

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

ESCUELA DE ZOOTECNIA

Evaluación de la inclusión de la microalga *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras comerciales y su efecto en el desempeño productivo de las aves y las características del huevo.

Geiner Manuel Poveda Víquez

Tesis presentada para optar por el título en el grado académico de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2020

Esta tesis fue aceptada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia.



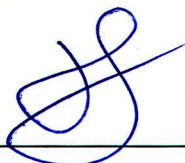
Geiner Poveda Víquez Bach.

Sustentante



Catalina Salas Durán Ph.D.

Directora de tesis



Sergio Salazar Villanea Ph.D.

Miembro del tribunal



Michael López Herrera M.Sc.

Miembro del tribunal



Pamela Castro Flores Lic.

Miembro del tribunal



Rodolfo WingChing Jones M.Sc.

Director de Escuela

## DEDICATORIA

A mi mamá Anabelle y a mi papá Manuel, por amarme, apoyarme, guiarme y enseñarme con su ejemplo que el esfuerzo y la pasión son el camino para cumplir los sueños.

A mis hermanos Marlon y Alejandro, por su apoyo incondicional, por creer en mí y por enseñarme todos los días a ser mejor persona.

A mi compañera de universidad y de vida Allison, por ser la persona que alegra mis días y el apoyo que necesito para materializar mis sueños.

A mis abuelitos José (Papá Chepe) y Rafael (Papá Felo), por amarme y por formar mi carácter y cualidades.

A mis abuelitas Juana (Mamá Juanita) y Vilma (Mamácha), por amarme y poner mi vida en manos de Dios.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme vida y guiarme para culminar esta etapa.

A la PhD. Catalina Salas Durán, por ser mi mentora a lo largo de la carrera y tesis.

Al Lic. Orlando Quesada, por enseñarme y apoyarme durante este proceso y el inicio de mi vida laboral.

A Granja Avícola Los Pollitos, especialmente a Pablo Vásquez y Leonel Vásquez, por permitirme desarrollar el ensayo en su compañía.

A Vetim S.A., por facilitarme sus instalaciones para elaborar el alimento balanceado.

Al Lic. Enrique Conejo, por ser un gran amigo y compañero durante la carrera.

## ÍNDICE GENERAL

Portada.....	i
Hoja de aprobación.....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimiento.....	iv
Indice de cuadros .....	vi
Indice de figuras .....	viii
Resumen .....	ix
Introducción .....	1
Estado actual.....	3
Caracterización de las microalgas.....	3
Composición nutricional .....	3
Efecto de la suplementación con <i>Arthrospira maxima</i> sobre la composición nutricional del huevo.....	5
Efecto de la <i>Arthrospira maxima</i> sobre el perfil lipídico del huevo .....	7
Efecto de la suplementación con <i>Arthrospira maxima</i> sobre la pigmentación de la yema de huevo.....	8
Calidad de huevo .....	11
Objetivos.....	13
Materiales y métodos.....	14
Resultados y discusión .....	20
Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> sobre el rendimiento productivo.....	20
Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> sobre el perfil lipídico del huevo.....	26
Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> sobre la calidad del huevo .....	29
Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> sobre el precio de las dietas .....	34
Conclusiones .....	36
Recomendaciones .....	37
Literatura citada .....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Composición proximal de la biomasa microalgal de <i>Arthrospira maxima</i> (producida en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas) y de la harina de soya.	3
2	Comparación del perfil de aminoácidos de la <i>Arthrospira maxima</i> y la harina de soya.	4
3	Perfil lipídico del huevo de mesa comercial.	6
4	Composición del perfil lipídico de harina de <i>Arthrospira maxima</i> .	7
5	Contenido de pigmentos de la <i>Arthrospira maxima</i> .	10
6	Matriz nutricional de <i>Arthrospira maxima</i> utilizada para la formulación de las dietas experimentales.	15
7	Composición porcentual de las dietas experimentales.	16
8	Composición nutricional (%MS) de las dietas experimentales.	20
9	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la masa de huevo promedio (kg) durante 4 semanas.	20
10	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el porcentaje de postura durante 4 semanas.	21
11	Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad antioxidante de <i>Arthrospira maxima</i> .	22
12	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la conversión alimenticia durante 4 semanas.	24
13	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el porcentaje de huevo tipo A durante 4 semanas.	25

14	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el porcentaje de huevo sucio durante 4 semanas.	26
15	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el perfil lipídico del huevo.	27
16	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el peso de huevo (g) durante 4 semanas	29
17	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el grosor de la cáscara de huevo (mm) durante 4 semanas.	30
18	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la coloración de la yema de huevo según la escala Roche durante 4 semanas.	31
19	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre las unidades Haugh durante 4 semanas.	33
20	Costo del kg de alimento balanceado utilizado para cada uno de los tratamientos durante el periodo experimental.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el consumo de alimento durante 4 semanas.	23
2	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en dietas de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la cantidad de huevos sucios pálidos y quebrados durante 4 semanas.	25
3	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> en dietas de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el comportamiento del contenido de ácidos grasos en huevo durante 4 semanas.	27
4	Efecto de la inclusión de <i>Arthrospira maxima</i> y aceite de soya sobre el extracto etéreo de las dietas de gallinas ponedoras de 52 semanas.	28



## RESUMEN

Dada la elevada dependencia de la industria avícola en Costa Rica a la utilización de materias primas proteicas importadas, y el importante consumo per cápita de huevos en el país, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la inclusión de biomasa microalgal de *Arthrospira maxima* producida en condiciones mixotróficas con cerdaza, en la alimentación de gallinas ponedoras comerciales y su efecto en el desempeño productivo, las características del huevo y el costo final de la dieta. El experimento se llevó a cabo en la Granja Avícola Los Pollitos (Palmares, Alajuela) durante un periodo 28 días, utilizando gallinas ponedoras de 52 semanas de edad de la línea genética Isa Brown. Las aves fueron ubicadas en baterías de jaulas de tres niveles, con 5 gallinas por jaula (una unidad experimental), asignando completamente al azar 5 repeticiones por tratamiento, para un total de 20 unidades experimentales. Se utilizaron 4 niveles de inclusión: 0%, 2%, 4% y 6% de *Arthrospira maxima* y se determinó semanalmente su efecto sobre la masa de huevo promedio, porcentaje de postura, conversión alimenticia, porcentaje de huevo tipo A, peso de huevo, grosor de cáscara y escala de coloración de yema. Asimismo, al finalizar el periodo experimental se evaluó la concentración de ácidos grasos y colesterol en la yema de huevo. Los resultados no demostraron un efecto significativo de ningún nivel de inclusión sobre el desempeño productivo, peso del huevo, grosor de la cáscara ni unidades Haugh. Sin embargo, el aumento en el nivel de inclusión generó un aumento en la coloración de la yema alcanzando valores de 11-12 en la escala Roche por efecto del porcentaje de inclusión y por efecto del tiempo. Asimismo, se determinó que la inclusión de biomasa microalgal no generó un aumento ni detrimento de la concentración de ácidos grasos y colesterol en la yema de huevo. No obstante, la inclusión de harina de *Arthrospira maxima* generó un aumento en el costo de las dietas de hasta \$1,38/kg con un 6% de inclusión. Por lo tanto, esta materia prima puede ser utilizada en la alimentación de gallinas ponedoras comerciales en sustitución de harina de soya y pigmentante, sin embargo, se debe considerar una disminución en el costo para no afectar la rentabilidad del sistema.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Costa Rica, se producen 128.480 TM/año de alimento balanceado para 3.200.000 gallinas ponedoras que producen los huevos necesarios para mantener un consumo per cápita de 218 huevos al año, dado que su costo de adquisición es bajo y se considera un alimento de alto valor biológico (CIAB, 2018). Este alimento balanceado es elaborado principalmente a base de materias primas importadas como el maíz y el frijol de soya (CIAB, 2018). Por lo tanto, surge la necesidad de evaluar constantemente la utilización de materias primas alternativas, con el objetivo de reducir la dependencia a la importación de insumos.

Además, una vez que la Unión Europea toma la decisión de limitar la utilización de productos antimicrobianos en la generación de alimentos de origen animal (DOUE, 2015), surgen nuevas tendencias de producción que promueven la utilización de materias primas compuestas por biomoléculas capaces de ser tan eficaces como los antibióticos, pigmentantes y otros productos químicos utilizados en la producción animal (Mariey et al., 2012).

Dentro de estas materias primas, se encuentra la especie de microalgas *Arthrospira maxima*, misma que puede ser producida en condiciones autotróficas (sales minerales), heterotróficas (carbono orgánico en ausencia de luz) y mixotróficas (estiércoles o aguas residuales) (Ortiz-Moreno et al., 2012). Estas son consideradas como un alimento funcional con características nutricionales comparables a las de la harina de soya (Alvarenga et al., 2011).

Además, se han realizado estudios de palatabilidad, toxicidad, digestión, acción antioxidante, capacidad pigmentante, potencial hipocolesterolémico, propiedades anticancerígenas e inmunoestimulantes y capacidad antiinflamatoria, obteniendo resultados positivos en conejos, ratas, pollos y cerdos (Belay et al., 1996; Grinstead et al., 2000; Rodríguez-Hernández et al., 2001; Derner et al., 2006; Colla et al., 2007; Ambrosi et al., 2008; Peiretti and Meineri, 2011; Oliveira et al., 2013; Chiattoni et al., 2015). Todas estas propiedades están asociadas a la presencia de biomoléculas en la *Arthrospira maxima* como la ficocianina, compuestos fenólicos, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides y el Calcio-Spirulan (Parra et al., 2017). Asimismo, se ha comprobado que esta microalga tiene la capacidad de pigmentar la yema de huevo al mismo nivel que los

pigmentantes comerciales, sin afectar la producción de huevo (Anderson et al., 1991; Zahroojian et al., 2011, 2013).

Por otra parte, en Costa Rica se producen aproximadamente 2.938 ton de cerdaza al año (Padilla, 2006; CIAB, 2018) desechos que pueden ser biotransformados en 45 ton de biomasa algal<sup>1</sup>. Esta transformación, genera una reducción de la eutrofización de los ríos al disminuir la demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), contenido de NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub> del líquido residual y además, se fija CO<sub>2</sub> en el proceso, por lo tanto, las microalgas son consideradas organismos fitorremediadores (Olguín, 2003; Godos et al., 2009; León and Chaves, 2010).

En todos los estudios encontrados se produjo la biomasa microalgal en condiciones autotróficas o heterotróficas, sin embargo, no se ha evaluado el desempeño de estas producidas en condiciones mixotróficas. Además, no existe información acerca del costo que implica su inclusión en la dieta de animales. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es evaluar la inclusión de biomasa microalgal de *Arthrospira maxima* producida en condiciones mixotróficas, con cerdaza o suero de leche, en la alimentación de gallinas ponedoras comerciales y su efecto en el desempeño productivo de las aves, las características del huevo y el costo final de la dieta.

---

<sup>1</sup> Villalta 2018. Investigador del Proyecto de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Comunicación personal.

## 2. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

### 2.1. Caracterización de la *Arthrospira maxima*

Las microalgas son un grupo de organismos unicelulares, fotosintéticos, procariotas o eucariotas, que se clasifican según su pigmentación y fisiología (da Costa et al., 2016). La *Arthrospira maxima* es una cianobacteria pluricelular (alga azul verdosa) perteneciente al Orden Oscillatoriales y es considerada popularmente como una microalga debido a su estructura filamentososa en forma de espiral, por lo cual es conocida como *Spirulina sp.* (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015). Los principales productores a nivel mundial de esta microalga son China, India y Estados Unidos con un rendimiento de 3000 ton/año (Sprujit et al., 2016) producidas principalmente en condiciones autotróficas y heterotróficas, para destinar el 70% de la biomasa a la producción de cosméticos y suplementos para nutrición humana y el 30% a la nutrición animal (Gouveia et al., 2008). Por su parte, la producción en condiciones mixotróficas es menos común, pero se convierte en una herramienta de menor costo (menor inversión en infraestructura y medio de cultivo) para pequeñas producciones que deseen utilizar *Arthrospira maxima* en alimentación animal (Habib, 2008).

### 2.2. Composición nutricional

Según Alvarenga et al. (2011), la *Arthrospira maxima* puede ser utilizada como fuente proteica en nutrición animal, considerando la similitud de su composición nutricional con la de la harina de soya, tal como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Composición proximal de la biomasa microalgal de *Arthrospira maxima* (producida en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas) y de la harina de soya.

	Heterotrófica	Autotrófica	Mixotrófica	Harina de soya
Materia seca	88,70	97,00	95,20	84,6-98,3
Proteína cruda (%)	44,90	61,40	50,50	45,1-63,6
Extracto etéreo (%)	3,60	8,50	4,60	0,16-6,5
Fibra cruda (%)	-	3,00	0,02	1,1-8,9
Cenizas (%)	30,90	7,70	14,00	4,0-13,3
Referencia	Batista et al. (2013)	Shimamatsu et al. (2004)	Habib et al. (2008)	Mata (2007)

Como se puede observar en el Cuadro 1, la composición nutricional de la *Arthrospira maxima* es semejante a la de materias primas proteicas como la harina de soya. Sin embargo, presenta

mucha variabilidad debido a las diferentes condiciones de cultivo y procesamiento (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015). Por ejemplo, al producir una cepa de *Arthrospira maxima* D911 en condiciones autotróficas a 20°C y 10 µmol de luz, la biomasa microalgal presenta un 39,6% de ácido graso hexadecanoico, sin embargo, su producción bajo condiciones heterotróficas y a una temperatura de 30°C el contenido de este ácido graso aumenta a un 49,3% (Mühling et al., 2005; Batista et al., 2013). Este efecto también se puede generar en el contenido de proteína cruda de la biomasa microalgal, por ejemplo, al producir *Arthrospira maxima* en condiciones de laboratorio con un medio de cultivo Zarrouk® se obtiene un 37% de proteína cruda, sin embargo, en las mismas condiciones al cambiar el medio de cultivo a Schlösser® aumenta el contenido de proteína a un 74% (Rodríguez et al., 2016). En el Cuadro 2 se muestra el contenido de aminoácidos de la *Arthrospira maxima*, en comparación con la harina de soya.

**Cuadro 2.** Comparación del perfil de aminoácidos de la *Arthrospira maxima* y la harina de soya.

Aminoácido	% PC		% Lys	
	<i>Arthrospira maxima</i>	Harina de soya	<i>Arthrospira maxima</i>	Harina de soya
Aspartato	5,34	5,29	196	189
Glutamato	8,15	8,65	300	309
Serina	2,92	2,42	107	86
Glicina	3,00	2,01	110	72
Histidina	1,00	1,38	37	49
Arginina	3,96	3,55	146	127
Treonina	2,84	1,85	104	66
Alanina	4,54	2,02	167	72
Prolina	2,15	2,36	79	84
Tirosina	2,58	1,74	95	62
Valina	3,34	2,03	123	73
Metionina	1,98	0,79	73	28
Cistina	0,72	0,59	26	21
Isoleucina	3,06	2,04	113	73
Leucina	4,84	3,40	178	121
Fenilalanina	2,50	2,29	92	82
Lisina	2,72	2,80	100	100
<b>Total PC</b>	<b>55,65</b>	<b>45,20</b>	-	-

Adaptado de Alvarenga et al. (2011).

En gallinas ponedoras, la metionina y lisina son aminoácidos limitantes, es decir, tienen una gran influencia sobre el tamaño de huevo y la producción (Salvador and Guevara, 2013). Por

lo tanto, considerando que la *Arthrospira maxima* posee un alto contenido de ambos aminoácidos, superando inclusive el aporte de metionina de la harina de soya, esta ha sido utilizada como materia prima en nutrición animal. Por ejemplo, en gallinas ponedoras al utilizar dietas con un 3% de inclusión de *Arthrospira maxima* en sustitución de acemite de trigo (dietas isoproteicas e isocalóricas), se obtuvo un aumento del 4,99% en la producción total, así como un aumento del peso de huevo en 1,39 g en promedio generado posiblemente por la mejora en la función inmune, en la reproducción y en el crecimiento por su efecto inmunomodulador (Parra et al., 2017).

Además, al utilizar un nivel de suplementación de 0,2% como aditivo en dietas de gallinas ponedoras se obtuvo un aumento en el peso de las aves de 13,5 g por encima del aumento de peso con la dieta control (117,8 g) así como un aumento de 11% en la producción de huevos y 7,58 g de masa de huevo por gallina por día, con una disminución en la conversión alimenticia de 1 g/g (Mariey et al., 2012). Asimismo, se ha determinado que la inclusión de hasta un 16% de *Arthrospira maxima* en dietas de pollos de engorde no genera una diferencia significativa en los rendimientos productivos al ser comparada con dietas comerciales con harina de soya (Evans et al., 2015).

### **2.3. Efecto de la suplementación con *Arthrospira maxima* sobre la composición nutricional del huevo**

#### **2.3.1. Digestión, absorción y deposición de lípidos en la yema de huevo**

En gallinas ponedoras, la digestión de los lípidos inicia una vez que el alimento llega al intestino delgado, debido a la ausencia de lipasa lingual y gástrica. En el duodeno, los lípidos son emulsificados por las sales biliares, hidrolizados por la lipasa pancreática en ácidos grasos y glicerol, y se da la formación de micelas para su debida absorción, la cual se da principalmente en el duodeno y la parte anterior del yeyuno (Krogdahl, 1985; Osorio and Flórez, 2011).

Una parte de los lípidos deben ser reesterificados dentro de las células de la mucosa intestinal. Posteriormente, los lípidos reesterificados se adicionan a una mezcla de colesterol, fosfolípidos, ésteres de colesterol y apolipoproteínas para formar portomicrones. Estas moléculas son transportadas desde las venas pancreaticoduodenal y yeyunal hasta la vena porta. Por otra parte, los ácidos grasos no reesterificados son absorbidos directamente y transportados por la albúmina al torrente sanguíneo (Griffin and Hermier, 1988).

Los portomicrones poseen un gran tamaño, por lo tanto, son metabolizados en tejidos extrahepáticos donde la lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza los triglicéridos en ácidos grasos y

glicerol. El ácido graso es absorbido por el tejido donde se realizó la hidrólisis y el glicerol y los portomicrones remanentes (de menor tamaño) son transportados a hígado y riñón para su posterior metabolismo (Hermier, 1997; Cooper, 1997).

A partir de los ácidos grasos de la dieta, el hígado sintetiza triglicéridos, los cuales son transportados a tejidos periféricos a través de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), baja densidad (LDL) y alta densidad (HDL). Además, producto de la estimulación de los estrógenos en el hígado, se da la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad rica en triglicéridos (VLDLy) y lipofosfoproteína de alta densidad (vitelogenina) que son transportadas vía plasmática al ovario. Las VLDLy forman un complejo con la ApoB 100 y apovitellin-1 llamado apo VLDL-II que es resistente a la acción de las lipasas, lo que permite su deposición en el ovocito (Griffin and Hermier, 1988; Cherian, 2015). Por su parte, la vitelogenina es endocitada en el ovario y transformada en lipovitelina y fosvitina (Sartori et al., 2009).

Por otra parte, el huevo de mesa comercial posee un 12,58% de proteína depositada principalmente en el albumen, 0,77% de carbohidratos y 0,86% de cenizas totales (Cherian et al., 2002). La yema de huevo está compuesta por una emulsificación de agua, lipoproteínas y un 9,94% de grasas totales (Li-Chan and Kim, 2007). En el Cuadro 3 se muestra el perfil lipídico del huevo de mesa comercial.

**Cuadro 3.** Perfil lipídico del huevo de mesa comercial.

<b>Ácido graso</b>	<b>(% de grasa total)</b>
Ácidos grasos saturados	32,35
Ácidos grasos monoinsaturados	49,76
Ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -6	15,80
Alfa-linoleico (18:3 $\omega$ -3)	1,20
Eicosapentaenoico (20:5 $\omega$ -3)	0,07
Docosapentaenoico (22:5 $\omega$ -3)	0,00
Docosahexaenoico (22:6 $\omega$ -3)	1,26
Total de ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -3	2,53
Relación $\omega$ -3/ $\omega$ -6	0,16

Adaptado de (Cherian et al., 2002; Kang et al., 2003; Li-Chan and Kim, 2007; Nyberg, 2017).

Como se observa en el Cuadro anterior, un 32,35% de la proporción lipídica del huevo corresponde a ácidos grasos saturados. Es por ello que, en las últimas décadas se han

realizado numerosos estudios que buscan disminuir la proporción de ácidos grasos saturados y aumentar los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, dado que estos últimos son deficientes en la dieta de la población mundial (Castro-González, 2002). Entre las materias primas utilizadas se encuentran ingredientes de origen vegetal como semillas de chía y semillas de linaza y fuentes de origen animal como aceite de pescado (Lemahieu et al., 2014; Coorey et al., 2015). Asimismo, se han realizado estudios sobre el efecto de la utilización de microalgas sobre el perfil lipídico del huevo (Lemahieu et al., 2014).

### 2.3.2. Efecto de la *Arthrospira maxima* sobre el perfil lipídico del huevo

Las características fisiológicas digestivas de las gallinas ponedoras permite a los nutricionistas enriquecer o variar el contenido lipídico de los huevos a través de la dieta de forma natural y sostenible (Cherian, 2013). En el Cuadro 4 se muestra el perfil lipídico de la *Arthrospira maxima*.

**Cuadro 4.** Composición del perfil lipídico de harina de *Arthrospira maxima*.

Ácido graso	Contenido (mg/100g)
MUFA	402
16:4- $\omega$ 3	4
18:3- $\omega$ 3 (ALA)	40
18:4- $\omega$ 3 (SDA)	2
Otros PUFA- $\omega$ 3	11
Total PUFA- $\omega$ 3	58
PUFA- $\omega$ 6	945
$\omega$ 3/ $\omega$ 6	0,1

Adaptado de: (Batista et al., 2013; Zahroojian et al., 2013) MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, ALA: ácido  $\alpha$ -linolénico, SDA: ácido estearidónico, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

Como se puede observar en el Cuadro 4, el principal aporte lipídico de la *Arthrospira maxima* es de ácidos grasos poliinsaturados omega 6, entre estos el principal componente es el ácido  $\gamma$ -linolénico (1080mg/100gMS) (Gershwin and Belay, 2007), mismo que a nivel metabólico funciona como precursor de prostaglandinas, las cuales son esenciales en la regulación de funciones bioquímicas básicas como la presión sanguínea, la síntesis de colesterol, inflamación y la proliferación de células (Gershwin and Belay, 2007; Diraman et al., 2009; Parra et al., 2017).



Asimismo, el alto contenido de ficocianinas presentes en la *Arthrospira maxima* (15.000-19.000 mg/100g) genera un aporte importante de 1'-O-(palmitonyl)-2'-O-(caprylonyl) glyceryl- $\beta$ - $\alpha$ -D-galactopyranoside (Glicolípido H-b2) (Han et al., 2006), molécula responsable de generar una reducción en la secreción de lipasa pancreática, situación que genera una disminución en la absorción de lípidos a nivel del yeyuno, así como una reducción en la reabsorción ileal de bilis generando una reducción en la síntesis de colesterol y por ende en el colesterol sérico del ave (Nagaoka et al., 2005; Ambrosi et al., 2009).

Por lo tanto, se ha determinado que al suplementar gallinas ponedoras con 0,3% de *Spirulina sp.* se genera una disminución en el contenido de colesterol en huevo de 13,6 a 11,7 mg/g producto de la disminución en los niveles de triglicéridos y colesterol sérico de la gallina de 135 mg/dl a 115 mg/dl (Selim et al., 2018). Asimismo, al suplementar gallinas ponedoras con 0,2% de *Spirulina sp.* se determinó una reducción de 23,83 mg/100ml de triglicéridos y 7,34 mg/ml de colesterol en plasma sanguíneo, así como una reducción de 59,6 mg/g de lípidos totales y 3,3 mg/g de colesterol en yema de huevo con respecto a resultados obtenidos con una dieta comercial de harina de soya y maíz (Mariey et al., 2012).

## **2.4. Efecto de la suplementación con *Arthrospira maxima* sobre la pigmentación de la yema de huevo**

### **2.4.1. Pigmentación de la yema de huevo y tipos de pigmentos**

Los huevos son más pretendidos por el consumidor cuando poseen un color de yema intenso, por ejemplo, en Costa Rica se busca que el color de esta sea de un 12 en la escala Roche™. Para alcanzar este nivel de pigmentación existen diversas fuentes con variados tipos de pigmentos que se utilizan en la industria avícola, a continuación, se detallan las más importantes.

Existen dos tipos de pigmentos; los carotenoides y las ficobilinas. Los carotenoides corresponden a tetraterpenos conformados por múltiples unidades de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Los carotenoides a su vez se dividen en dos grupos; los carotenos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno), que son hidrocarburos que carecen de oxígeno en sus anillos terminales y las xantofilas (zeaxantina y luteína) que si poseen estas moléculas de oxígeno (Gouveia et al., 2008; Carranco et al., 2011). Por otro lado, las ficobilinas son exclusivas de las algas y microalgas, y corresponden a grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales que en conjunto conforman ficobiliproteínas

(Bleakley and Hayes, 2017). Las principales ficobilinas son: la ficocianina (azul) y ficoeritrina (roja) (Sobiechowska-Sasim et al., 2014).

El proceso de absorción y deposición de los pigmentos en la yema de huevo se realiza mediante el mismo metabolismo que los lípidos, dada su naturaleza liposoluble. El proceso de pigmentación de la yema se da en dos fases; una fase inicial de saturación donde se alcanza una calificación de 7-8 en la escala Roche y corresponde a la deposición de pigmentos amarillos. Y una segunda fase, llamada fase de coloración, donde se depositan los pigmentos rojos y se puede alcanzar hasta una calificación de 15 en la escala Roche (Vuilleumier, 1969). Los pigmentos amarillos corresponden al  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y luteína. Por otra parte, el licopeno y las ficobilinas son considerados como pigmentos rojos (Hammershøj et al., 2010; Ghaeni et al., 2014).

#### **2.4.2. Fuentes utilizadas para la pigmentación de la yema de huevo**

Existen fuentes de pigmentos de origen natural y sintético; los pigmentos naturales son aquellos sintetizados por plantas y microorganismos, mientras que, los pigmentos de origen sintético son elaborados por el ser humano en condiciones de laboratorio (Delgado-Vargas et al., 2000).

Los pigmentos sintéticos son elaborados a partir de pigmentos naturales aislados y purificados. Entre estos, los pigmentos más utilizados son el éster etílico  $\beta$ -apo-8-caroteno, el cual genera una coloración amarilla en la yema de huevo y posee una tasa de deposición de 40-50%, y la cantaxantina, que genera una coloración rojiza y se caracteriza por tener una tasa de deposición de 35-45%. Por otra parte, existen productos comerciales que corresponden a mezclas de xantófilas como la zeaxantina, capsantina, bixina, capsorubina y astaxantina (Camarinha et al., 2011).

En la actualidad, se utilizan mayoritariamente los pigmentos sintéticos, ya que son eficientes, estables y se dosifican de forma sencilla dentro de la formulación. Sin embargo, son costosos y se desconoce el impacto que puedan tener en la salud humana al consumirlos diariamente. Es por ello que surgen nuevas alternativas que buscan el consumo de pigmentos de fuentes naturales (Delgado-Vargas et al., 2000).

Algunos ejemplos de fuentes naturales de pigmentos utilizados en la alimentación de gallinas ponedoras son: zanahoria (Hammershøj et al., 2010), harina de camarón (Chacón et al., 2016), pimienta verde dulce (Rossi et al., 2015), subproductos de achiote (García et al., 2010),

*Tagetes erecta*, pimiento rojo (Santos-Bocanegra et al., 2004) y microalgas como *Haematococcus pluvialis*, *Isochrysis galbana* y *Arthrospira maxima* (Sprujit et al., 2016).

### 2.4.3. *Arthrospira maxima* como pigmentante de la yema de huevo.

La capacidad pigmentante de la *Arthrospira maxima*, se debe principalmente a su contenido de pigmentos captadores de luz, en el Cuadro 5 se presenta el contenido de pigmentos de la *Arthrospira maxima*.

**Cuadro 5.** Contenido de pigmentos de la *Arthrospira maxima*.

Fito pigmentos	Contenido (mg/100 g)
Carotenos	160-260
Xantofilas	170-240
Total de carotenoides	400-500
Clorofila	1300-1700
Ficobilinas	15000-19000
Ficocianina	7850
Aloficocianina	4924
Ficoeritrina	2027

Fuente: (Zahroojian et al., 2013; Romero Maza et al., 2017).

Como se observa en el Cuadro anterior la *Arthrospira maxima* presenta un elevado contenido de ficoeritrinas, clasificados como pigmentos rojos con un 2% de deposición en huevo (Kang et al., 2003). Asimismo, posee un elevado contenido de carotenoides; principalmente xantófilas, clasificados como pigmentos amarillos con un 25% de deposición en huevo (Skřivan et al., 2016). Además, estos pigmentos se encuentran esterificados con los ácidos grasos presentes en la *Spirulina sp.*, por lo tanto, se depositan en mayor concentración en las membranas lipídicas de la yema de huevo, a diferencia de los pigmentos libres presentes en los colorantes artificiales (Parra et al., 2017).

Se ha demostrado que esta microalga tiene la capacidad de llevar a cabo la fase de saturación y coloración de la yema de huevo adecuadamente, alcanzando un valor de 11,6 en la escala Roche™ con un nivel de inclusión de 2,5% (Zahroojian et al., 2011). Sin embargo, el tratamiento postcosecha de la biomasa microalgal puede generar procesos de oxidación de los pigmentos, disminuyendo su capacidad pigmentante. Por ejemplo, al incluir un 3% de *Arthrospira maxima* en dietas de gallinas ponedoras de 24 semanas de edad durante 25 días, se obtuvo un valor de 10 en la escala Roche™ (Parra et al., 2017).

Además del efecto en la coloración de la yema de huevo, el elevado contenido de pigmentos en la *Spirulina sp.* le brinda características propias de un super alimento. Por ejemplo, se ha determinado que la luteína y zeaxantina; principales pigmentos presentes en las xantofilas de la *Spirulina sp.*, conforman el pigmento macular del ojo (Dolz et al., 2013). Por lo tanto, considerando el alto porcentaje de deposición de dichos pigmentos en huevo, se puede generar un enriquecimiento de huevo con xantófilas que favorezca la reducción de enfermedades degenerativas de la vista en el consumidor final. Asimismo, se ha demostrado que la elevada concentración de  $\beta$ -caroteno en la *Spirulina sp.* (aproximadamente un 80% del total de carotenoides), convierte a esta microalga en un precursor de vitamina A, por lo tanto, representa una fuente alimenticia que disminuye enfermedades visuales degenerativas (Sánchez et al., 2003; Farinango, 2014).

Por otra parte, las ficocianinas son ficobiliproteínas que presentan actividad inhibidora o supresora de especies reactivas de oxígeno (ROS), conocidas como radicales libres, y la actividad de la enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2), moléculas responsables de generar los principales mecanismos degenerativos a nivel celular (Romay et al., 2003). Por lo tanto, considerando el elevado contenido de ficocianinas presente en la *Spirulina sp.* confieren a esta microalga propiedades antiinflamatorias, inmunoestimulantes, antioxidantes, neuroprotectoras, hepatoprotectoras (Romay et al., 2003; Eriksen, 2008; Cuellar-Bermudez et al., 2015). Asimismo, al generar una deposición de estos pigmentos en huevo (Kang et al., 2003) estos beneficios pueden ser adquiridos tanto por las gallinas ponedoras, como por el consumidor final del huevo, generando así un producto de valor agregado.

## **2.5 Calidad del huevo**

La calidad del huevo de mesa está determinada por las necesidades o preferencias de los consumidores. De manera que su aceptación puede estar definida por características como tamaño, forma, color de la cáscara, color de la yema y frescura (Oliveira et al., 2009). Por lo tanto, para generar un producto con características comerciales adecuadas es necesario evaluar los siguientes parámetros.

Uno de los factores a considerar es el peso del huevo y de sus diferentes componentes, donde la cáscara pesa entre 5,86 y 5,94 g, la yema entre 15,16 y 18,35 g y el albumen entre 38,68 y 40,63 g, para un peso final de huevo que ronda los 59,62 y 64,82 g y un volumen promedio de 62,11 cm<sup>3</sup> (Silversides and Budgell, 2004).

La calidad del huevo puede ser evaluada por aumentos en el pH del albumen. Por ejemplo, el pH del albumen al momento de la puesta es de 8,76 y puede variar a 9,26 con un almacenamiento de 10 días. Además, el albumen presenta una altura de 4,76 a 6,47 mm que disminuye conforme aumenta la edad de la gallina (Silversides and Budgell, 2004). Para facilitar la evaluación de calidad mediante la albumina se desarrolló un índice de Unidades Haugh (UH) calculado a partir de la altura de la albumina y el peso del huevo (Scott and Silversides, 2000; Jones and Musgrove, 2005). Calificaciones superiores a 72 UH representan una excelente calidad, valores entre 60 y 72 se presentan en huevos de alta calidad y valores más bajos de 60 representan una menor calidad (Oliveira et al., 2009). Este valor tiende a disminuir a lo largo de la curva de producción debido al aumento del peso de los huevos (Casas et al., 2016).

Además, uno de los principales aspectos a evaluar en la yema de huevo es la forma de esta, ya que con el paso del tiempo de almacenamiento cambia su forma de ovoide y levantada a aplanada, esto debido a la migración de agua a través de la membrana vitelina. Esta modificación de la forma afecta el índice de yema, factor determinado para evaluar la relación entre la altura y diámetro de la yema (Pareja et al., 2010).

Por otra parte, la coloración de la yema constituye un factor determinante en la evaluación de calidad del huevo, dado su impacto en la toma de decisión de compra del consumidor. La evaluación de color se realiza mediante la escala Roche donde 1 es el valor más bajo dado a yemas con tonos amarillos y 15 el más alto para aquellos huevos con coloración anaranjada-rojiza (Vuilleumier, 1969).

Finalmente, uno de los aspectos a tomar en cuenta para determinar la calidad de huevo es el porcentaje de huevo tipo A, considerado como aquellos con características que permiten su consumo directo en humanos (Sandoval et al., 2009), entre estas se encuentran:

- Cáscara y cutícula: normales, limpias e intactas
- Cámara de aire: de una altura no superior a 6 mm.
- Clara: transparente, sin manchas, de consistencia gelatinosa y exenta de materia extraña.
- Yema: solo visible al trasluz como una sombra, sin contorno claramente discernible, que no se separe del centro al someter al huevo a un movimiento de rotación y sin materias extrañas de cualquier tipo.
- Germen: desarrollo imperceptible.
- Olor: ausencia de olores extraños.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. General

- Evaluar la inclusión de una cepa de *Arthrospira maxima* producida en condiciones mixotróficas en la alimentación de gallinas ponedoras comerciales y su efecto en el desempeño productivo de las aves, las características del huevo y el costo final de la dieta.

#### 3.2 Específicos

- Determinar el efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre el rendimiento productivo de las gallinas ponedoras.
- Evaluar el efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre el perfil lipídico del huevo de mesa.
- Determinar el efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre la calidad de huevo.
- Establecer el costo final de la dieta de gallinas ponedoras suplementadas con *Arthrospira maxima*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Procedimiento general

El estudio se llevó a cabo en la Granja Avícola Los Pollitos, ubicada en Palmares de Alajuela durante un periodo 28 días, utilizando gallinas ponedoras de 52 semanas de edad de la línea genética Isa Brown. Las aves fueron ubicadas en galeras de sistema abierto en baterías de jaulas de tres niveles, con 5 gallinas por jaula (una unidad experimental) y 5 repeticiones asignadas completamente al azar por tratamiento, para un total de 20 jaulas o unidades experimentales. Durante el periodo experimental se continuó con el manejo implementado normalmente por la granja, con una frecuencia de alimentación diaria con una única ración de 600 g por jaula al día ofrecida a las 6:00am y agua a libre consumo ofrecida en 2 bebederos de niple por jaula.

Por otra parte, la biomasa microalgal utilizada fue cultivada por el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en condiciones mixotróficas en un medio de cerdaza al 5% con un enriquecimiento de C, N, P, Na y Fe para asegurar los requerimientos nutricionales establecidos por Fox (1996). La producción se realizó de manera escalonada iniciando con la generación de inóculos en Erlenmeyer de 250 mL en condiciones de laboratorio donde se evaluaron y optimizaron los parámetros fisicoquímicos del cultivo: pH, intensidad de luz, oxígeno disuelto, agitación, conductividad, temperatura y frecuencia de fertilización. Posteriormente, el cultivo fue trasladado a galones y tanquetas según el crecimiento y concentración de la biomasa, para finalizar el proceso en invernaderos equipados con piletas de rotación mecánica.

Una vez obtenida la concentración celular máxima (1,5 g/L) en las piletas, se realizó una filtración utilizando filtros de tela con poros de 25 micras y se procedió a secar la biomasa en hornos de convección a 60°C por 48 horas. Para obtener el tamaño de partícula requerido de la harina de *Arthrospira maxima* (5mm) se utilizó un molino de martillos marca Sanchi. Finalmente, la harina de microalga fue almacenada por un periodo de 13 meses en bolsas plásticas y condiciones aeróbicas.

### 3.2 Formulación y elaboración de raciones

Tomando como referencia resultados de análisis bromatológicos proporcionados por el Instituto Tecnológico de Costa Rica y datos reportados en la literatura, se elaboró la matriz nutricional de *Arthrospira maxima* utilizada para la formulación con el software Brill®, tal como se muestra en el Cuadro 6. Se elaboraron 4 dietas experimentales isoproteicas con 17% PC e

isocalóricas (2800kcal/kg) con diferentes niveles de inclusión de la biomasa microalgal; 0%, 2%, 4% y 6% (Cuadro 7).

**Cuadro 6.** Matriz nutricional de *Arthrospira maxima* utilizada para la formulación de las dietas experimentales.

<b>Nutriente</b>	<b>Concentración (g/100g)</b>
Humedad <sup>1</sup>	21,46
Energía metabolizable aves (kcal/kg) <sup>2</sup>	2465
Proteína Cruda <sup>1</sup>	64,62
Fibra Cruda <sup>1</sup>	0,50
Extracto etéreo <sup>1</sup>	0,170
Extracto libre de Nitrógeno <sup>1</sup>	6,64
Sal <sup>1</sup>	0,194
Cenizas <sup>1</sup>	6,61
Calcio <sup>1</sup>	0,22
Fósforo <sup>1</sup>	1,16
Fósforo no fítico <sup>2</sup>	0,88
Sodio <sup>1</sup>	0,74
Ácido aspártico <sup>3</sup>	4,816
Ácido glutámico <sup>3</sup>	7,088
Serina <sup>3</sup>	1,848
Histidina <sup>3</sup>	1,072
Glicina <sup>3</sup>	3,6
Arginina <sup>3</sup>	4,304
Alanina <sup>3</sup>	4,312
Cistina <sup>3</sup>	0,616
Valina <sup>3</sup>	4,288
Metionina <sup>3</sup>	1,656
Fenilalanina <sup>3</sup>	3,184
Isoleucina <sup>3</sup>	2,664
Leucina <sup>3</sup>	4,888
Lisina <sup>3</sup>	2,856

Fuente: <sup>1</sup>Centro de Investigación en Nutrición Animal, Análisis bromatológico correspondiente a la muestra GE-7329-2; <sup>2</sup>Valores calculados según Rostango (2017); <sup>3</sup>El contenido de aminoácidos corresponde a aminoácidos digestibles calculados según Rostagno (2017) a partir de aminoácidos totales analizados en el Centro de Investigación en Nutrición Animal correspondientes a la muestra GE-4680-1.



**Cuadro 7.** Composición porcentual de las dietas experimentales.

<b>Materia Prima</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>4%</b>	<b>6%</b>
Maíz	59,7132	60,3909	61,6726	60,8156
Harina de soya	27,8250	25,2617	21,8400	20,1027
Carbonato de calcio grueso	6,3000	6,3000	6,3000	6,3000
Carbonato de calcio fino	3,8850	3,8998	3,9480	4,0635
Acemite de trigo	3,1500	3,1500	3,6383	4,2000
<i>Arthrospira maxima</i>	0,0000	2,1000	4,2000	6,3000
Aceite de soya	2,1000	1,9827	1,5750	1,5750
Fosfato monocálcico	0,7245	0,6483	0,5689	0,4830
Premezcla vitaminas y minerales	0,2625	0,2625	0,2625	0,2625
Sal	0,2489	0,2357	0,1890	0,2205
L-Metionina	0,2426	0,2229	0,2100	0,1785
Bicarbonato de sodio	0,2079	0,1910	0,1995	0,1470
Betaina	0,1050	0,1050	0,1050	0,1050
Secuestrante de micotoxinas	0,1050	0,1050	0,1050	0,1050
Butirato de sodio	0,0525	0,0525	0,0525	0,0525
L-Lisina	0,0433	0,0477	0,0875	0,0630
Protector hepático	0,0263	0,0263	0,0263	0,0263
L-Treonina	0,0054	0,0181	0,0201	-
Cantaxantina	0,0032	-	-	-

Finalmente, los alimentos balanceados fueron elaborados a partir de materias primas donadas por la empresa Granja Avícola Los Pollitos y el proceso de mezclado fue realizado en las instalaciones de VETIM S.A., un bache de 105 kg por tratamiento. Posteriormente, se tomó una muestra representativa de cada dieta y fueron analizadas por el Centro de Investigación en Nutrición Animal, mediante la metodología de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS).

### **3.2 Variables por evaluar en campo**

Para evaluar el rendimiento productivo de las aves se determinó semanalmente el porcentaje de postura, consumo de alimento, peso de huevo, masa de huevo, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad. Para determinar el consumo de alimento y el peso del huevo se utilizó una balanza granataria electrónica (detección mínima de 1 g). Asimismo, se determinó con una frecuencia semanal el porcentaje de huevo tipo A para cada tratamiento utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ huevos tipo A} = \frac{\text{Huevos totales} - \text{huevos sucios} - \text{huevos pálidos} - \text{huevos quebrados}}{\text{Huevos totales}} * 100$$

Por otra parte, para evaluar la calidad del huevo fueron analizados semanalmente 15 huevos por tratamiento, es decir, tres huevos tomados al azar por repetición. Inicialmente, se determinó el peso del huevo con una balanza digital (detección mínima de 0,1 g). Luego se colocó el contenido del huevo sobre una superficie plana para medir la altura de la albumina densa con un pie de rey digital. Finalmente, una vez obtenido el peso del huevo en gramos (w) y la altura de la albúmina densa en milímetros (h), se calculó las Unidades Haugh (UH), utilizando la siguiente ecuación:

$$UH = 100 * \log (h - 1,7w^{0.37} + 7,6)$$

Posteriormente, se determinó el color de la yema según la escala Roche™ utilizando el Digital Yolk Fan™ de DSM y se midió el grosor de cáscara con un pie de rey digital.

### 3.3 Variables por evaluar en laboratorio

Los análisis de laboratorio fueron realizados por el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, se determinó el perfil de ácidos grasos de 9 huevos de cada tratamiento; tomados al azar durante el último día de estudio, mediante el método AOAC 996.06 para ácidos grasos saturados e insaturados, hidrólisis ácida para extracto etéreo y HPLC-PDA para colesterol.

### 3.4 Descripción del análisis de varianza

Las variables de concentración de los ácidos grasos, dado que no siguen una distribución normal, fueron analizadas mediante un modelo lineal generalizado beta, con función de enlace logito, usando el paquete *betareg* (Cribari-Neto and Zeileis, 2010) del lenguaje de programación estadística R, versión 3.5.1 (R Core Team, 2018), usando el siguiente modelo estadístico:

$$\text{logit}(\pi_{ij}) = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$\pi_{ij}$  corresponde a la concentración promedio del analito en la j-ésima muestra, del tratamiento i-ésimo.

$\mu$  es el promedio general de concentración.

$T_i$  corresponde a al efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\epsilon_{ij}$  corresponde al error aleatorio de correspondiente a la muestra  $j$ , del tratamiento  $i$ .

Las restantes variables se analizaron mediante modelos mixtos de medidas repetidas, usando la jaula como sujeto y la semana como factor de tiempo, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y = \mu + T_i + S_j + c_k + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$\pi_{ijk}$  corresponde al porcentaje de huevo clase A en la  $k$ -ésima jaula, durante la  $j$ -ésima semana, en el tratamiento  $i$ -ésimo.

$\mu$  es el promedio general de concentracion.

$T_i$  corresponde al efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$S_j$  corresponde al efecto de la  $j$ -ésima semana de tratamiento.

$c_k$  corresponde al efecto aleatorio de la  $k$ -ésima jaula.

$\epsilon_{ijk}$  corresponde al error aleatorio de correspondiente a la semana  $j$ , del tratamiento  $i$  en la jaula  $k$ .

Los modelos para las variables porcentaje de producción, masa de huevo, peso de huevo, conversión alimenticia, grosor de cáscara y unidades Haugh, que presentaron una distribución aproximadamente normal, fueron ajustados usando el paquete *nlme* (Pinheiro et al., 2020). Para los porcentajes de huevo sucio y huevo clase A se asumió una distribución beta para el error, que fue modelada mediante el paquete *glmmTMB* (Brooks et al., 2017). Finalmente, se utilizó un modelo logístico ordinal para el color de la yema, ajustado mediante el paquete *ordinal* (Christensen, 2019). Todos los paquetes mencionados son complementos que corren en el lenguaje de programación estadística R, versión 3.5.1 (R Core Team, 2018).

Las estructuras de covarianza de medidas repetidas de los modelos anteriores se seleccionaron ajustando un modelo sin estructura de correlaciones, del cual se analizaba la matriz de covarianza y la función de autocorrelación. Con dicha información, se generaba una serie de modelos candidatos, cuyo ajuste era verificado visualmente, mediante la inspección de la matriz de covarianzas y la función de autocorrelación y, posteriormente, usando las pruebas de verosimilitud y los criterios de información de Akaike y Schwarz (AIC y BIC,

respectivamente). Siguiendo la metodología descrita, se usó la estructura Toeplitz para las variables masa y peso de huevo, porcentaje de postura y conversión alimenticia; la estructura autorregresiva de primer orden para las variables porcentaje de huevo tipo A, porcentaje de huevo sucio y unidades Haugh; finalmente, para la variable grosor de cáscara se empleó una matriz sin estructura.

Posterior al análisis de varianza de cada uno de estos modelos, se realizaron las verificaciones de los supuestos distribucionales y se realizaron comparaciones por pares de promedios, usando la prueba de Tukey. Adicionalmente, se probó la existencia de tendencias usando contrastes polinómicos (Lenth et al., 2020).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre el rendimiento productivo.

El resultado del análisis bromatológico realizado a las dietas experimentales determinó que existen algunas diferencias numéricas entre estas, principalmente en el porcentaje de proteína cruda (Cuadro 8). Sin embargo, se debe aclarar que el análisis fue realizado a una única muestra al final del periodo experimental. Por otra parte, considerando que el consumo promedio de proteína por ave por día durante el periodo experimental fue de 20,36 g, 20,25 g, 21,74 g, y 20,50 g, para los tratamientos de 0%, 2%, 4% y 6% respectivamente, el consumo de proteína cruda se ajusta al recomendado (19,50 g/ave/día) por el manual de la línea genética Isa Brown para gallinas de 52 a 55 semanas de edad.

**Cuadro 8.** Composición nutricional (%MS) de las dietas experimentales.

Tratamiento	Cenizas	Fibra Cruda	Proteína Cruda	Extracto Etéreo	Humedad
0%	12,41	2,66	16,55	4,50	11,99
2%	13,14	2,64	16,10	5,24	11,47
4%	13,38	2,65	17,33	4,41	10,89
6%	14,25	2,91	17,87	5,06	10,93

La inclusión de *Arthrospira maxima* en dietas de gallinas ponedoras no generó un detrimento ni un aumento en el desempeño productivo de las aves en comparación con la dieta control. Tal como se muestra en los Cuadros 9 y 10, no existe una diferencia significativa en la masa de huevo promedio ni en el porcentaje de postura entre los tratamientos y no existe un efecto del tiempo de inclusión sobre las variables.

**Cuadro 9.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la masa de huevo promedio (kg) durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	lin	cuad
0%	2,16(0,080) <sup>a,A</sup>	2,18(0,080) <sup>a,A</sup>	2,25(0,080) <sup>a,A</sup>	2,12(0,080) <sup>a,A</sup>	0,2603	0,9113
2%	2,13(0,080) <sup>a,A</sup>	2,15(0,080) <sup>a,A</sup>	2,15(0,080) <sup>a,A</sup>	2,08(0,080) <sup>a,A</sup>	0,3187	0,9049
4%	2,09(0,080) <sup>a,A</sup>	2,13 (0,080) <sup>a,A</sup>	2,12(0,080) <sup>a,A</sup>	2,04(0,080) <sup>a,A</sup>	0,2218	0,9995
6%	1,97(0,080) <sup>a,A</sup>	2,00(0,080) <sup>a,A</sup>	2,04(0,080) <sup>a,A</sup>	2,10(0,080) <sup>a,A</sup>	0,9881	0,9074
lin	0,9807	0,7096	0,7192	0,0262		
cuad	0,5227	0,8558	0,7154	0,9892		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

**Cuadro 10.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el porcentaje de postura durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	lin	cuad
0%	94,3 (3,32) <sup>a,A</sup>	95,9 (3,32) <sup>a,A</sup>	97,7 (3,32) <sup>a,A</sup>	93,6 (3,32) <sup>a,A</sup>	0,3711	0,8758
2%	93,1 (3,32) <sup>a,A</sup>	94,9 (3,32) <sup>a,A</sup>	93,7 (3,32) <sup>a,A</sup>	89,0 (3,32) <sup>a,A</sup>	0,1817	0,6735
4%	92,6 (3,32) <sup>a,A</sup>	94,3 (3,32) <sup>a,A</sup>	92,0 (3,32) <sup>a,A</sup>	89,1 (3,32) <sup>a,A</sup>	0,3364	0,9826
6%	86,9 (3,32) <sup>a,A</sup>	86,3 (3,32) <sup>a,A</sup>	90,3 (3,32) <sup>a,A</sup>	92,0 (3,32) <sup>a,A</sup>	0,9852	0,6248
lin	0,9999	0,0288	0,0458	0,0010		
cuad	0,5626	0,4627	0,7178	0,9514		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Omri et al. (2019), quienes determinaron que no existe diferencia significativa en el porcentaje de postura al incorporar un 1,5 y 2,5% de *Arthrospira maxima* en dietas de gallinas ponedoras Lohman White de 44 semanas de edad. Además, determinaron que no existe un efecto del tiempo sobre este parámetro durante un periodo experimental de 6 semanas. Asimismo, Zahroojian et al. (2013) no reportaron diferencias significativas en el rendimiento productivo de gallinas ponedoras Hy-line W36 de 63 semanas de edad al suplementar con 1,5, 2,0 y 2,5% de *Arthrospira maxima* durante un periodo experimental de 3,5 semanas.

Por otra parte, estos resultados difieren con los obtenidos por Selim et al. (2018) en gallinas ponedoras de 38 semanas de edad, suplementadas; sobre la dieta basal, con *Spirulina* al 0,1, 0,2 y 0,3% de la dieta durante 8 semanas, donde se presentó un aumento en ambos parámetros al incrementar el porcentaje de suplementación. Asimismo, Mariey et al. (2012) reportan un aumento significativo en la producción y la masa de huevo al suplementar con 0,1% de *Arthrospira maxima* en dietas de reproductoras livianas de 28 semanas de edad durante 8 semanas.

La diferencia entre los estudios que incluyen la biomasa microalgal como materia prima proteica en la dieta y aquellos que la utilizan como una suplementación sobre la dieta basal, radica en que el objetivo de los primeros es buscar que la utilización de la microalga en sustitución de materias primas convencionales (maíz y soya) genere el mismo rendimiento productivo que la alimentación habitual. Por su parte, aquellos estudios que realizan una suplementación sobre la dieta basal, utilizan la *Arthrospira maxima* como un aditivo para mejorar la función inmune, la salud hepática y optimizar la utilización de macro y micro nutrientes (Belay et al., 1996; Kaoud, 2012). Es decir, adicionando pequeñas dosis de suplementación durante un periodo prolongado de tiempo se genera un efecto acumulativo

que mejora la salud general del animal y logra potenciar el rendimiento productivo, comportamiento observado por Marie et al. (2012) y Selim et al. (2018) a partir de la cuarta semana de consumo.

Por otra parte, Parra et al. (2017) reportaron un aumento en la masa de huevo al realizar la inclusión de *Arthrospira maxima* en sustitución de acemite de trigo en dietas de gallinas ponedoras durante 4 semanas. El aumento es ocasionado por el incremento en la concentración de extracto etéreo en la dieta, esto genera un aumento en la deposición de ácidos grasos en la yema de huevo, ocasionando un aumento en su peso y consecuentemente en la masa de huevo (Parra et al., 2017, Zahroojian et al., 2013, Mariey et al., 2012). La diferencia entre los resultados obtenidos en el presente estudio y los reportados por Parra et al., puede radicar en la calidad de la biomasa microalgal debido al método de secado y el periodo y tipo de almacenamiento considerando que la harina de *Arthrospira maxima* utilizada en este experimento fue obtenida mediante un secado por convección y almacenada por un periodo de 13 meses en bolsas plásticas y condiciones aeróbicas.

Se ha demostrado que un mal procesamiento de la harina microalgal durante el proceso de cosecha, secado y almacenamiento puede generar un detrimento en el perfil lipídico de la materia prima producto de la oxidación de los ácidos grasos generada por la reducción en la actividad antioxidante y la reducción en la concentración de ficocianinas (Eriksen, 2008; Mariey et al., 2012; Cuellar-Bermudez et al., 2015; Selim et al., 2018). Por ejemplo, (Nouri and Abbasi, 2018) determinaron que la presencia de agentes oxidantes durante el proceso de secado al sol de la biomasa de *Arthrospira maxima* genera una reducción de un 20% de su actividad antioxidante en comparación con aquella biomasa seca en hornos al vacío.

Por su parte, la temperatura y el tiempo de almacenamiento presenta un efecto negativo sobre la actividad antioxidante presente en la biomasa de *Arthrospira maxima* (Colla et al., 2017), tal como se muestra en el Cuadro 11.

**Cuadro 11.** Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad antioxidante de *Arthrospira maxima*.

Temperatura	Fresca	63 días
25°C	93,2%	30,7%
40°C	93,2%	10,2%
50°C	93,2%	0%

Adaptado de Colla et al. (2017).

Asimismo, se ha determinado que el tipo de luz a la cual es expuesto el material durante el almacenamiento reduce la actividad antioxidante de la biomasa microalgal. Por ejemplo, durante un periodo de almacenamiento de 93 días con luz fluorescente en diferentes materiales de empaque se redujo dicha actividad de 93,2% en *Arthrospira maxima* fresca a 1,3% en biomasa almacenada en plato de Petri, 12,2% en cápsulas de gelatina transparente y 3,4% en vidrio ámbar (Colla et al., 2017).

Por otra parte, se ha determinado que almacenar *Arthrospira maxima* en bolsas de polipropileno y bolsas de polietileno de baja densidad en condiciones de 38°C y 90% de humedad relativa (RH) genera una disminución del 50% del contenido de ficocianinas con respecto a la biomasa fresca. Asimismo, bajo condiciones de 27°C y 65% de RH genera una reducción en la concentración de ficocianinas, pasando de 6% en la biomasa fresca a 4,53% en empaque de polipropileno y 4,70% en empaque de polietileno de baja densidad (Kumar et al., 1995).

Por otra parte, como se puede observar en los Cuadros 9 y 10, existe un comportamiento lineal descendente en la masa de huevo en la cuarta semana y en el porcentaje de postura a partir de la segunda semana, a medida que aumenta el nivel de inclusión. Esta tendencia puede estar relacionada a la disminución en el consumo de alimento presentada durante el periodo experimental a medida que aumenta el nivel de inclusión de *Arthrospira maxima* en los tratamientos, tal como se observa en la Figura 1. Cabe recalcar que los datos de consumo fueron recolectados por tratamiento, por lo tanto, no poseen repetibilidad lo que impide su análisis estadístico.

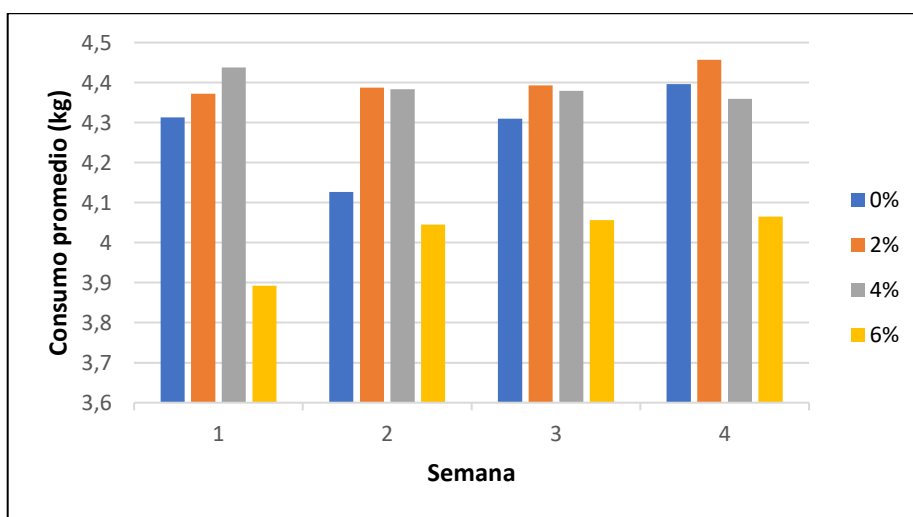


Figura 1. Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el consumo de alimento durante 4 semanas.



La reducción en el consumo puede estar relacionada a una disminución en la palatabilidad de las dietas a medida que aumenta la inclusión de *Arthrospira maxima*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Zahroojian et al. (2013) y Omri et al. (2018) quienes reportaron una disminución en el consumo; aunque no significativa, al incluir un 2% de *Arthrospira maxima*. No obstante, ambos estudios no llegaron a incorporar hasta un 6%, tal como se hizo en el presente ensayo, motivo por el cual es probable que no se presentaran diferencias significativas. Sin embargo, este comportamiento ha sido reportado en cerdos de guinea donde al incluir un 6% de *Arthrospira platensis* en el alimento balanceado se genera una disminución en el consumo de materia seca de 6,13 g/animal/día en comparación con una suplementación de 4% (Ngedia et al., 2019), lo que concuerda con esta investigación.

Por otra parte, a pesar de generar una reducción en el consumo de alimento, la inclusión de *Arthrospira maxima* no genera una diferencia significativa en la conversión alimenticia entre tratamientos, tal como se observa en el Cuadro 12.

**Cuadro 12.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la conversión alimenticia durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	lin	Cuad
0%	2,00(0,079) <sup>a,A</sup>	1,91(0,079) <sup>a,A</sup>	1,92(0,079) <sup>a,A</sup>	2,09(0,079) <sup>a,A</sup>	0,9986	0,5595
2%	2,05(0,079) <sup>a,A</sup>	2,04(0,079) <sup>a,A</sup>	2,05(0,079) <sup>a,A</sup>	2,17(0,079) <sup>a,A</sup>	0,5420	0,6736
4%	2,13(0,079) <sup>a,A</sup>	2,08(0,079) <sup>a,A</sup>	2,07(0,079) <sup>a,A</sup>	2,14(0,079) <sup>a,A</sup>	0,8584	0,5461
6%	1,99(0,079) <sup>a,A</sup>	2,05(0,079) <sup>a,A</sup>	2,00(0,079) <sup>a,A</sup>	1,95(0,079) <sup>a,A</sup>	0,5600	0,2561
lin	0,3379	0,1230	0,9948	0,7319		
cuad	0,0805	0,5571	0,5796	0,7403		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

La ausencia de diferencia significativa en la conversión alimenticia indica que la inclusión de *Arthrospira maxima* en sustitución de harina de soya como materia prima proteica, no genera un aumento en el consumo de alimento ni un detrimento en la digestibilidad y aprovechamiento de los nutrientes, dado su alto valor biológico (Rodríguez-Hernández et al., 2001; Shimamatsu, 2004; Alvarenga et al., 2011; Holman and Malau-Aduli, 2012; Batista et al., 2013; Sprujit et al., 2016; Mata, 2017). Sin embargo, debido a las características propias de la granja, fue imposible la medición del peso de las gallinas durante todo el periodo experimental. Por lo tanto, no se puede asegurar que la ausencia de diferencia significativa entre tratamientos se debe únicamente al alto valor biológico de la *Arthrospira maxima* y no a un proceso de

remoción de reservas corporales que permitieron mantener la masa de huevo y el porcentaje de postura sin diferencias, tal como se muestra en el Cuadro 9 y 10, respectivamente.

Por otra parte, en el Cuadro 13 se observa que durante las primeras dos semanas del periodo experimental se presenta una disminución significativa en la cantidad de huevo tipo A en todos los tratamientos con inclusión de *Arthrospira maxima* en comparación con el tratamiento control, misma que continúa numéricamente durante la semana 3 y 4.

**Cuadro 13.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el porcentaje de huevo tipo A durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	lin	cuad
0%	97,7(1,13) <sup>a,AB</sup>	98,3(0,88) <sup>a,A</sup>	91,4(2,68) <sup>a,B</sup>	94,0(2,21) <sup>a,AB</sup>	0,0000	0,6522
2%	95,6(1,76) <sup>a,A</sup>	89,4(2,99) <sup>b,A</sup>	87,1(3,26) <sup>a,A</sup>	91,4(2,69) <sup>a,A</sup>	0,0117	0,0019
4%	73,8(4,36) <sup>b,B</sup>	83,8(3,65) <sup>b,AB</sup>	87,4(3,23) <sup>a,A</sup>	86,7(3,32) <sup>a,AB</sup>	0,1679	1,0000
6%	76,2(4,23) <sup>b,B</sup>	91,7(2,62) <sup>b,A</sup>	82,0(3,81) <sup>a,AB</sup>	83,7(3,63) <sup>a,AB</sup>	0,0292	0,9993
lin	0,0515	0,3683	0,0391	0,9062		
cuad	0,9937	0,0630	0,3068	0,0675		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

Como se observa en la figura 2, el principal causante de la exclusión de huevos de la categoría tipo A fue la cantidad de huevo sucio en todos los tratamientos, es por esta razón que se realizó el análisis estadístico de esta categoría, tal como se muestra en el Cuadro 14.

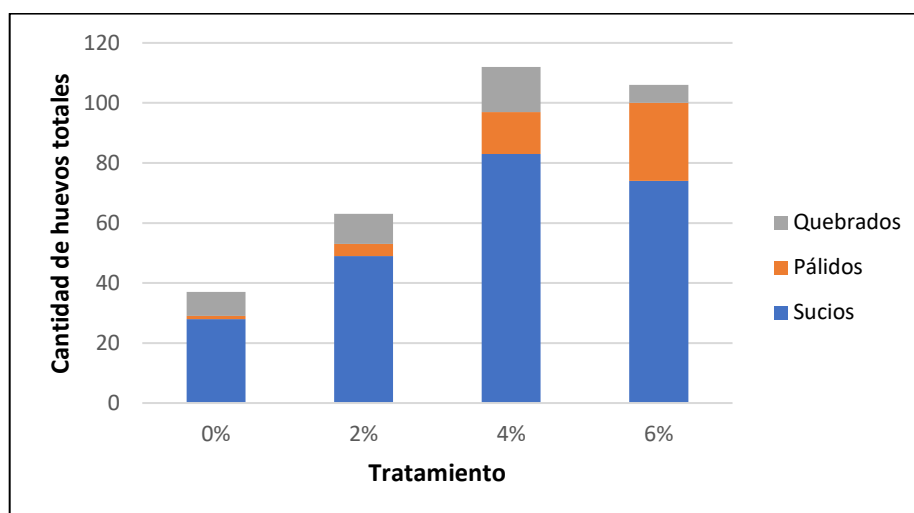


Figura 2. Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en dietas de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la cantidad de huevos sucios pálidos y quebrados durante 4 semanas.

El aumento en el porcentaje de huevo sucio en el tratamiento 2 y 4%; tal como se muestra en el Cuadro 14, fue generado probablemente por un efecto de la dilución de pigmentos en el agua bebida y almacenada en el buche por las aves, de manera que, al inclinar la cabeza como parte de la etología durante el proceso de postura y dado el movimiento retro peristáltico característico del sistema digestivo de las aves, se genera una deposición de líquido verdoso en la cáscara de los huevos almacenados temporalmente en la parte inferior de las jaulas. Por su parte, tal como se mencionó anteriormente, el consumo de alimento presentó una disminución al aumentar el nivel de inclusión de *Arthrospira maxima*, generando que el porcentaje de huevo sucio se presente con irregularidad con un nivel de inclusión del 6%.

**Cuadro 14.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el porcentaje de huevo sucio durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	lin	cuad
0%	1,6 (0,81) <sup>c,AB</sup>	1,0 (0,54) <sup>b,B</sup>	7,6 (2,72) <sup>a,A</sup>	5,8 (2,26) <sup>a,A</sup>	0,0002	0,3696
2%	3,1 (1,40) <sup>ab,A</sup>	7,5 (2,70) <sup>a,A</sup>	11,4 (3,59) <sup>a,A</sup>	4,8 (1,99) <sup>a,A</sup>	0,2006	0,0012
4%	19,5 (5,12) <sup>a,A</sup>	10,3 (3,36) <sup>a,A</sup>	7,8 (2,75) <sup>a,A</sup>	12,2 (3,76) <sup>a,A</sup>	0,5574	0,9686
6%	12,3 (3,77) <sup>ab,AB</sup>	3,3 (1,48) <sup>ab,B</sup>	15,2 (4,32) <sup>a,A</sup>	8,4 (2,88) <sup>a,AB</sup>	0,5270	0,9913
lin	0,0127	0,7615	0,4954	0,9932		
cuad	0,9949	0,0664	0,1939	0,6518		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

Además, tal como se observa en la figura 2, existe un aumento de la cantidad de huevos pálidos a medida que aumenta el nivel de inclusión de *Arthrospira maxima* en las dietas. Este efecto puede estar relacionado a la existencia de factores de estrés generados por la disminución en el consumo o deficiencias nutricionales no detectadas que provocan la secreción de epinefrina ocasionando una alteración del proceso ovoposición y la deposición de cutícula (Hughes and Black, 1976). Asimismo, puede existir un antagonismo entre el aporte mineral de las microalgas y la hemoglobina de las aves que afecte la deposición de portoporfirinas en la cutícula de la cáscara del huevo (Park et al., 2003). Sin embargo, no existe evidencia científica suficiente y es necesario profundizar en la investigación de este aspecto.

## 5.2. Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre el perfil lipídico del huevo.

En cuanto al efecto de la suplementación con *Arthrospira maxima* sobre el perfil lipídico del huevo, en el Cuadro 15 se muestran los resultados obtenidos.

**Cuadro 15.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el perfil lipídico del huevo.

Ácido graso (%)	0%	2%	4%	6%	Lin	Cuad
SFA	3,40 (0,121) <sup>a</sup>	3,58 (0,121) <sup>a</sup>	3,17 (0,121) <sup>a</sup>	3,41 (0,121) <sup>a</sup>	0,8757	0,9926
PUFA	1,91 (0,071) <sup>a</sup>	1,93 (0,116) <sup>a</sup>	1,72 (0,082) <sup>a</sup>	1,84 (0,102) <sup>a</sup>	0,6616	0,9380
MUFA	4,58 (0,127) <sup>ab</sup>	4,98 (0,184) <sup>a</sup>	4,28 (0,135) <sup>b</sup>	4,49 (0,205) <sup>ab</sup>	0,4753	0,9236
n3	0,05 (0,003) <sup>a</sup>	0,06 (0,070) <sup>a</sup>	0,03 (0,031) <sup>a</sup>	0,06 (0,074) <sup>a</sup>	1,0000	0,9939
n6	1,79 (0,066) <sup>a</sup>	1,87 (0,086) <sup>a</sup>	1,68 (0,076) <sup>a</sup>	1,79 (0,108) <sup>a</sup>	0,9374	0,9969
n9	4,36 (0,121) <sup>a</sup>	4,67 (0,211) <sup>a</sup>	4,01 (0,161) <sup>a</sup>	4,21 (0,179) <sup>a</sup>	0,3096	0,9840
Colesterol <sup>1</sup>	160,0 (14,4) <sup>a</sup>	161,7(14,4) <sup>a</sup>	153,0 (14,4) <sup>a</sup>	180,3 (14,4) <sup>a</sup>	0,8229	0,7811

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos. <sup>1</sup>Colesterol expresado como mg/100g de yema de huevo.

Tal como se puede observar en el Cuadro 15, únicamente los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) presentan diferencia significativa entre los tratamientos 2% y 4%, pero no así con el tratamiento control. Sin embargo, es posible determinar visualmente que todos los ácidos grasos presentan el mismo comportamiento; tal como se muestra en la Figura 3.

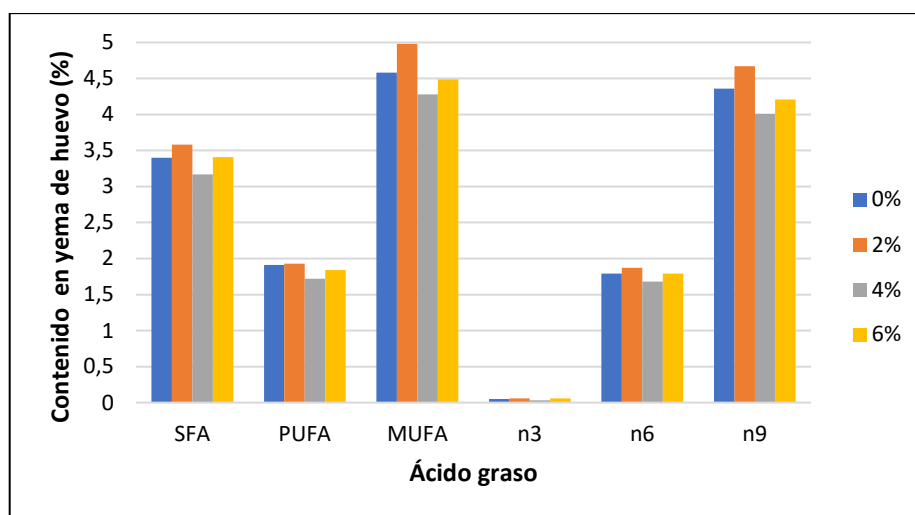


Figura 3. Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en dietas de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el comportamiento del contenido de ácidos grasos en huevo durante 4 semanas.

Como se puede observar en la Figura 3, en todos los ácidos grasos se presenta un aumento en el tratamiento 2% seguido de una disminución en el tratamiento de 4% y nuevamente un aumento al incluir un 6%. La deposición de ácidos grasos y el comportamiento en el contenido de ácidos grasos en la yema de huevo está directamente relacionado al contenido y

composición del perfil lipídico de la dieta ofrecida a las gallinas ponedoras (Griffin and Hermier, 1988; Sartori et al., 2009; Cherian, 2015). Es por esta razón que, considerando el extracto etéreo de cada dieta experimental de 4,50%, 5,24%, 4,41% y 5,06% para el tratamiento de 0%, 2%, 4% y 6% respectivamente, se genera el comportamiento observado en los ácidos grasos de la yema de huevo, tal como se observa en el Cuadro 15.

De las materias primas utilizadas en la elaboración de las dietas, el aceite de soya y la harina de microalga corresponden a las principales fuentes lipídicas. Por lo tanto, la conducta presentada en el extracto etéreo puede estar relacionada al porcentaje de inclusión de cada una, tal como se observa en la Figura 4.

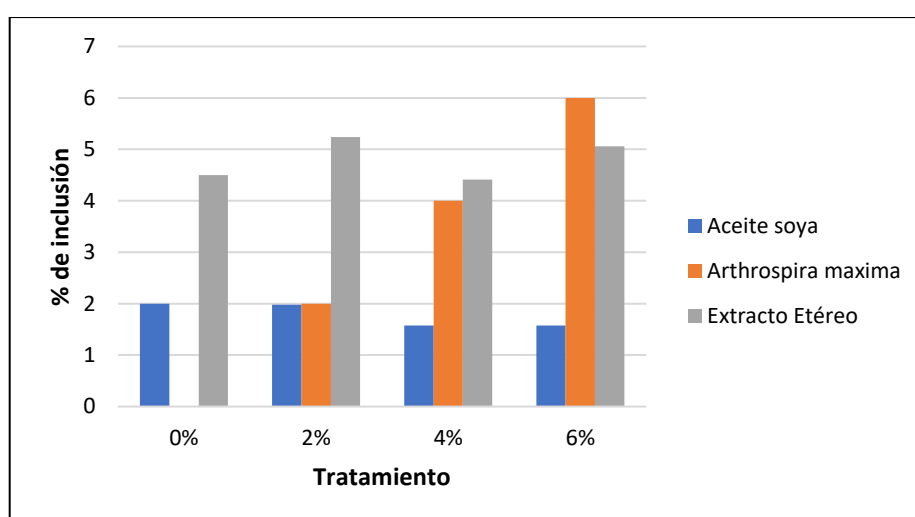


Figura 4. Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* y aceite de soya sobre el extracto etéreo de las dietas de gallinas ponedoras de 52 semanas.

Tal como se muestra en la Figura 4, el tratamiento 0% y 2% poseen una cantidad similar de aceite de soya, por lo tanto, al incluir *Arthrospira maxima* en el tratamiento 2%, se genera un aumento en el extracto etéreo de la dieta. Por otra parte, el tratamiento 4% y 6% poseen 0,5% menos de aceite de soya que el control, por lo tanto, se reduce la cantidad de ácidos grasos aportada por esta materia prima. Al agregar un 4% de *Arthrospira maxima* se genera una disminución de 0,5% extracto etéreo de la dieta, dado el bajo nivel de inclusión de la harina microalgal. Sin embargo, al aumentar el nivel de inclusión de microalga a un 6% se genera un aumento de 3% en el extracto etéreo del alimento balanceado, por efecto de volumen de inclusión de la *Arthrospira maxima*.

Los resultados del perfil lipídico del huevo son contrarios a los obtenidos por Selim y Abou-elkhair (2018) donde se reporta que una suplementación de 0,3% de *Spirulina sp.* genera una disminución en el contenido de colesterol en huevo de 13,6 a 11,7 mg/g producto de la disminución en los niveles de triglicéridos y colesterol sérico de la gallina de 135 mg/dl a 115 mg/dl. Asimismo, Mariey et al. (2012) determinaron que al suplementar gallinas ponedoras con 0,2% de *Spirulina sp.* se genera una reducción de 23,83 mg/100ml de triglicéridos y 7,34 mg/ml de colesterol en plasma sanguíneo, así como una reducción de 59,6 mg/g de lípidos totales y 3,3mg/g de colesterol en yema de huevo con respecto a resultados obtenidos con una dieta comercial de harina de soya y maíz. Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio, puede estar ocasionada; además de la variación en el extracto etéreo de las dietas, por factores externos a la inclusión de las materias primas.

Inicialmente, a pesar de no ser detectado durante la ejecución de este experimento, se pudo incurrir en errores de procesamiento en el dosificado y/o mezclado del alimento balanceado generado por un error humano o bien por defectos en la calibración del equipo de pesaje. Asimismo, tal como se explicó anteriormente, el daño en la calidad de los ácidos grasos de la *Arthrospira maxima* generado por el procesamiento y almacenamiento, pudo causar un detrimento en la deposición de los ácidos grasos y una reducción del comportamiento esperado de disminución en el contenido de colesterol y aumento de ácidos grasos en la yema de huevo (Mariey et al., 2012).

#### **Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre la calidad del huevo.**

En cuanto al efecto de la suplementación y el tiempo sobre la calidad del huevo, en el Cuadro 16 se muestran los resultados obtenidos sobre el peso del huevo.

**Cuadro 16.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el peso de huevo (g) durante 4 semanas.

	<b>Sem 1</b>	<b>Sem 2</b>	<b>Sem 3</b>	<b>Sem 4</b>	<b>lin</b>	<b>cuad</b>
0%	65,6(0,84) <sup>a,A</sup>	65,3(0,84) <sup>a,A</sup>	66,3(0,84) <sup>a,A</sup>	65,1(0,84) <sup>a,A</sup>	0,7477	0,9998
2%	65,5(0,84) <sup>a,A</sup>	64,9(0,84) <sup>a,A</sup>	65,5(0,84) <sup>a,A</sup>	67,0(0,84) <sup>a,A</sup>	0,9582	0,5608
4%	64,7(0,84) <sup>a,A</sup>	64,5(0,84) <sup>a,A</sup>	66,0(0,84) <sup>a,A</sup>	65,6(0,84) <sup>a,A</sup>	0,5664	0,9760
6%	64,7(0,84) <sup>a,A</sup>	66,1(0,84) <sup>a,A</sup>	64,6(0,84) <sup>a,A</sup>	65,2(0,84) <sup>a,A</sup>	0,9880	0,4511
lin	0,9946	0,0629	0,1824	0,9999		
cuad	0,8571	0,3338	0,9988	0,9123		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

Tal como se muestra en el Cuadro 16, no existe diferencia significativa en el peso de huevo entre tratamientos ni por efecto del tiempo. A pesar de la reducción en el porcentaje de inclusión de la harina de soya en las dietas experimentales, la ausencia de diferencias significativas se debe al aporte de lisina y metionina generado por la *Arthrospira maxima* (Alvarenga et al., 2011), considerando que ambos aminoácidos son limitantes en el peso final del huevo en gallinas ponedoras (Salvador and Guevara, 2013). Resultados similares fueron obtenidos Omri et al. (2019), donde se determinó un aumento de 0,42 g y 1,57 g al suplementar con 1,5 y 2,5% de *Spirulina* respectivamente; en comparación con el grupo control. Cabe resaltar que este aumento se atribuye al elevado contenido de proteína de la dieta ya que no se realizó una sustitución de la fuente proteica por *Spirulina* en las dietas experimentales.

Por otra parte, en el Cuadro 17 se muestran los resultados obtenidos del efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre el grosor de la cáscara de huevo promedio durante 4 semanas.

**Cuadro 17.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre el grosor de la cáscara de huevo (mm) durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Lin	cuad
0%	0,45(0,007) <sup>a,A</sup>	0,40(0,006) <sup>ab,AB</sup>	0,39(0,006) <sup>a,A</sup>	0,39(0,006) <sup>a,A</sup>	0,0949	0,9755
2%	0,42(0,007) <sup>b,A</sup>	0,38(0,006) <sup>b,B</sup>	0,39(0,006) <sup>a,B</sup>	0,39(0,006) <sup>a,B</sup>	0,0382	0,0640
4%	0,48(0,008) <sup>a,A</sup>	0,41(0,007) <sup>ab,AB</sup>	0,38(0,006) <sup>a,A</sup>	0,40(0,006) <sup>a,A</sup>	0,6491	0,7546
6%	0,45(0,008) <sup>a,A</sup>	0,42(0,007) <sup>a,B</sup>	0,39(0,006) <sup>a,A</sup>	0,40(0,006) <sup>a,A</sup>	0,8640	0,9993
lin	0,0949	0,0382	0,6491	0,8640		
cuad	0,9755	0,0640	0,7546	0,9993		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

Tal como se muestra en el Cuadro 17 el grosor de cáscara presenta un aumento a medida que aumenta el nivel de inclusión durante la semana 2. Asimismo, existe una tendencia lineal descendente por efecto del tiempo únicamente en los tratamientos 0% y 2%, comportamiento que puede sugerir que la inclusión de *Arthrospira maxima* reduce la degradación de la calidad de la cáscara. Resultados similares fueron obtenidos por Selim et al. (2018), quienes determinaron que la inclusión de hasta 0,5% de *Arthrospira maxima* incrementó el grosor de la cáscara de huevo. Considerando que en gallinas ponedoras la fuente de minerales genera un mayor impacto en la calidad de la cáscara del huevo que la cantidad de minerales presentes en la dieta (Lichovnikova, 2007), cabe la posibilidad de que este comportamiento se presente a raíz del elevado aporte de minerales quelatados (6,1%) de la *Arthrospira maxima* (Park et al., 2015). Entre ellos, Ca, P y minerales traza que intervienen como cofactores enzimáticos

en la formación de la cáscara del huevo (Mn, Zn y Fe) (Swiatkiewicz and Koreleski, 2008) con un aporte aproximado de 1,10, 3,40, y 16,2 mg/kg respectivamente (Selim et al., 2018).

Por otra parte, en el Cuadro 17 se puede observar que existe disminución numérica del grosor de cáscara en todos los tratamientos a partir de la semana 2, valor que se mantiene hasta finalizar el periodo experimental. Esta disminución puede estar relacionada a la etapa productiva de las gallinas, debido a que se ha determinado que la calidad de la cáscara de huevo disminuye en la postura tardía (55-65 semanas) (Roberts et al., 2013). Este efecto es propio de la fisiología de formación del huevo donde a lo largo de la curva de producción se deposita la misma cantidad de calcio para la formación de cáscara. Sin embargo, al aumentar el tamaño del huevo al final de la producción genera una dilución en la cantidad de cáscara por unidad de superficie disminuyendo así el grosor de la cáscara.

Asimismo, el grosor de cáscara puede estar relacionado con la reducción en el consumo de alimento a partir de la semana dos del periodo experimental, que generó una reducción en el consumo de calcio. Además, a pesar de que por las condiciones propias de la granja no fue posible evaluar la temperatura ambiental, un aumento en este parámetro pudo generar un incremento en el jadeo de las aves como un mecanismo de termorregulación por evaporación (Allahverdi et al., 2013). Este aumento en el jadeo ocasiona una pérdida de ácido carbónico e hidrógeno, generando un desbalance en el pH del plasma sanguíneo y a su vez, una restricción en la deposición de carbonato de calcio en la cáscara de huevo (Allahverdi et al., 2013).

Por otra parte, en el Cuadro 18 se muestran los resultados obtenidos al determinar el efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras sobre la coloración de la yema de huevo.

**Cuadro 18.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre la coloración de la yema de huevo según la escala Roche durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	lin	cuad
0%	13,60(0,132) <sup>a,A</sup>	13,14(0,129) <sup>a,AB</sup>	12,79(0,131) <sup>a,B</sup>	12,28(0,136) <sup>a,C</sup>	0,0077	0,0000
2%	12,26(0,130) <sup>c,A</sup>	11,13(0,133) <sup>c,B</sup>	10,05(0,145) <sup>d,C</sup>	9,65(0,162) <sup>d,C</sup>	0,0000	0,0000
4%	12,72(0,137) <sup>bc,A</sup>	11,86(0,122) <sup>b,B</sup>	11,26(0,137) <sup>c,C</sup>	11,00(0,131) <sup>c,C</sup>	0,2297	0,0000
6%	12,87(0,120) <sup>b,A</sup>	12,07(0,116) <sup>b,B</sup>	12,07(0,115) <sup>b,B</sup>	11,53(0,142) <sup>b,C</sup>	0,3858	0,0000
lin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		
cuad	0,9950	0,0310	0,0598	0,6122		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.



En el Cuadro 18 se puede observar que existen diferencias significativas en la coloración de yema entre tratamientos al aumentar el porcentaje de inclusión y por efecto del tiempo. En cuanto a la diferencia entre tratamientos, se presenta un aumento en la coloración conforme aumenta el nivel de inclusión de *Arthrospira maxima*. Sin embargo, fue necesaria la inclusión de 6% para alcanzar niveles de coloración aceptables para el mercado costarricense, lo cual indica que, a pesar de los problemas de palatabilidad presentados, la biomasa si posee capacidad pigmentante. Estos resultados son contrarios a los reportados previamente por (Zahroojian et al., 2013) quien determinó que la inclusión de 2,5% de *Arthrospira maxima* liofilizada en dietas sin pigmentante artificial, alcanza una coloración de yema con una calificación de 11,66 en la escala Roche, similar a la dieta control con pigmentante artificial. Es decir, se requirió menor concentración de *Arthrospira maxima* para alcanzar una elevada calificación de coloración.

Esta diferencia en la coloración obtenida puede estar relacionada a un efecto del procesamiento de secado (extrusión o por liofilización) de la microalga, sobre la conservación de los pigmentos carotenoides, siendo la liofilización la que mejor conserva los componentes y aporta un mejor color a la yema (Anderson et al., 1991; Ross et al., 1994). Por otra parte, el secado mediante procesos de convección; utilizado para la producción de la harina utilizada en este experimento, tiende a disminuir el efecto de la *Arthrospira maxima* sobre la pigmentación de la yema de huevo.

Como se puede observar en el Cuadro 17, todos los tratamientos presentan una disminución en la coloración por efecto del tiempo al aumentar el periodo experimental. Este comportamiento puede estar relacionado a un efecto de arrastre de la alimentación previa que contiene pigmentante artificial o a la disminución del consumo de alimento.

Por otra parte, la inclusión de *Arthrospira maxima* no generó un efecto significativo sobre las unidades Haugh, tal como se muestra en el Cuadro 19.

**Cuadro 19.** Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* en la alimentación de gallinas ponedoras de 52 semanas sobre las unidades Haugh durante 4 semanas.

	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	lin	cuad
0%	93,1(1,44) <sup>a,A</sup>	87,0(1,44) <sup>a,BC</sup>	89,7(1,44) <sup>a,AB</sup>	82,2 (1,44) <sup>a,C</sup>	0,9998	0,0354
2%	88,5(1,44) <sup>a,A</sup>	87,3(1,44) <sup>a,A</sup>	91,2(1,44) <sup>a,A</sup>	81,3 (1,44) <sup>a,B</sup>	0,9631	0,5117
4%	89,4(1,44) <sup>a,A</sup>	90,3(1,44) <sup>a,A</sup>	89,0(1,44) <sup>a,A</sup>	80,2 (1,44) <sup>a,B</sup>	0,9891	0,9954
6%	93,0(1,44) <sup>a,A</sup>	86,9(1,44) <sup>a,BC</sup>	91,1(1,44) <sup>a,AB</sup>	84,2 (1,44) <sup>a,C</sup>	0,8435	0,2779
lin	0,0000	0,0060	0,0000	0,0004		
cuad	0,9374	0,0042	0,0010	0,9878		

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de semana. Letras mayúsculas diferentes reflejan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre semanas dentro de tratamientos.

Como se puede observar en el Cuadro 19, no existen diferencias significativas por efecto del nivel de inclusión de *Arthrospira maxima* en ninguna semana del periodo experimental. Sin embargo, se presenta una tendencia lineal a lo largo de las 4 semanas. Considerando que el valor de las Unidades Haugh corresponde a un resultado de una ecuación matemática que contempla la altura de la albúmina y el peso de huevo, ambos factores podrían afectar el resultado obtenido. Como se puede observar al comparar los resultados obtenidos de peso de huevo (Cuadro 16) y Unidades Haugh (Cuadro 19), el valor obtenido en las Unidades Haugh es inverso al peso de huevo, es decir, este valor se disminuye al aumentar el peso de huevo.

La altura de la albumina está determinada por la concentración de la proteína ovomucina en la albúmina densa de huevo, misma que a su vez se compone de dos unidades estructurales; beta-ovomucina formada por los aminoácidos Serina y Treonina y alfa-ovomucina conformada por ácido Aspártico y ácido Glutámico (Wang et al., 2011; Nongtaodum et al., 2013). Es por esta razón que la altura del albumen y con ello las unidades Haugh pueden ser afectadas con la dieta ofrecida a las gallinas (Wang et al., 2011). Tal como se mencionó anteriormente (Cuadro 6) la biomasa *Arthrospira maxima* producida en condiciones mixotróficas con cerdaza aporta un 1,84, 4,816, 7,088% de Serina, Aspartato y Glutamina respectivamente, valores similares a los aportados por la harina de soya (2,42% de Serina, 5,29% de Aspartato y 8,65% de ácido Glutámico) (Mata, 2017).

Sin embargo, para realizar la formulación de las dietas experimentales se utilizó el perfil de aminoácidos correspondiente al análisis de un lote de harina de microalga diferente al utilizado en la elaboración de las dietas. Por lo tanto, es posible que el contenido de estos aminoácidos sea superior y se acerque al reportado en la literatura de 2,92%, 2,84%, 5,34% y 8,15% para Serina, Treonina, Aspartato y Glutamina respectivamente (Alvarenga et al., 2011). Siendo así,

el aporte de estos aminoácidos clave para la concentración de ovomucina en la yema de huevo es superior a la aportado por la harina de soya. De este modo, es posible que la inclusión de *Arthrospira maxima* favorezca el aumento en las unidades Haugh, alcanzando valores inclusive superiores a los obtenidos con dietas comerciales con harina de soya (tratamiento control 0%).

Por otra parte, tal como muestra en el Cuadro 19, existen una disminución significativa de las Unidades Haugh durante la última semana del periodo experimental en todos los tratamientos, efecto que puede estar relacionado a condiciones externas a la formulación y manejo del alimento, y ser generado por factores de almacenamiento del huevo, edad de las aves y la temperatura ambiental.

### **5.3. Efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre el precio de las dietas.**

Finalmente, se determinó el costo de cada uno de los alimentos balanceados formulados a partir del costo de cada materia prima y el costo de producción de la harina de biomasa microalgal reportado por el Instituto Tecnológico de Costa Rica (Cuadro 20).

**Cuadro 20.** Costo del kg de alimento balanceado utilizado para cada uno de los tratamientos durante el periodo experimental.

<b>Materia Prima</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>4%</b>	<b>6%</b>
Maíz	₡79,55	₡80,45	₡82,16	₡81,02
Harina de Soya	₡58,02	₡52,68	₡45,54	₡41,92
Carbonato de Calcio Malla 8	₡1,74	₡1,74	₡1,74	₡1,74
Carbonato de Calcio Malla 20	₡1,07	₡1,08	₡1,09	₡1,12
Acemite de Trigo	₡4,50	₡4,50	₡5,20	₡6,00
Spirulina	-	₡9,00	₡18,00	₡27,00
Aceite de Soya	₡10,20	₡9,63	₡7,65	₡7,65
Fosfato MC	₡2,49	₡2,22	₡1,95	₡1,66
PMX Postura	₡4,54	₡4,54	₡4,54	₡4,54
Sal 4% H	₡0,20	₡0,19	₡0,15	₡0,18
DI-Metionina	₡4,58	₡4,21	₡3,96	₡3,37
Bicarbonato de Sodio	₡0,72	₡0,67	₡0,70	₡0,51
Betaina	₡4,33	₡4,33	₡4,33	₡4,33
Calibrin Z	₡2,28	₡2,28	₡2,28	₡2,28
Butirato de Sodio	₡2,50	₡2,50	₡2,50	₡2,50
L-Lisina	₡0,44	₡0,48	₡0,88	₡0,64
Protector Hepático	₡4,18	₡4,18	₡4,18	₡4,18
L-Treonina	₡0,06	₡0,19	₡0,21	-
Cantaxantina	₡1,36	-	-	-
<b>Costo kg</b>	<b>₡182,76</b>	<b>₡184,87</b>	<b>₡187,07</b>	<b>₡190,63</b>

Tal como se muestra en el Cuadro 19, la inclusión de harina de *Arthrospira maxima* en dietas de gallinas ponedoras en producción, genera un aumento en el costo por kg de alimento de ₡2,11, ₡4,31 y ₡7,87 en el tratamiento 2%, 4% y 6% respectivamente, en relación con la dieta control. Este aumento responde a la sustitución de parte de la harina de soya por harina de *Arthrospira maxima*, ya que el precio de esta (\$0,79) duplica el de la harina de soya (\$0,38). Además, se puede observar que a pesar de que se genera un ahorro de \$0,002 al eliminar el uso de la Cantaxantina, no es suficiente para igualar el costo de la dieta control (0%).

## 6. CONCLUSIONES

La inclusión de harina de *Arthrospira maxima* producida en condiciones mixotróficas, con cerdaza en dietas de gallinas ponedoras no genera aumento ni detrimento de la concentración de ácidos grasos y colesterol en la yema de huevo. Además, ningún porcentaje de inclusión afectó negativamente el desempeño productivo de las aves, peso del huevo, grosor de la cáscara ni unidades Haugh, lo cual indica que esta puede ser utilizada como materia prima proteica hasta en un 6% de inclusión. El aumento en el nivel de inclusión incrementa la coloración de la yema, aún, cuando requiere un periodo de acostumbramiento de dos semanas, y por lo tanto, puede ser utilizada en sustitución del pigmentante según la coloración que demanda el mercado. No obstante, la inclusión de harina de *Arthrospira maxima* genera un aumento en el costo de las dietas, por lo tanto, para que la materia prima sea competitiva en un sistema de formulación al mínimo costo, su precio no debe ser superior a la suma del costo por unidad de la materia prima proteica habitual y el costo por unidad de pigmentante sustituido.

## 7. RECOMENDACIONES

Para posibles alcances futuros del proyecto, se sugiere realizar un ensayo para determinar la vida útil de la harina de *Arthrospira maxima* producida en condiciones mixotróficas con cerdaza. Asimismo, considerar un método de secado y almacenamiento que permita reducir el posible daño ocasionado a la biomasa, o bien, utilizar harina fresca.

Por otra parte, en cuanto al desarrollo del experimento se recomienda aumentar el periodo experimental con el fin de determinar el efecto de la inclusión de *Arthrospira maxima* sobre el consumo de alimento, así como medir las condiciones ambientales del galpón y pesar las aves al inicio y final del periodo experimental para evaluar procesos de movilización de reservas corporales.

Tomando en cuenta el costo de la *Arthrospira maxima*, se puede considerar la utilización de la biomasa microalgal producida en condiciones mixotróficas con cerdaza, como un aditivo nutricional y evaluar sus efectos sobre la salud del animal y por ende en el rendimiento productivo.

## 7. LITERATURA CITADA

- Allahverdi, A., A. Feizi, H. Takhtfooladi, and H. Nikpiran. 2013. Effects of Heat Stress on Acid-Base Imbalance, Plasma Calcium Concentration, Egg Production and Egg Quality in Commercial Layers. *Global Veterinaria* 10: 203–207. doi: 10.5829/idosi.gv.2013.10.2.7286.
- Alvarenga, R.R., P.B. Rodrigues, V. de S. Cantarelli, M.G. Zangeronimo, S. Júnior, et al. 2011. Energy values and chemical composition of spirulina (*Spirulina platensis*) evaluated with broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(5): 992–996. doi: 10.1590/S1516-35982011000500008.
- Ambrosi, M.A., J.A.V. Costa, T.E. Bertolini, C.O. Reinehr, and L.M. Colla. 2008. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 29(2): 109–117.
- Ambrosi, M., C. Reinehr, T. Bertolin, J.A. Costa, and L. Colla. 2009. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 29.
- Anderson, D.W., C.-S. Tang, and E. Ross. 1991. The Xanthophylls of *Spirulina* and Their Effect on Egg Yolk Pigmentation,. *Poult Sci* 70(1): 115–119. doi: 10.3382/ps.0700115.
- Batista, A.P., L. Gouveia, N.M. Bandarra, J.M. Franco, and A. Raymundo. 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research* 2(2): 164–173. doi: 10.1016/j.algal.2013.01.004.
- Belay, A., T. Kato, and Y. Ota. 1996. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. *J Appl Phycol* 8(4–5): 303–311. doi: 10.1007/BF02178573.
- Bleakley, S., and M. Hayes. 2017. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* 6(5). doi: 10.3390/foods6050033.
- Brooks, M., K. Kristensen, K. van Benthem, A. Magnusson, C.W. Berg, et al. 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R Journal* 9: 378–400.
- Camarinha, V., A. Gaspar, L.F.L. Calixto, and T.S.P. Agostinho. 2011. Stability of the pigmentation of egg yolks enriched with omega-3 and carophyll stored at room

- temperature and under refrigeration. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(7): 1540–1544. doi: 10.1590/S1516-35982011000700020.
- Carranco, M., M. de la Concepción, and R. Pérez-Gil. 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 61(3): 233–241.
- Casas, S., L. Guerra, Á. Rizo, and F. Izquierdo. 2016. Empleo de los diámetros del huevo para el cálculo del volumen y superficie y su correlación con otros caracteres externos e internos en tres propósitos de gallinas reproductoras. *Revista de Producción Animal* 28: 33–38.
- Castro-González, M.I. 2002. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia* 27(3): 128–136.
- Cherian, G. 2013. 9 - Egg enrichment with omega-3 fatty acids. *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*. Woodhead Publishing. p. 288–298
- Cherian, G. 2015. Nutrition and metabolism in poultry: role of lipids in early diet. *J Anim Sci Biotechnol* 6(1): 28. doi: 10.1186/s40104-015-0029-9.
- Cherian, G., T.B. Holsonbake, and M.P. Goeger. 2002. Fatty Acid Composition and Egg Components of Specialty Eggs. *Poultry Science* 81(1): 30–33. doi: 10.1093/ps/81.1.30.
- Chiattoni, L.M., M.R.G. Machado, R. da S. Rodrigues, and L.A. de S. Soares. 2015. Influência do consumo de diferentes níveis de Spirulina no desenvolvimento e perfil lipídico de ratos. *Revista Ceres* 62(2): 142–148. doi: 10.1590/0034-737X201562020003.
- Christensen, R.H.B. 2019. ordinal: Regression Models for Ordinal Data.
- CIAB. 2018. Situación actual de alimentos balanceados. Cámara de Industriales de Alimento Balanceado, Costa Rica.
- Colla, L.M., C.D. Bertol, D.J. Ferreira, J. Bavaresco, J. a. V. Costa, et al. 2017. Thermal and photo-stability of the antioxidant potential of *Spirulina platensis* powder. *Brazilian Journal of Biology* 77(2): 332–339. doi: 10.1590/1519-6984.14315.
- Colla, L.M., E.B. Furlong, and J.A.V. Costa. 2007. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes.



Brazilian Archives of Biology and Technology 50(1): 161–167. doi: 10.1590/S1516-89132007000100020.

Cooper, A.D. 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* 38(11): 2173–2192.

Coorey, R., A. Novinda, H. Williams, and V. Jayasena. 2015. Omega-3 fatty acid profile of eggs from laying hens fed diets supplemented with chia, fish oil, and flaxseed. *J. Food Sci.* 80(1): S180-187. doi: 10.1111/1750-3841.12735.

da Costa, E., J. Silva, S.H. Mendonça, M.H. Abreu, and M.R. Domingues. 2016. Lipidomic Approaches towards Deciphering Glycolipids from Microalgae as a Reservoir of Bioactive Lipids. *Mar Drugs* 14(5). doi: 10.3390/md14050101.

Cribari-Neto, F., and A. Zeileis. 2010. Beta Regression in R. *Journal of Statistical Software* 34(1): 1–24. doi: 10.18637/jss.v034.i02.

Cuellar-Bermudez, S.P., I. Aguilar-Hernandez, D.L. Cardenas-Chavez, N. Ornelas-Soto, M.A. Romero-Ogawa, et al. 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microb Biotechnol* 8(2): 190–209. doi: 10.1111/1751-7915.12167.

Delgado-Vargas, F., A.R. Jiménez, and O. Paredes-López. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40(3): 173–289. doi: 10.1080/10408690091189257.

Derner, R.B., S. Ohse, M. Villela, S.M. de Carvalho, and R. Fett. 2006. Microalgae, products and applications. *Ciência Rural* 36(6): 1959–1967. doi: 10.1590/S0103-84782006000600050.

Diraman, H., E. Koru, and H. Dibeklioglu. 2009. Fatty Acid Profile of *Spirulina platensis* Used as a Food Supplement. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 61: 134–142.

Dolz, R., R. Gallego, M. Pinazo, and M. Díaz. 2013. Densidad óptica de pigmento macular. *Revista de información e investigación oftalmológica de Laboratorios Thea* 68: 5–7.

DOUE. 2015. Comunicación de la Comisión — Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria. : 20.

- Eriksen, N.T. 2008. Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80(1): 1–14. doi: 10.1007/s00253-008-1542-y.
- Evans, A.M., D.L. Smith, and J.S. Moritz. 2015. Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance. *J Appl Poult Res* 24(2): 206–214. doi: 10.3382/japr/pfv027.
- Farinango, L.N.A. 2014. OBTENCIÓN DE LA ESPIRULINA EN POLVO POR SECADO AL VACÍO PARA EL ENRIQUECIMIENTO NUTRICIONAL DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS. : 121.
- Garcia, E.A., A.B. Molino, H.C. Gonçalves, O.M. Junqueira, K. Pelícia, et al. 2010. Ground annatto seeds (*Bixa orellana* L.) in sorghum-based commercial layer diets and their effects on performance, egg quality, and yolk pigmentation. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 12(4): 259–264. doi: 10.1590/S1516-635X2010000400007.
- Gershwin, M.E., and A. Belay. 2007. *Spirulina in Human Nutrition and Health*. CRC Press.
- Ghaeni, M., L. Roomiani, and Y. Moradi. 2014. Evaluation of Carotenoids and Chlorophyll as Natural Resources for Food in *Spirulina* Microalgae. *Applied Food Biotechnology* 2(1): 39–44. doi: 10.22037/afb.v2i1.7210.
- Godos, I. de, S. Blanco, P.A. García-Encina, E. Becares, and R. Muñoz. 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresour. Technol.* 100(19): 4332–4339. doi: 10.1016/j.biortech.2009.04.016.
- Gouveia, L., I. Sousa, A.P. Batista, A. Raymundo, and N.M. Bandarra. 2008. Microalgae in novel food products. *Food Chemistry Research Developments*: 75–112.
- Griffin, H., and D. Hermier. 1988. Chapter 16 - Plasma lipoprotein metabolism and fattening in poultry. In: Leclercq, B. and Whitehead, C.C., editors, *Leanness in Domestic Birds*. Butterworth-Heinemann. p. 175–201

- Grinstead, G.S., M.D. Tokach, S.S. Dritz, R.D. Goodband, and J.L. Nelssen. 2000. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 83(3): 237–247. doi: 10.1016/S0377-8401(99)00130-3.
- Gutiérrez-Salmeán, G., L. Fabila-Castillo, and G. Chamorro-Cevallos. 2015. NUTRITIONAL AND TOXICOLOGICAL ASPECTS OF SPIRULINA (ARTHROSPIRA). *Nutr Hosp* 32(1): 34–40. doi: 10.3305/nh.2015.32.1.9001.
- Habib, M.A.B., editor. 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Hammershøj, M., U. Kidmose, and S. Steinfeldt. 2010. Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material for egg-laying hens. *J. Sci. Food Agric.* 90(7): 1163–1171. doi: 10.1002/jsfa.3937.
- Han, L.-K., D.-X. Li, L. Xiang, X.-J. Gong, Y. Kondo, et al. 2006. [Isolation of pancreatic lipase activity-inhibitory component of *spirulina platensis* and it reduce postprandial triacylglycerolemia]. *Yakugaku Zasshi* 126(1): 43–49. doi: 10.1248/yakushi.126.43.
- Hermier, D. 1997. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J. Nutr.* 127(5 Suppl): 805S-808S.
- Holman, B., and A. Malau-Aduli. 2012. *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. *Journal of animal physiology and animal nutrition.* doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01328.x.
- Hughes, B.O., and A.J. Black. 1976. The influence of handling on egg production, egg shell quality and avoidance behaviour of hens. *British Poultry Science* 17(2): 135–144. doi: 10.1080/00071667608416258.
- Jones, D., and M. Musgrove. 2005. Effects of extended storage on egg quality factors. *Poultry science* 84: 1774–7. doi: 10.1093/ps/84.11.1774.

- Kang, D.-K., S.-I. Kim, C.-H. Cho, Y.-H. Yim, and H.-S. Kim. 2003. Use of Lycopene, an Antioxidant Carotenoid, in Laying Hens for Egg Yolk Pigmentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16(12): 1799–1803. doi: 2003.16.12.1799.
- Kaoud, H.A. 2012. Effect of spirulina platensis as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. : 6.
- Krogdahl, A. 1985. Digestion and absorption of lipids in poultry. *J. Nutr.* 115(5): 675–685. doi: 10.1093/jn/115.5.675.
- Kumar, K.R., M. Mahadevaswamy, and L.V. Venkataraman. 1995. Storage quality of powdered cyanobacterium —Spirulina platensis. *Z Lebensm Unters Forsch* 201(3): 289–292. doi: 10.1007/BF01193006.
- Lemahieu, C., C. Bruneel, R. Termote-Verhalle, K. Muylaert, J. Buyse, et al. 2014. Effect of different microalgal n–3 PUFA supplementation doses on yolk color and n–3 LC-PUFA enrichment in the egg. *Algal Research* 6: 119–123. doi: 10.1016/j.algal.2014.10.007.
- Lenth, R., H. Singmann, J. Love, P. Buerkner, and M. Herve. 2020. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- León, C., and D. Chaves. 2010. Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua Lemna aequinoctiales y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 1(2): 155–177.
- Li-Chan, E.C.Y., and H.-O. Kim. 2007. Structure and Chemical Compositions of Eggs. *Egg Bioscience and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd. p. 1–95
- Lichovnikova, M. 2007. The effect of dietary calcium source, concentration and particle size on calcium retention, eggshell quality and overall calcium requirement in laying hens. *Br. Poult. Sci.* 48(1): 71–75. doi: 10.1080/00071660601148203.
- Mariey, Y.A., H.R. Samak, and M.A. Ibrahim. 2012. EFFECT OF USING SPIRULINA PLATENSIS ALGAE AS AFEED ADDITIVE FOR POULTRY DIETS: 1- PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE PERFORMANCES of LOCAL LAYING HENS. *Egypt Poultry Science* 32(1): 201–215.

- Mata, L. 2017. Tabla de Composición de Materias Primas Usadas en Alimentos para Animales: 2017.
- Mühling, M., A. Belay, and B.A. Whitton. 2005. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *J Appl Phycol* 17(2): 137–146. doi: 10.1007/s10811-005-7213-9.
- Nagaoka, S., K. Shimizu, H. Kaneko, F. Shibayama, K. Morikawa, et al. 2005. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J. Nutr.* 135(10): 2425–2430. doi: 10.1093/jn/135.10.2425.
- Nguedia, G., E. Miégoué, T. Fernand, M. Mouchili, S. Camara, et al. 2019. Effect of Graded Levels of *Spirulina* (*Arthrospira Platensis*) on Feed Intake and in vivo Digestibility of *Trypsacum laxum* in Guinea Pig (*Cavia Porcellus L.*).
- Nongtaodum, S., A. Jangchud, K. Jangchud, P. Dhamvithee, H.K. No, et al. 2013. Oil coating affects internal quality and sensory acceptance of selected attributes of raw eggs during storage. *J. Food Sci.* 78(2): S329-335. doi: 10.1111/1750-3841.12035.
- Nouri, E., and H. Abbasi. 2018. Effects of Different Processing Methods on Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of *Spirulina platensis*. *Applied Food Biotechnology* 5(4): 221–232. doi: 10.22037/afb.v5i4.20715.
- Nyberg, J. 2017. Analysis of fatty acids in egg yolks of various production systems. <https://stud.epsilon.slu.se/12781/> (accessed 11 May 2020).
- Olguín, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol. Adv.* 22(1–2): 81–91.
- Oliveira, C.A. de, A.A. de O. Campos, S.M.R. Ribeiro, W. de C. Oliveira, and A.G. do Nascimento. 2013. Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria *spirulina*. *Revista da Associação Brasileira de Nutrição - RASBRAN* 5(1): 52–59.
- Oliveira, G.E., T.C. Figueiredo, M.R. Souza, A.L. Oliveira, S.V. Cançado, et al. 2009. Bioactive amines and quality of egg from Dekalb hens under different storage conditions. *Poult. Sci.* 88(11): 2428–2434. doi: 10.3382/ps.2009-00028.

- Omri, B., M. Amraoui, A. Tarek, M. Lucarini, A. Durazzo, et al. 2019. *Arthrospira Platensis* (Spirulina) Supplementation on Laying Hens' Performance: Eggs Physical, Chemical, and Sensorial Qualities. *Foods* 8(9). doi: 10.3390/foods8090386.
- Ortiz-Moreno, M.L., C.E. Cortés-Castillo, J. Sánchez-Villarraga, A.M. Otero-Paternina, and J. Padilla. 2012. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotroficas y mixotroficas. *Orinoquia* 16(1): 11–20. doi: 10.22579/20112629.224.
- Osorio, J.H., and J.D. Flórez. 2011. Diferencias bioquímicas y fisiológicas en el metabolismo de lipoproteínas de aves comerciales. *Biosalud* 10(1): 88–98.
- Padilla, M. 2006. Algunas consideraciones sobre el manejo y utilización de los remanentes de granjas porcinas. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica.
- Pareja, M.M.E., L.F.G. Vasco, M.H. Torres, and L.F.R. Betancur. 2010. Efecto de la temperatura y el volteo durante el almacenamiento sobre la calidad del huevo comercial. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 23(2): 183–190.
- Park, J.H., S.D. Upadhaya, and I.H. Kim. 2015. 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-australas. J. Anim. Sci.* 28(3): 391–397. doi: 10.5713/ajas.14.0463.
- Park, Y.S., I.J. Yoo, K.H. Jeon, H.K. Kim, E.J. Chang, et al. 2003. Effects of Various Eggshell Treatments on the Egg Quality during Storage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16(8): 1224–1229. doi: 2003.16.8.1224.
- Parra, J., A. Torres, D. Rojas-Tortolero, E. Durazzi, E. Ineichen, et al. 2017. Inclusión de la cianobacteria *Arthrospira maxima* como fuente de carotenoides en la dieta de gallinas ponedoras y su evaluación sobre la calidad del huevo. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 8: 1–16.
- Peiretti, P.G., and G. Meineri. 2011. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. *Livestock Science* 140(1): 218–224. doi: 10.1016/j.livsci.2011.03.031.

- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, and D. Sarkar. 2020. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Austria.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Roberts, J.R., K. Chousalkar, and Samiullah. 2013. Egg quality and age of laying hens: implications for product safety. *Animal production science*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400036747> (accessed 11 May 2020).
- Rodríguez, Q., A. Vega, B. Domínguez, and C. Verduzco. 2016. SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO A NIVEL LABORATORIO PARA EL. 1: 6.
- Rodríguez-Hernández, A., J.L. Blé-Castillo, M.A. Juárez-Oropeza, and J.C. Díaz-Zagoya. 2001. Spirulina maxima prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sci.* 69(9): 1029–1037.
- Romay, C., R. González, N. Ledón, D. Ramirez, and V. Rimbau. 2003. C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4(3): 207–216. doi: 10.2174/1389203033487216.
- Romero Maza, L.D. los Á., M.Á. Guevara, B.J. Gómez, B. Arredondo-Vega, R. Cortez, et al. 2017. Producción de pigmentos procedentes de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Rev.Colomb.Biotecnol.* 19(1): 108–114. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.59671.
- Ross, E., D.P. Puapong, F.P. Cepeda, and P.H. Patterson. 1994. Comparison of freeze-dried and extruded *Spirulina platensis* as yolk pigmenting agents. *Poult. Sci.* 73(8): 1282–1289. doi: 10.3382/ps.0731282.
- Rossi, P., J.K. Nunes, F. Rutz, M.A. Anciuti, P.V.D. Moraes, et al. 2015. Effect of sweet green pepper on yolk color and performance of laying hens. *J Appl Poult Res* 24(1): 10–14. doi: 10.3382/japr/pfu003.
- Salvador, E., and V. Guevara. 2013. Desarrollo y validación de un modelo de predicción del requerimiento óptimo de aminoácidos esenciales y del comportamiento productivo en

- ponedoras comerciales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 24(3): 264–276.
- Sánchez, M., J. Bernal-Castillo, C. Rozo, and I. Rodríguez. 2003. *Spirulina (Arthrospira): An edible microorganism. A review. Universitas Scientiarum* 8: 7–24.
- Sandoval, M., F. Soriano, and Instituto de Estudios del Huevo. 2009. *El gran libro del huevo*. Everest, León.
- Santos-Bocanegra, E., X. Ospina-Osorio, and E.O. Oviedo-Rondon. 2004. Evaluation of Xanthophylls Extracted from *Tagetes erectus* (Marigold Flower) and *Capsicum Sp.* (Red Pepper Paprika) as a Pigment for Egg-yolks Compare with Synthetic Pigments. *International Journal of Poultry Science*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012051425> (accessed 15 April 2018).
- Sartori, É.V., S.G. Canniatti-Brazaca, S.H. da Cruz, and S.A. Gaziola. 2009. Concentração de proteínas em gemas de ovos de poedeiras (*Gallus gallus*) nos diferentes ciclos de postura e sua interferência na disponibilidade do ferro. *Food Science and Technology* 29(3): 481–487. doi: 10.1590/S0101-20612009000300004.
- Scott, T.A., and F.G. Silversides. 2000. The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poult. Sci.* 79(12): 1725–1729. doi: 10.1093/ps/79.12.1725.
- Selim, S., E. Hussein, and R. Abou-elkhair. 2018. Effect of *Spirulina platensis* as a feed additive on laying performance, egg quality and hepatoprotective activity of laying hens Einfluss von *Spirulina platensis* als Futterzusatzstoff auf die Legeleistung, die Eiqualität und den Leberschutz von Legehennen.
- Shimamatsu, H. 2004. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia* 512(1): 39–44. doi: 10.1023/B:HYDR.0000020364.23796.04.
- Silversides, F.G., and K. Budgell. 2004. The Relationships Among Measures of Egg Albumen Height, pH, and Whipping Volume1. *Poultry Science* 83(10): 1619–1623. doi: 10.1093/ps/83.10.1619.



- Skřivan, M., M. Marounek, M. Englmaierová, and E. Skřivanová. 2016. Effect of increasing doses of marigold ( *Tagetes erecta* ) flower extract on eggs carotenoids content, colour and oxidative stability. *J. Anim. Feed Sci.* 25(1): 58–64. doi: 10.22358/jafs/65588/2016.
- Sobiechowska-Sasim, M., J. Stoń-Egiert, and A. Kosakowska. 2014. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria—an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. *J Appl Phycol* 26(5): 2065–2074. doi: 10.1007/s10811-014-0244-3.
- Sprujit, J., R. Van der Weide, and M. Van Krimpen. 2016. Opportunities for micro algae as ingredient in animal diets. *ACRRES PPO-712*: 1–46.
- Swiatkiewicz, S., and J. Koreleski. 2008. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. *Veterinarni Medicina* 53(No. 10): 555–563. doi: 10.17221/1966-VETMED.
- Vuilleumier, J.P. 1969. The 'Roche Yolk Colour Fan'—An Instrument for Measuring Yolk Colour. *Poult Sci* 48(3): 767–779. doi: 10.3382/ps.0480767.
- Wang, Z.P., R.F. Liu, A.R. Wang, J.Y. Li, and X.M. Deng. 2011. Expression and activity analysis reveal that heme oxygenase (decycling) 1 is associated with blue egg formation. *Poult. Sci.* 90(4): 836–841. doi: 10.3382/ps.2010-01143.
- Zahroojian, N., H. Moravej, and M. Shivazad. 2011. Comparison of marine algae (*Spirulina platensis*) and synthetic pigment in enhancing egg yolk colour of laying hens. *Br. Poult. Sci.* 52(5): 584–588. doi: 10.1080/00071668.2011.610779.
- Zahroojian, N., H. Moravej, and M. Shivazad. 2013. Effects of Dietary Marine Algae (*Spirulina platensis*) on Egg Quality and Production Performance of Laying Hens. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15: 1353–1360.