0,14	0,4198
TBARS (mg de MDA/kg) ¹⁰	0,99	0,90	0,85	0,78	0,64	RL	3,18	0,02	0,0001
Cor da gema (Leque DSM) ¹¹	6,33	13,5	15,0	15,0	15,0	RL	3,70	2,19	0,0001
L*	62,71	52,68	49,14	51,50	49,79	NS	4,55	4,06	0,1774
a* ¹²	3,47	24,34	30,94	32,07	33,95	RL	3,90	6,17	0,0001
b*	36,97	35,46	35,67	36,64	33,71	NS	4,28	2,66	0,1313

¹(y= 195,1 + 234,5x, R²= 0,97); ²(y= 0,9956 - 0,3194x, R²= 0,95); ³(y= 5,933 + 10,867x, R²=0,81); ⁴(y= 9,387 + 26,113x, R²=0,79); ⁵(y= 197,1 + 245,9x, R²=0,97); ⁶(y= 0,9861 - 0,3069x, R²=0,95); ⁷(y= 5,933 + 10,867x, R²=0,81); ⁸(y= 9,954 + 24,887x, R²=0,81); ⁹(y= 185,1 + 270,6x, R²=0,88); ¹⁰(y= 0,9985 - 0,3325x, R²=0,97); ¹¹(y= 9,200 + 7,533x, R²=0,61); ¹²(y= 11,22 + 27,47x, R²=0,73); ER= Equação de Regressão; CV= Coeficiente de variação; Erro padrão da média; Probabilidade; NS - Análise de regressão polinomial não significativa (P>0,05); RL- Regressão linear (P<0,05).

Foi observado, também, que os períodos de postura subsequentes apresentaram maior teor dos carotenoides totais dentro dos tratamentos com a inclusão da microalga, indicando que a concentração desses compostos na gema ocorre de forma progressiva. Os carotenoides são compostos de grande importância dietética e não podem ser sintetizados pelos animais e, portanto, devem ser obtidos a partir da dieta, tanto de fontes naturais como sintéticas (GARCIA et al., 2002; BREITHAUPT, 2007). Esses compostos atuam não somente como precursores da vitamina A, mas também como moléculas que participam dos mecanismos de proteção celular, além de conferir cor aos alimentos, sendo

esse um dos primeiros atributos percebidos pelo consumidor e que influenciam diretamente a intenção de compra dos produtos alimentícios (RAO; RAO, 2007). Diante do exposto, a inclusão da microalga *D. salina*, fonte natural de carotenoides, teve efeito positivo sobre a concentração desse composto na gema.

Com a inclusão de até 1% da biomassa de *D. salina* nas rações experimentais, não foi observado efeito sobre o pH do albúmen em nenhum dos períodos avaliados (Tabela 5). Os valores médios de pH observados para todos os tratamentos encontram-se dentro da normalidade. Segundo Barancelli et al. (2012), os ovos começam a apresentar elevação do pH do albúmen 72 horas após a postura passando de 7,8 para 9,6, devido à perda de ácido carbônico que é um dos componentes do sistema tampão do albúmen. Dessa forma, como os ovos foram avaliados 24 horas após a postura, a dissociação desse ácido em água e gás carbônico, com conseqüente liberação do gás para o meio através dos poros do ovo, não foi significativa para alterar o pH, ou para que algum composto antioxidante presente na biomassa da microalga pudesse influenciar os valores obtidos.

A estabilidade dos lipídios na gema, medida pelos valores de TBARS (Tabela 5), apresentou efeito linear com a inclusão de até 1% da biomassa para os períodos de postura 1 ($y = 0,9956 - 0,3194x$, $R^2 = 0,95$), 2 ($y = 0,9861 - 0,3069x$, $R^2 = 0,95$) e 3 ($y = 0,9985 - 0,3325x$, $R^2 = 0,97$), indicando que os carotenoides presentes na microalga, passados aos ovos através da dieta, foram eficientes em proteger os ovos contra o estresse oxidativo.

Quanto à coloração da gema (Tabela 5), classificadas pelo método tradicional do leque colorimétrico, observou-se efeito linear em resposta à inclusão da microalga nas rações experimentais para os períodos de postura 1 ($y = 5,933 + 10,867x$, $R^2 = 0,81$), 2 ($y = 5,933 + 10,867x$, $R^2 = 0,81$) e 3 ($y = 9,200 + 7,533x$, $R^2 = 0,61$). Foi observado também, que nos períodos 1 (40 a 44 semanas) e 2 (44 a 48 semanas) a coloração da gema atinge o valor máximo do leque colorimétrico a partir da ração R075, o que equivale a 0,75% de inclusão de biomassa da *D. salina*, já no 3º período (48 a 52 semanas), o valor máximo é atingido a partir da ração R050, com a inclusão de 0,50% de biomassa. Esse resultado ratifica o efeito observado para o teor de carotenoides totais presentes na gema, uma vez que a maior deposição desses compostos resulta numa maior pigmentação (BREITHAUPT et al., 2007).

Por sua vez, a coloração determinada através do sistema CIELab respondeu de forma linear à inclusão de até 1% da biomassa nas rações para intensidade de vermelho, a^* , no 1º ($y = 9,387 + 26,113x$, $R^2 = 0,79$), 2º ($y = 9,954 + 24,887x$, $R^2 = 0,81$) e 3º período de postura ($y = 11,22 + 27,47x$, $R^2 = 0,73$).

A predominância dos altos valores de a^* , observada para os tratamentos com a inclusão da *D. salina* (R025, R050, R075 e R1) conferem à gema uma coloração que vai desde o laranja (R025) ao vermelho-alaranjado (R1). A ausência de efeito sobre a luminosidade (L^*), e a intensidade de amarelo (b^*) bem como, a forte pigmentação no tom de vermelho podem ser um indicativo de que os carotenoides incorporados à gema foram predominantemente os carotenos precursores da vitamina A, como o β -caroteno (TALLARICO et al., 2002), constituinte em 10% (base seca) da microalga utilizada nesse estudo.

Esse resultado corrobora com Carvalho et al. (2006), que ao avaliarem a influência da adição de fontes marinhas de carotenoides à dieta de galinhas poedeiras na pigmentação da gema, observaram que a adição de alga à dieta, entre 0,50% e 1,75%, proporcionou progressiva e pigmentação da gema avaliada pelos equivalentes β -caroteno e escore visual.

5.3.3. Morfometria intestinal e saturação dos hepatócitos

A inclusão de até 1% de biomassa da microalga *D. salina* em rações experimentais para poedeiras propiciou aumento linear do comprimento das vilosidades intestinais e da relação altura de vilo/profundidade de cripta (Tabela 6) nos segmentos duodeno ($y = 828,9 + 539,6x$, $R^2 = 0,65$ e $y = 3,276 + 3,678x$, $R^2 = 0,52$, respectivamente) e íleo ($y = 430,1 + 519,5x$, $R^2 = 0,91$ e $y = 425,3 + 4,573x$, $R^2 = 0,84$, respectivamente).

Tabela 6. Morfometria intestinal de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais.

Morfometria intestinal	Inclusão da biomassa de <i>D.salina</i> na dieta (%)					Análise estatística			
	0	0,25	0,50	0,75	1,00	ER	CV (%)	EP	P
Duodeno									
Altura de vilosidade (μm) ¹	801,2	993,1	1108,7	1236,8	1353,7	RL	12,99	142,8	0,0001
Profundidade de cripta (μm)	228,7	261,6	231,6	206,8	202,3	NS	16,61	39,35	0,0676
Relação vilo/cripta ²	3,52	3,85	4,92	6,47	6,81	RL	24,72	1,27	0,0001
Jejuno									

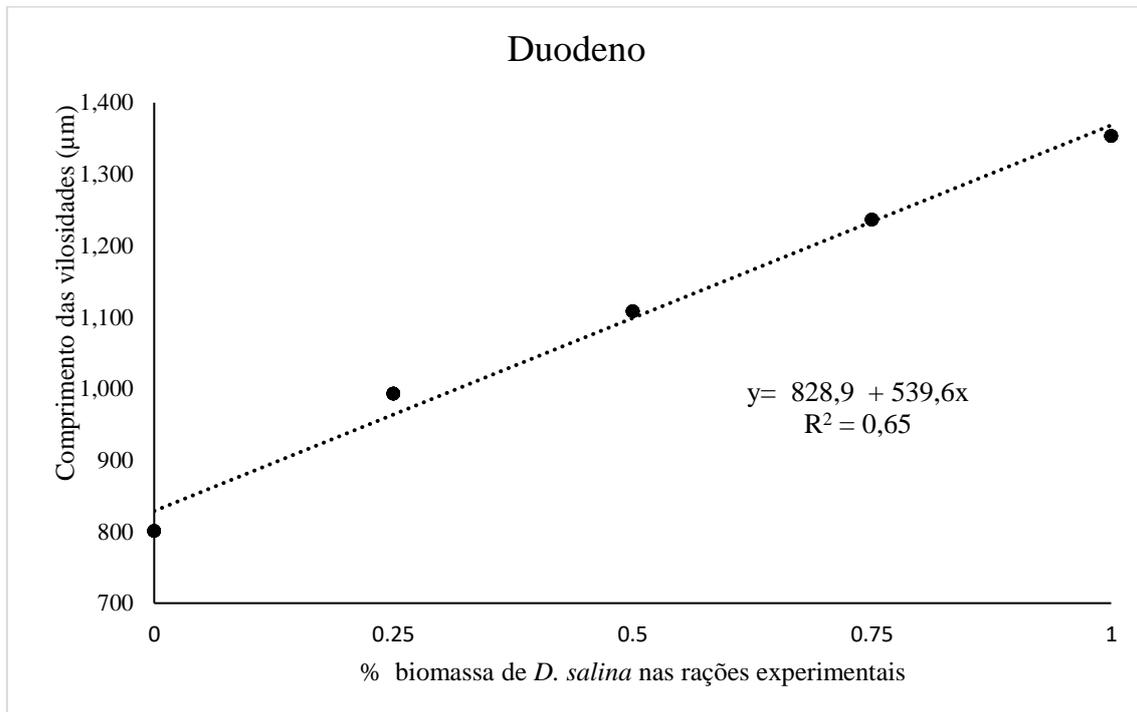
Altura de vilosidade (μm)	707,5	735,4	789,2	879,2	891,9	NS	22,93	178,5	0,9433
Profundidade de cripta (μm)	258,9	249,1	192,3	198,4	184,2	NS	27,51	59,58	0,5229
Relação vilo/cripta	2,74	3,02	4,25	5,22	5,79	NS	21,35	1,79	0,8950
Íleo									
Altura de vilosidade (μm) ³	415,9	587,8	665,2	842,3	938,0	RL	7,80	56,4	0,0001
Profundidade de cripta (μm)	100,7	105,1	119,6	145,3	111,2	NS	25,96	30,22	0,0684
Relação vilo/cripta ⁴	4,01	5,72	6,85	7,05	9,05	RL	21,93	0,71	0,0001

¹($y = 828,9 + 539,6x$, $R^2 = 0,65$); ²($y = 3,276 + 3,678x$, $R^2 = 0,52$); ³($y = 430,1 + 519,5x$, $R^2 = 0,91$); ⁴($y = 425,3 + 4,573x$, $R^2 = 0,84$); ER= Equação de Regressão; CV= Coeficiente de variação; Erro padrão da média; Probabilidade; NS - Análise de regressão polinomial não significativa ($P > 0,05$); RL- Regressão linear ($P < 0,05$).

O desenvolvimento da mucosa intestinal consiste no aumento da altura e densidade das vilosidades intestinais, o que corresponde ao aumento em número de suas células epiteliais (enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas) e, portanto, ao aumento da capacidade digestiva e de absorção do intestino (ZAVARIZE et al., 2011). Alguns compostos agem como agentes tróficos na mucosa intestinal, ou seja, estimulam o processo mitótico na região vilo:cripta, e como consequência aumentam o número de células e o tamanho das vilosidades intestinais (MACARI et al., 2002).

Ressalta-se que ao longo do intestino delgado, a densidade e comprimento das vilosidades, bem como a taxa de renovação celular (*turnover*), não são os mesmos. O duodeno, além de possuir maior altura de vilo, também possui a maior taxa de renovação celular, pois é o primeiro segmento do intestino a receber estímulos físicos, químicos e hormonais com a presença do alimento no lúmen intestinal (MAIORKA et al., 2002), nesse contexto, os antioxidantes presentes na microalga *D. salina* estimularam o *turnover* celular nesse segmento da mucosa intestinal, havendo maior altura das vilosidades na ração R1 (Figura 1).

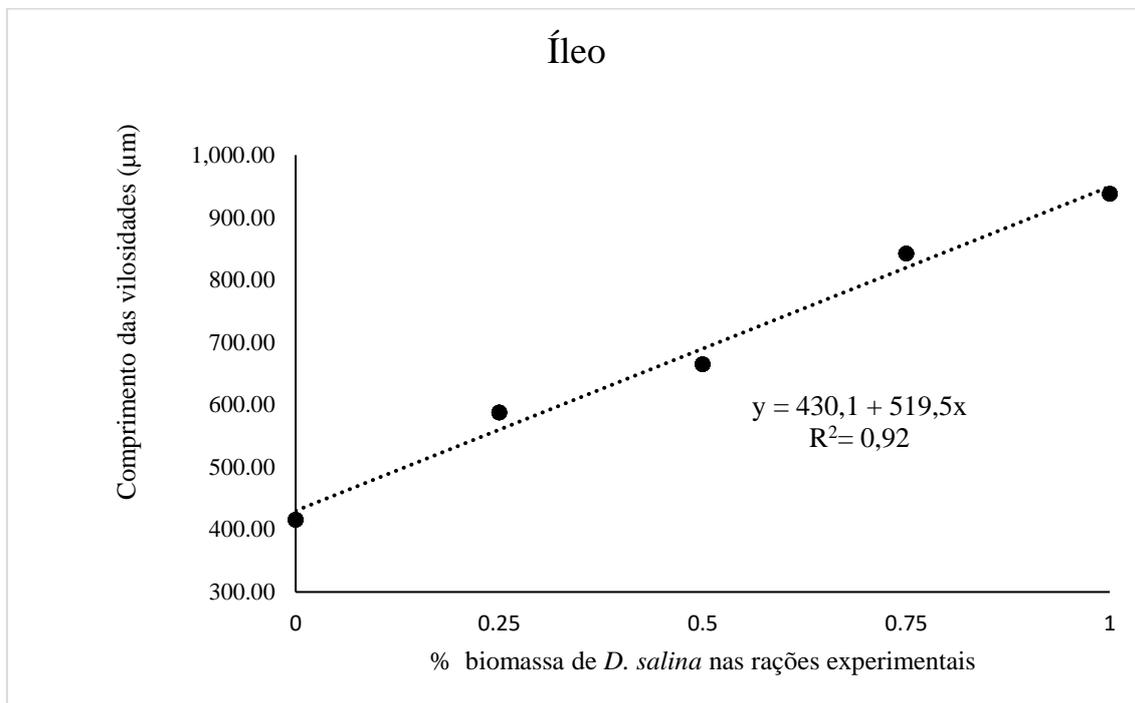
Figura 1. Comprimento das vilosidades do duodeno (μm) de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais



Fonte: Autoria própria.

Por sua vez, na porção jejuno a taxa de renovação celular tende a ser naturalmente menor, o que justifica a ausência de efeito da dieta sobre as vilosidades nesse segmento. O íleo é a porção final do intestino delgado, e nesse segmento ocorre a reabsorção de sais biliares responsáveis pela solubilização das moléculas de lipídios (MACARI et al., 2002), dessa forma, como a biomassa de *D. salina* é fonte de carotenoides (OLIVARRÍA et al., 2010) e esses possuem natureza lipídica, o efeito linear da dieta sobre o comprimento das vilosidades observado (Figura 2) é justificado.

Figura 2. Comprimento das vilosidades do íleo (μm) de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais



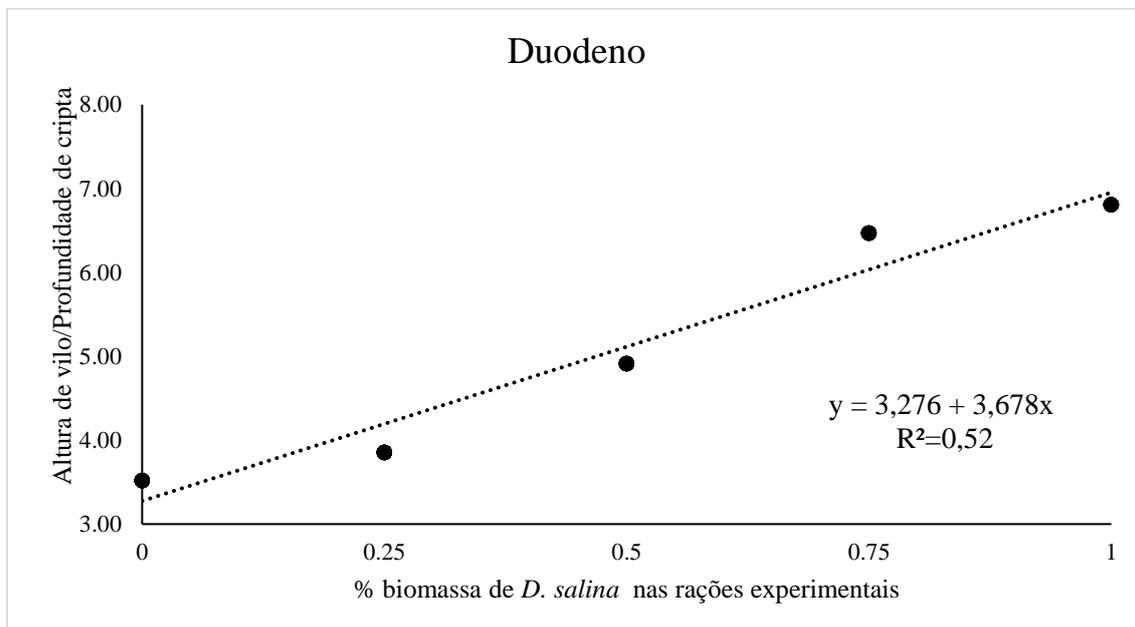
Fonte: Autoria própria.

Não foram observados efeitos da inclusão da biomassa de *D. salina* às dietas sobre a profundidade de cripta em nenhum dos seguimentos do intestino delgado (Tabela 6).

A profundidade da cripta é um indicativo da capacidade compensatória ou hiperplasia das células epiteliais em virtude de um maior nível de agressão à estrutura morfológica da mucosa intestinal causada pelas dietas (ARRUDA et al., 2008).

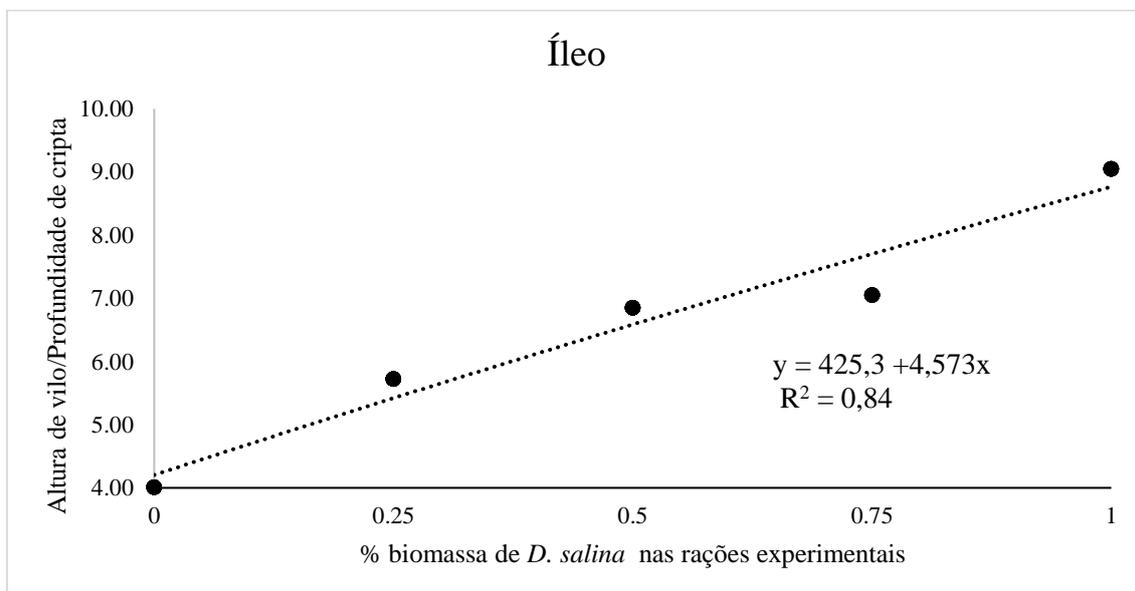
Como não foi observado efeito nesse parâmetro, evidencia-se a ausência de componentes abrasivos nas dietas fornecidas às poedeiras nesse estudo. Por sua vez, o aumento na relação vilo/cripta (Figuras 3 e 4), indica adequada taxa de renovação celular e maior capacidade absorptiva, comprovando efeito positivo da inclusão da microalga nas rações.

Figura 3. Relação altura de vilosidades/profundidade de cripta do duodeno de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais



Fonte: Autoria própria.

Figura 4. Relação altura de vilosidades/profundidade de cripta do íleo de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais



Fonte: Autoria própria

Através da observação histológica realizada no fígado das poedeiras, foi observada uma relação de dependência da saturação dos hepatócitos por carotenoides com a inclusão da biomassa de *D. salina* às rações (Tabela 7).

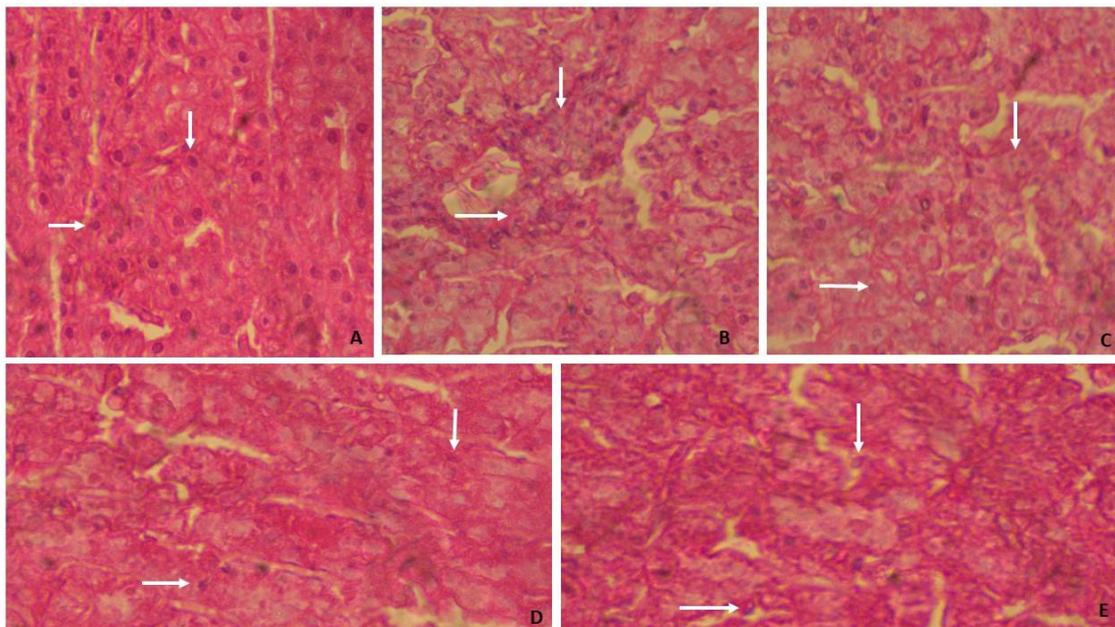
Tabela 7. Saturação de hepatócitos do fígado de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais

Inclusão da biomassa de <i>D. salina</i> nas rações (%)	Saturação dos hepatócitos por carotenoides ^{1*}				P
	Sim		Não		
	N	%	n	%	
0	0	0	6	100	0,0255
0,25	2	33,33	4	66,67	
0,50	4	66,66	2	33,33	
0,75	5	83,33	1	16,67	
1,0	6	100	0	0	

¹Dados submetidos ao teste Qui-quadrado de independência de Pearson e subsequente Teste exato de Fisher; *Saturação dos hepatócitos por carotenoides possui uma relação linear crescente com os níveis de inclusão da biomassa de *D. salina* na dieta de poedeiras de acordo com teste exato de Fisher ($P < 0,05$); n- número de fígados observados; P- probabilidade

A fração lipídica da dieta, incluindo os carotenoides, são absorvidas pelos enterócitos no intestino delgado onde migram para o retículo endoplasmático (do enterócito) para a biossíntese de lipídios complexos. Os carotenoides são bastante hidrofóbicos, necessitando, portanto, serem envolvidos em portomícrons que são liberados pelos enterócitos na veia porta e seguem para o fígado. Uma vez no fígado, os hepatócitos secretam lipoproteínas modificadas para deposição na gema (VLDLg) que farão o transporte desses carotenoides à gema do ovo (CHAMPE et al., 2006). Nesse contexto, uma vez que os hepatócitos participam ativamente do metabolismo de carotenoides e transporte desses à gema, a saturação dessas células corrobora com o efeito linear para o teor de carotenoides nas gemas observado nesse estudo (Figura 5).

Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de poedeiras comerciais alimentadas com níveis crescentes de biomassa de *Dunaliella salina* em rações experimentais. As setas representam: A - Hepatócitos normais (ração RCO); B - Início da saturação de hepatócitos por carotenoides (ração R025); C - Saturação crescente dos hepatócitos por carotenoides (ração R050); D - Mínimo de hepatócitos não saturados por carotenoides (ração R075); E – Saturação plena dos hepatócitos por carotenoides (ração R1). Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 100x.



Fonte: Autoria própria.

Diante de todos os parâmetros de produção, qualidade físico-química dos ovos, morfometria do intestino delgado e fígado avaliados, fica evidente que a inclusão da microalga marinha *Dunaliella salina* em níveis de até 1% em rações para poedeiras comerciais melhorou significativamente parâmetros de grande interesse por parte do setor avícola e da indústria de alimentos, já que os ovos são cada vez mais inseridos no contexto de alimentos funcionais.

5.4. Conclusão

A inclusão da biomassa da microalga marinha *Dunaliella salina* em rações experimentais para poedeiras melhorou o desempenho, a saúde intestinal das aves e a qualidade físico-química dos ovos, além de conferir maior teor de carotenoides, coloração às gemas e protegê-las da oxidação lipídica. A biomassa de *D. salina* pode ser utilizada

de forma segura por período de 84 dias em rações para poedeiras sem que haja prejuízo da função hepática das aves.

5.5. Referências

ARRUDA, A. M. V.; FERNANDES, R. T. V.; SILVA, J. M.; LOPES, D. C. Avaliação morfo-histológica da mucosa intestinal de coelhos alimentados com diferentes níveis e fontes de fibra. **Revista Caatinga**, v.21, p.01-11, 2008.

BECKER, W.: Microalgae in human and animal nutrition, p.312–351. In Richmond, A. (ed.), **Handbook of microalgal culture**. Blackwell, Oxford, 2004.

BJORNEBOE, A.; BJORNEBOE, G.; DREVOH, A. A. Absorption, transport and distribution of vitamin E. **The Journal of Nutrition**, v. 120, n.3, p. 233-242, 1990.

BOZKURT, M.; KÜÇÜKYILMAZ, K.; ÇATLI, A.U.; ÇINAR, M.; BINTAŞ, E.; ÇÖVEN, F. Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental conditions. **Poultry Science**, v.91, p.1379-1386, 2012. Doi: 10.3382/ps.2011-02023.

BRANT, A.W.; OTTE, A.W.; NORRIS, K.H. Recommended standards for scoring and measuring opened egg quality. **Food Technology**, v.5, p.356-361,1951.

BREITHAUPT, D. E. Modern Application of xanthophylls in animal feeding: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, p.501–506, 2007. Doi: 10.1016/j.tifs.2007.04.009

CARNEIRO, J. S. **Pigmentantes de gema: novo método de avaliação de cor e caracterização da produtividade e saúde das poedeiras**. 2013. 107p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2013.

CARVALHO, P. R.; PITA, M. C. G.; PIBER-NETO, E.; MIRANDOLA, R. M. S.; MENDONÇA-JÚNIOR, C. X. Influência da adição de fontes marinhas de carotenoides à dieta de galinhas poedeiras na pigmentação da gema do ovo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 654-663, 2006.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 533p.

FERNANDES, D. P. B.; MORI, C.; NAZARENO, A. C.; PIZZOLANTE, C. C.; MORAES, J. E. Qualidade interna de diferentes tipos de ovos comercializados durante o inverno e o verão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.1159-1165, 2015.

FERNANDES, R. T. V.; ARRUDA, A. M. V.; ARAÚJO, M. S.; MELO, A. S.; MARINHO, J. B. M.; COSTA, M. K. O.; LIMA, H. F. F.; OLIVEIRA, V. R. M.; HOLANDA, J. S. Valor nutricional e digestibilidade do grão de girassol em dietas para frangas e galos Label Rouge. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, p.12-18, 2015. Doi: 10.21708/avb.2015.9.1.4212.

FIGUEIREDO, T. C.; CANÇADO, S. V.; VIEGAS, R. P.; RÊGO, I. O. P.; LARA, L. J. C.; SOUZA, M. R.; BAIÃO, N. C. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n. 3, p. 712-720. 2011. Doi: 10.1590/S0102-09352011000300024

FRAEYE, I.; BRUNEEL, C.; LEMAHIEU, C.; BUYSE, J.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids: A review. **Food Research International**, v.48, p.961-969, 2012. Doi: 10.1016/j.foodres.2012.03.014

FREITAS, E. R.; BORGES, A. S.; TREVISAN, M. T. S.; CUNHA, A. L.; BRAZ, N. M.; WATANABE, P. H.; NASCIMENTO, G. A. J. Extratos etanólicos de manga como antioxidantes na alimentação de poedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p.714-721, 2013. Doi: 10.1590/S0100-204X2013000700003

FU, W.; GUÐMUNDSSON, O.; PAGLIA, G.; HERJÓLFSSON, G.; ANDRÉSSON, O. F.; PALSSON, B. O.; BRYNJÓLFSSON, S. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Biotechnological Products and Process Engineering**, v.97, p.2395-2403, 2013. Doi: 10.1007/s00253-012-4502-5

GARCIA, E. A.; MENDES, A. A.; GONÇALVES, H. C.; OLIVEIRA, R. P.; SILVA, M. A. Efeitos dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos

de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Tecnológica Avícola**, v.4, p.55-61, 2002. Doi: 10.1590/S1516-635X2002000100007

GARCIA, E. R. M.; ORLANDI, C. C. B.; OLIVEIRA, C. A. L.; CRUZ, F. K.; SANTOS, T. M. B.; OTUTUMI, L. K. Qualidade de ovos de poedeiras semipesadas armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção animal**, v. 11, p. 505-518, 2010.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natura and carotene – fortified orange juice. **Journal of Food Science**, v. 27, p. 42-49, 1962. Doi:10.1111/j.1365-2621.1962.tb00055.x

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 427 p.

KANG, K. R.; CHERIAN, G.; SIM, J. S. Dietary palm oil alters the lipid stability of polyunsaturated fatty acid-modified poultry products. **Poultry Science**, v.80, p.228-234, 2001.

KLJAK, K.; DRDIC, M.; KAROLYI, D.; GRBESA, D. Pigmentation Efficiency of Croatian Corn Hybrids in Egg Production. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**, v.7, p.23-27, 2012.

LANA, S.R.V.; LANA, G. R. Q.; SALVADOR, E. L.; QUINTÃO, A. M.; CUNHA, F. S. A.; MARINHO, A. L. Qualidade de ovos de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.18, p.140-151, 2017. Doi:10.1590/S1519-99402017000100013

LEESON, S.; CASTON, L. J. Vitamin Enrichment of Eggs. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, p.24-26, 2003. Doi: 10.1093/japr/12.1.24

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Nutrition of the chicken**. 4th ed.Ontario: University Books, 2001. 591p.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, 2002. 375p.

MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Campinas: FACTA, Fundação Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas, 2002. cap. 8, p. 113-124.

MIRANDA, J. M.; ANTON, X.; REDONDO-VALBUENA, C.; ROCA-SAAVEDRA, P.; RODRIGUES J. A.; LAMAS, A.; FRANCA, C. M.; CEPEDA, A. Egg and egg-derived foods: Effects on human health and use as functional foods. **Nutrients**, v.7, p.706-729, 2015. Doi: 10.3390/nu7010706

OLIVARRÍA, D. F.; CASTILLO, L. R. M.; LÓPEZ, A. M.; ELÍAS, J. A. L. 2010. Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. **Biotecnia**,v.12, p.58-66.

ÖZEKU, K.; WELLMANN, K.T.; ERTEKIN, B.; TARIM, B. Effects of dietary herbal essential oil mixture and organic acid preparation on laying traits, gastrointestinal tract characteristics, blood parameters and immune response of laying in a hot summer season. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.20, p.575-586, 2011.

PAVAN, A. C.; MÓRI, C.; GARCIA, E. A.; SCHERER, M. R.; PIZZOLANTE, C. C. Níveis de proteína bruta e de aminoácidos sulfurados totais sobre o desempenho, a qualidade dos ovos e a excreção de nitrogênio de poedeiras de ovos marrons. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.568-574, 2005. Doi: 10.1590/S1516-35982005000200026

PELICANO, E. R.L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, p. 124-134, 2003.

RAO, A.V; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v.55, p. 207-216, 2007. Doi:10.1016/j.phrs.2007.01.012

ROCHA, J. S. R. **Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário**. 2011. 81p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., DONZELE, J. L., GOMES, P. C., OLIVEIRA, R. F., LOPES, D. C., FERREIRA, A. C., BARRETO, S. L. T., EUCLIDES, R. F., 2011. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 252p.

TALLARICO, N.; SIRRI, F.; MELUZZI, A.; PITTIA, P.; PARPINELLO, G. P.; FRANCHINI, A. Effect of dietary vegetable lipids on functional and sensory properties of chicken eggs. **Italian Journal of Food Science**, v.14, p.159–166, 2002.

USDA. 2015. **National Nutrient Databases for Standard Reference**, Release 27 (Revised) US Department of agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory; Beltsville, MD, USA, 2015.

USDA. 2000. **United States standards, grades, and weight classes for shell eggs**. AMS 56.210. AMS, USDA, Washington, DC.

YE, Z. JIANG, J. WU, G. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, v.26, p. 352–360, 2008. Doi: 10.1016/j.biotechadv.

ZAVARIZE, K. C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; GARCIA, E. A.; CRUZ, V. C. Glutamina na dieta de poedeiras leves submetidas ao estresse pelo calor e à termoneutralidade. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.400-406, 2011. Doi: 10.5216/cab.v12i3.2535

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção da microalga marinha *Dunaliella salina* na região semiárida do nordeste brasileiro pode ser desenvolvida tanto em pequena escala quanto em escala industrial, uma vez que o ambiente estuarino hipersalino característico desta região, e onde esta espécie de microalga desenvolve-se naturalmente, revelou-se uma alternativa viável ao meio de cultura utilizado comercialmente em tanques de cultivo ou biorreatores. Para tanto, faz-se necessário investimentos tecnológicos e científicos, a fim de garantir maior eficiência produtiva e rendimento econômico.

A biomassa da *D. salina*, por ser rica em carotenoides e compostos bioativos, pode ser utilizada na alimentação humana e compor dietas para animais, como as galinhas poedeiras observadas nesse estudo, conferindo maior valor nutritivo e pigmentação aos seus ovos.