

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ROBERTA CONCEIÇÃO RIBEIRO VARANDAS

FORMULAÇÃO DE RAÇÃO PARA JUVENIS DE *Litopenaeus*
vanammei A PARTIR DE ESPÉCIES REGIONAIS DE
MICROALGAS

JOÃO PESSOA

2016

ROBERTA CONCEIÇÃO RIBEIRO VARANDAS

Formulação de ração para juvenis de *Litopenaeus vanammei* a
partir de espécies regionais de microalgas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Dr. João Andrade da Silva
Co-orientador: Dr^a. Marta Maria da Conceição

JOÃO PESSOA

2016

V288f Varandas, Roberta Conceição Ribeiro.
Formulação de ração para juvenis de *Litopenaeus vanammei* a partir de espécies regionais de microalgas /
Roberta Conceição Ribeiro Varandas.- João Pessoa, 2016.
73f. : il.
Orientador: João Andrade da Silva
Coorientadora: Marta Maria da Conceição
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT
1. Tecnologia de alimentos. 2. Camarão. 3. Microalgas -
sistema de cultivo. 4. Biomassa - microalgas - produção.
5. Carcinicultura brasileira.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

ROBERTA CONCEIÇÃO RIBEIRO VARANDAS

**FORMULAÇÃO DE RAÇÃO PARA JUVENIS DE *Litopenaeus*
vanammei A PARTIR DE ESPÉCIES REGIONAIS DE
MICROALGAS**

Dissertação aprovada em ____/____/____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Andrade da Silva- DTA/CTDR/UFPB
(Orientador)

Prof^ª. Dr^ª. Marta Maria da Conceição - DTA/CTDR/UFPB
(Co-Orientadora)

Prof. Dr. José Marcelino O. Cavaleiro - DTA/CTDR/UFPB
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Roberto Sassi – DSE/CCEN/UFPB
(Examinador Externo)

"Não tenho nada que me prove a existência de Deus,
Mas mesmo assim ele continua sendo
O absoluto dos meus dias.
Nunca choveu maná no quintal de minha casa
E a imagem que tenho da Virgem Maria
Nunca derramou uma lágrima.
O que tenho aqui é esta mão machucada,
Este dedo sangrando,
Este nó na garganta,
Este humano desconsolo,
Esta dor,
Esta cor,
E este olhar desconcertante de Deus,
Deixando-me sem jeito,
Ao dizer que me ama."

Fábio de Melo

*Dedico esta dissertação a Deus, por
sua presença constante, socorro presente
na hora da angústia, por seu amor
incondicional*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades.

A minha mãe e a minha irmã pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao Prof. Dr. João Andrade da Silva, por ter me orientado nesta etapa tão importante da minha vida, compartilhando seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Roberto Sassi por conceder a utilização do laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIMN/UFPB), por ceder as cepas das microalgas e os reagentes e principalmente pela sua confiança, atenção, paciência.

Ao prof. Dr. José Marcelino O. Cavaleiro pelas contribuições valiosas nas Bancas do Exame de Qualificação e Defesa.

A co-orientadora Dr^a. Marta Maria da Conceição pelo seu apoio, cuidado e paciência.

A secretária da Pós-Graduação Lindalva pela sua atenção.

Aos estudantes de Iniciação Científica Irinaldo Capitulino e Gabriela Moraes pelo apoio.

Aos meus colegas do LARBIM/UFPB, Nyelson, Patrícia, Patrícia Petrágia, Viviane, Evandro, Vilma, Katharina, Clediana pela compreensão, apoio nos momentos mais difíceis e pela torcida.

Ao meu amigo e colega Alerson Araújo bolsista de Iniciação Científica que participou diretamente deste trabalho e me apoiou em todos os momentos.

Ao CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao MCTi/FINEP (Processo: 2557-09) e ao “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq/Processo: 407519/2013-0) pelo suporte financeiro. À todos que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

(VARANDAS, R.C.R. 2016). **Formulação de ração para juvenis de *Litopenaeus vannamei* a partir de espécies regionais de microalgas.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

A carcinicultura é uma das atividades econômicas que mais cresce no Nordeste. A espécie de camarão mais cultivada é a *Litopenaeus vannamei*. O objetivo desta pesquisa foi selecionar cepas de microalgas com potencial para produzir ração para camarão juvenil *Litopenaeus vannamei*, bem como formular rações substituindo parcialmente a farinha de peixe pela biomassa dessas microalgas nas quais foram previamente selecionadas. Foram escolhidas oito espécies de microalgas proveniente do banco de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB): D9Z- *Spirulina plantensis*; D26Z-*Desmodesmus*; D29Z- *Chlorococum sp cf hypnosporum*; D39Z- *Planktothrix isothrix*; D115WC- *Scenedesmus acuminatus*; 133WC- *Lagerheimia longiseta*; D359WC- *Chlorella sp*; D61Z- *Kirchneriella lunaris*. O cultivo das microalgas foi realizado no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), em bancada. Foram utilizados os meios de cultivo WC e Zarrouk. O crescimento foi acompanhado por contagem celular e também pela fluorescência "in vivo". A biomassa foi concentrada em centrifuga, os concentrados congelados e liofilizados. Nas biomassas foram quantificadas: proteínas, carboidratos e lipídios totais. Na composição química das rações foram determinados os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, cálcio e fósforo. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$). Quatro rações experimentais foram elaboradas com 35% da proteína bruta sendo a farinha de peixe substituída por 40% da biomassa de três microalgas. Os maiores crescimentos foram registrados em *Desmodesmus sp.*, *S. platensis*, *Chlorococum sp cf hypnosporum*, *Planktothrix isothrix* e *Chlorella sp*, que apresentaram, respectivamente, os maiores valores de biomassa e número de células. A segunda, a terceira e a última foram selecionadas para a formulação das rações por apresentaram os maiores teores de proteína. As rações formuladas têm composição química semelhante à das rações comerciais. Os dados indicam que *Chlorella sp.*, *C. sp cf hypnosporum* e *S. platensis* podem ser utilizadas na substituição parcial da farinha de peixe em rações para camarão juvenis de *L. vannamei*.

Palavras-chave: camarão, microalgas, ração

ABSTRACT

(VARANDAS, R.C.R. 2016). **Ration Formulation for *Litopenaeus* juvenile *vannamei* from regional species of microalgae.** Dissertation (Master of Science in Food Technology), Federal University of Paraíba, João Pessoa.

The carcinicultura is one of the economic activities that will grow in the Northeast. The species most cultivated shrimp is *Litopenaeus vannamei*. The objective of this research was to select potential microalgae strains to produce feed for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*, and formulating rations partially replacing fishmeal by these microalgae biomass in which they were previously selected. They were chosen eight species of microalgae from the microalgae bank reef environments Laboratory and Biotechnology with Microalgae (LARBIM / UFPB): D9Z- *Spirulina plantesis*; D26Z-*Desmodesmus*; D29Z- *Chlorococum* sp cf *hypnosporum*; D39Z- *Planktothrix isothrix*; D115WC- *Scenedesmus acuminatus*; 133WC- *Lagerheimia longiseta*; D359WC- *Chlorella* sp; D61Z- *Kirchneriella lunaris*. The cultivation of microalgae was held in reef environments Laboratory and Biotechnology with Microalgae (LARBIMN / UFPB) bench. the culture media were used WC and Zarrouk. The growth was accompanied by cell count and also by fluorescence "in vivo". The biomass was concentrated in centrifuge, frozen concentrates and freeze-dried. In biomasses were quantified: proteins, carbohydrates and total fat. In the chemical composition of the diets were determined moisture, ash, protein, fat, calcium and phosphorus. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test ($P < 0,05$). Four experimental diets were prepared with 35% crude protein and fishmeal replaced by 40% of the biomass of microalgae three. The highest increases were registered in *Desmodesmus* sp., *S. platensis*, *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum*, *Planktothrix isothrix* and *Chlorella* sp, which presented, respectively, the higher biomass and cell number. The second and the third and last were selected for the formulation of rations had the highest protein content. The formulated feed rations have chemical composition similar to that of commercial pet food. The data indicate that *Chlorella* sp., *Sp cf C. hypnosporum* and *S. platensis* may be used in partial replacement of fishmeal in diets for juvenile shrimp *L. vannamei*.

Keywords: shrimp, microalgae, ration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tanques de cultivo de microalgas do tipo “raceway”	20
Figura 2- Lagoa circular para cultivo de microalgas.....	20
Figura 3- Exemplo de um fobioreator tubular utilizado em cultivos em massa de microalgas.....	21
Figura 4- Representação da taxa de crescimento de algas em cultura e a concentração de nutrientes em função de um período de tempo.....	24
Figura 5- Sala de cultivo do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB).....	37
Figura 6- Cultivo das microalgas usadas nos experimentos. Fase A- Balões de 250 ml; Fase B - Balões de 6 litros.....	39
Figura 7- Processo de centrifugação. A) Centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5C Plus); B) Tubos de 500mL.....	40
Figura 8- Processo de liofilização. A) Liofilizador Terroni (modelo LD1500); B) Bandeja de alumínio com a biomassa concentrada.....	40
Figura 9- Determinação de lipídios totais segundo o método de Folch et al.(1957), A) Separação das fases; B) Filtração das amostras.....	42
 ARTIGO	
Figura 1 - Curvas de crescimento obtidas para as oito espécies de microalgas pesquisadas. Valores médios das medidas da fluorescência in vivo de cada amostras.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das microalgas escolhidas para o presente estudo utilizadas nos ensaios de produção de biomassa e análises físico-químicas.....	32
Tabela 2- Ingredientes utilizados nas formulações das rações para camarões juvenis <i>Litopenaeus vanammei</i>	43

ARTIGO

Tabela 1- Relação das microalgas escolhidas para o presente estudo utilizadas nos ensaios de produção de biomassa e análises químicas.....	67
Tabela 2- Ingredientes utilizados nas formulações das rações para camarões juvenis <i>Litopenaeus vanammei</i>	68
Tabela 3 - Rendimento máximo celular (R_{max}) em rendimento biomassa (g/L) das microalgas pesquisadas.....	69
Tabela 4- Teores de proteínas, carboidratos e lipídios encontrados nas biomassas das microalgas cultivadas.	70
Tabela 5 - Composição química das rações comerciais e da ração elaborada tendo como base as microalgas.....	71

LISTA DE PRANCHA

Prancha 1- Fotografias das espécies de microalgas utilizadas na pesquisa.....	33
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Algumas aplicações biotecnológicas das microalgas.....	26
Quadro 2- Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).....	35
Quadro 3- Composição do meio WC.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC- Associação Brasileira de Criadores de Camarão

AOAC- Association of Official Analytical Chemists

ATP- adenosina trifosfato

CO₂- dióxido de carbono

D9Z- *Asthospira plantesis*

D26Z- *Desmodesmus sp.*

D29Z- *Chlorococum sp cf hyporosporum*

D39Z- *Planktrothrix isothrix*

D115WC- *Scenedesmus acuminatus*

D133WC- *Lagerheimia longiseta*

D359WC- *Chlorella sp*

D61Z- *Kirchneriella lunaris*

FAO – Food and Agriculture Organization

MPA- Ministério da Pesca e Aquicultura

NRC-National Research Council

pH- Potencial Hidrogeniônico

PHB- polihidroxibutírico

RC – Ração comercial

RS- Ração sem microalga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 MICROALGAS.....	18
3.2 SISTEMAS DE CULTIVO.....	19
3.3 MEIOS DE CULTIVO.....	21
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	22
3.5 CRESCIMENTO DAS MICROALGAS.....	23
3.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS.....	24
3.7 MICROALGAS UTILIZADAS NA AQUICULTURA.....	26
3.8 CARCINICULTURA BRASILEIRA.....	27
3.9 NECESSIDADES NUTRICIONAIS DO CAMARÃO <i>L. vannamei</i>	28
3.10 FARINHA DE PEIXE.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS.....	32
4.2 CULTIVO DAS MICROALGAS.....	34
4.2.1 Lavagem e esterilização.....	34
4.2.2 Meios de cultura.....	34
4.2.3 Condições de cultivo.....	36
4.2.4 Avaliação do crescimento dos cultivos de microalgas.....	37
4.2.5 Produção da biomassa das microalgas.....	37
4.2.6 Centrifugação ou filtração	39
4.2.7 Congelamento e liofilização.....	40
4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DAS BIOMASSAS.....	40
4.4 FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES.....	42
4.5 ANÁLISES QUÍMICAS DAS RAÇÕES.....	43
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5. REFERÊNCIAS.....	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1 Artigo.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor de produção de alimento que mais cresceu no mundo nos últimos trinta anos superando a pesca extrativa (ROCHA, 2016). No setor aquícola, a carcinicultura (cultivo de camarão em cativeiro) é uma das atividades que mais cresce no mundo nas últimas décadas. Os dez maiores países produtores mundiais concentram em média 92,3% da produção total de camarão cultivado. O Brasil é o nono, correspondendo a 1,5% do total produzido (ABCC, 2015; ROCHA, 2015).

O Brasil é um dos principais produtores de camarão das Américas, já que possui um clima favorável (FREITAS et al., 2008; TAHIM; ARAÚJO, 2014). Entre as espécies de camarão cultivadas, o *Litopenaeus vannamei* tem se destacado como a principal espécie na carcinicultura brasileira e a mais cultivada no mundo (ABCC, 2014; ROCHA, 2012).

O aumento da demanda por alimentos tem levado as fazendas aquícolas a produzirem cada vez mais rápido com produtividades mais elevadas. Ocorrendo assim a intensificação dos cultivos, levando ao aumento nas densidades de estocagem dos animais e a uma maior dependência por rações industrializadas (FAÇANHA et al., 2016).

Por causa do seu valor nutricional, a farinha de peixe é um dos principais ingredientes utilizados na formulação das rações para organismos aquáticos, no entanto a produção global de farinha de peixe já não atende a demanda (FURUYA; FURUYA, 2010; TACON; METIAN, 2009). É importante reduzir os custos de produção dos cultivos de camarão com a utilização de dietas com baixos níveis de farinha de peixe, substituindo a farinha de peixe por ingredientes alternativos de alta qualidade e com custos mais baixos. Algumas fontes proteicas alternativas já são utilizadas para substituírem a farinha de peixe, parcial ou totalmente, como os grãos de soja e subprodutos de indústrias avícola, bovina e pesqueira (HARDY, 2010). Segundo Gatlin et al. (2007), os ingredientes devem apresentar características nutricionais importantes que vão desde baixos teores de fibra e carboidratos, ausência de fatores antinutricionais, alto teor de proteínas, perfil de aminoácidos adequados, boa palatabilidade e alta digestibilidade.

As microalgas vêm sendo utilizadas em formulações para rações por conter principalmente proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e antioxidantes. Assim, as microalgas possuem características para suplementação natural na alimentação humana e animal, podendo substituir componentes sintéticos ou atender as crescentes demandas de tais ingredientes (YAAKOB et al., 2014).

Os sistemas de cultivo de microalgas possuem uma característica importante que é sua versatilidade, tornando possível relacionar aplicações diferentes no mesmo processo. Como muitas espécies têm valores nutritivos expressivos, a biomassa pode-se constituir um ingrediente da ração ou ração completa para animais. Podendo ser também comercializada como complementos para a alimentação humana. Além disso, determinadas microalgas produzem compostos de elevado valor para a indústria farmacêutica ou para a indústria de cosméticos. Da biomassa pode ainda ser extraído óleo vegetal para produção de biodiesel e outros biocombustíveis como biogás (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Considerando a quantidade de microalgas que ainda não foram investigadas e a quantidade de produtos metabólitos que elas possuem, este trabalho teve como objetivo selecionar cepas de microalgas com potencial para produzir ração para camarão juvenil da espécie *Litopenaeus vannamei*, bem como formular rações substituindo parcialmente a farinha de peixe por biomassa e microalgas considerando que elas poderiam ser um ingrediente alternativo para diminuir os altos custos com a farinha de peixe utilizada para produção de ração utilizada em cultivos de camarão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar cepas de microalgas com potencial para produzir insumo para formulação de ração para camarão juvenil *Litopenaeus vannamei*, e elaborar rações com a biomassa dessas microalgas visando substituir parcialmente a tradicional farinha de peixe.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar cultivos com oito espécies de microalgas para obtenção de biomassa;
- determinar a composição química da biomassa das microalgas cultivadas;
- selecionar as espécies com potencial para elaboração de ração para camarão;
- formular rações com a biomassa das microalgas em substituição parcial da farinha de peixe;
- determinar a composição química das rações formuladas;
- comparar a composição química da ração comercial com as rações formuladas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 MICROALGAS

As microalgas são organismos unicelulares, coloniais ou filamentosos que estão presentes principalmente nos ambientes aquáticos, podendo ser eucariontes ou procariontes (LEE, 2008). São algas microscópicas que possuem uma composição bioquímica diversificada, relacionada à natureza de cada espécie, aos fatores ambientais relacionados à região onde o cultivo está sendo realizado, às condições de cultivo e ao meio de cultura utilizado (ZANALLOA et al., 2011). O termo “microalgas” não possui valor taxonômico englobando microrganismos que possuem clorofila e outros pigmentos fotossintéticos que podem realizar a fotossíntese (HOEK, 1995).

Esses microrganismos são algumas das mais antigas formas de vida na terra, mas só recentemente foram reconhecidos como uma fonte muito promissora de biomassa. Elas produzem mais biomassa do que plantas terrestres por unidade de área, devido a uma maior eficiência fotossintética (LARDON et al., 2009). Têm a capacidade de produzir mais oxigênio do que todas as plantas do mundo (RODOLFI et al., 2009).

Desde a idade antiga os povos do Lago Texcoco (México), nativos do Lago Chade (África) e da Ásia já utilizavam as microalgas para a alimentação humana, como a *Spirulina* e outras microalgas voltadas principalmente para a suplementação proteica (DERNER et al., 2006; MENDONÇA; DRUZIAN; NUNES, 2012). Começaram a ser utilizadas comercialmente como alimento a partir de 1950 (AZEREDO, 2012). Em 1960 o seu uso teve início em escalas comerciais, com o gênero *Chlorella*, a partir de 1970 tem sido utilizadas na aquicultura e para outras aplicações biotecnológicas (SPOLAORE et al., 2006).

Em relação ao metabolismo as microalgas podem ser autotrófica, heterotrófica ou mixotrófica. A maioria é autotrófica e utiliza compostos inorgânicos (dióxido de carbono) como fonte de carbono. Estes microrganismos realizam fotossíntese, utilizam a energia solar como fonte de energia e o dióxido de carbono como fonte de carbono, formando a adenosina trifosfato (ATP) e oxigênio. As heterotróficas utilizam o carbono orgânico, sob a forma de glucose como fonte de

energia. Já as mixotróficas, utilizam fontes de carbono orgânico ou inorgânico e também realizam a fotossíntese (GHASEMI et al., 2012).

As microalgas são cultivadas em curto período tempo, necessitando de pequenas áreas para seu cultivo e de alguns cuidados como: reposição mineral, controle de pH, luminosidade e não se utilizam defensivos agrícolas no seu cultivo (BERTOLDI; SANT`ANNA ; OLIVEIRA, 2008). Vêm ganhando cada vez mais espaço dentro do panorama das pesquisas mundiais, já que são microrganismos capazes de produzir biomassa rica em vitaminas, proteínas, ácidos graxos insaturados, aminoácidos essenciais, dentre outros (CHU; RADHAKRISHNAN; LIM, 2010). Para suplementação alimentar humana e animal as principais espécies cultivadas são a *Chlorella sp.* e *Spirulina sp.*, bem como a *Haematococcus pluvialis*, utilizada na produção de astaxantina e a *Dunaliella salina* como fonte de caroteno (AZEREDO, 2012).

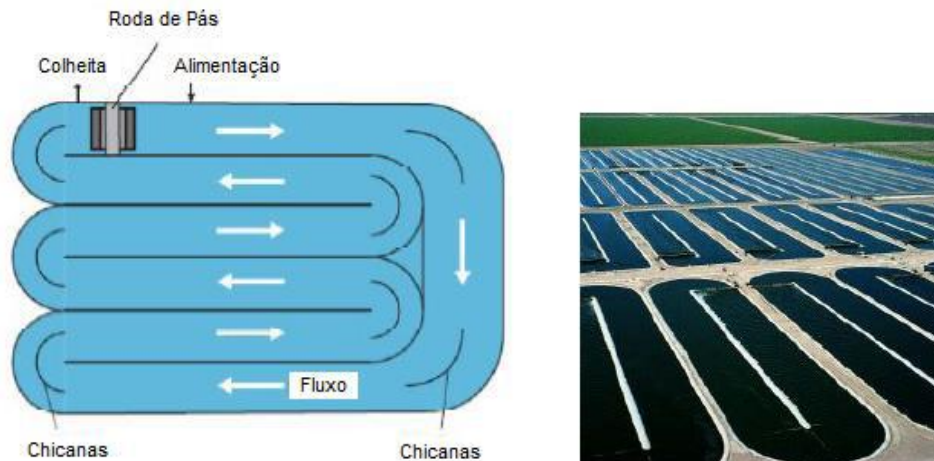
3.2 SISTEMAS DE CULTIVO

Os sistemas mais antigos de cultivo de microalgas são os abertos como lagoas, grandes tanques ou piscinas. Em geral esses sistemas são de fácil instalação, operação e baixo custo. Porém, pode ocorrer contaminação, evaporação acentuada, variação da temperatura, dentre outros (XU et al., 2009; ERIKSEN, 2008). Já os sistemas fechados, denominados de fotobiorreatores são menos susceptíveis à contaminação, apresentam maior produtividade de biomassa em relação aos sistemas abertos e melhor difusão dos gases, porém apresentam elevados custos de construção (JORQUERA et al., 2010; ERIKSEN, 2008).

Os sistemas abertos são os mais utilizados devido a sua fácil acessibilidade. São sistemas formados por lagoas rasas expostas ao sol ou em estufas, com dois formatos:

- tipo *raceway*: Normalmente utilizados nos cultivos comerciais, possuindo boa capacidade de mistura pois contêm pás circulares, bombas ou defletores para circulação de nutrientes, gases e da cultura algal, garantindo boas taxas de crescimento das microalgas, (Figura 1);

Figura 1- Tanques de cultivo de microalgas do tipo “raceway”.



Fonte: Coplin, (2012)

- Circulares: Muito utilizados e podem receber sistema de aeração (Figura 2) (RYAN, 2009).

Figura 2- Lagoa circular para cultivo de microalgas



Fonte: Borowitzka, (2005)

Um fotobioreator (Figura 3) é basicamente um bioreator que incorpora alguma fonte de luz podendo ser construídos de diferentes formatos, como por exemplo, tubular, em placa, cônico, em placas horizontais ou verticais, em coluna de bolhas, tanques com agitação e agitação pneumática (DASGUPTA et al., 2010). Entretanto, cada tipo de fotobioreator apresenta vantagens e desvantagens que precisam ser levadas em consideração no momento de sua construção e utilização.

O material utilizado na fabricação dos fotobioreatores é transparente à luz visível, possibilitando um melhor controle das condições de cultivo levando a uma maior produtividade de biomassa microalgal. Esse sistema propicia uma produção em larga escala já que diminui os riscos de contaminação e possibilita uma melhor utilização da luz, enriquecendo assim a produção da biomassa (FRANCO; LÔBO; CRUZ, 2013).

Figura 3- Exemplo de um fotobioreator tubular utilizado em cultivos em massa de microalgas.



Fonte: Coplin, (2012)

Em relação aos sistemas de cultivo de microalgas, pode-se constatar que, embora as microalgas realizem eficientemente a fotossíntese, o cultivo autotrófico em larga escala pode ser lento devido a limitação luminosa por causa da elevada densidade celular em cultivos ou a fotoinibição decorrente do excesso de luz, normalmente em sistemas abertos. Por causa disso, o crescimento heterotrófico de microalgas em fotobiorreatores fechados poderia ser considerado mais favorável (HUANG et al., 2010).

3.3 MEIOS DE CULTIVO

Nos cultivos de microalgas são utilizados diferentes tipos de meios de cultura. Estes meios variam dependendo da microalga que se quer cultivar e da finalidade dos cultivos. Os nutrientes que estão presentes nos meios de cultura podem

estimular ou inibir o crescimento dependendo da quantidade adicionada (PENTEADO, 2010).

As microalgas podem ser cultivadas em meios de cultivo marinho, salobra, e água doce. Os meios de cultivo são constituídos pelos macroelementos (carbono, oxigênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, nitrogênio, silicato, enxofre e potássio) e pelos microelementos (ferro, cobre, molibdênio, zinco, manganês). Os macronutrientes são essenciais já que constituem as estruturas das biomoléculas, de membranas e do meio intracelular. Os micronutrientes participam da atividade de enzimas, que participam das vias metabólicas e organelas celulares (LOURENÇO, 2006). As microalgas possuem métodos fisiológicos e bioquímicos para lidar com o stresse, sendo capazes de sintetizar uma variedade de substâncias químicas bioativas (CHU, 2012).

O uso de fertilizantes químicos, esgotos domésticos e resíduos de efluente agroindustrial podem ser utilizados como meio de cultura alternativo para o cultivo podendo reduzir os custos operacionais. Esses meios alternativos podem ser utilizados como fonte de nutrientes (DE JESUS; CASSINI; GONÇALVES, 2014).

3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Existem alguns fatores no cultivo que podem alterar o crescimento das microalgas como: luz, nutrientes, gases dissolvidos, pH, temperatura e agitação. Os níveis ótimos desses fatores variam conforme as diferentes espécies. Assim, esses fatores são interdependentes ou seja o ponto ótimo de um parâmetro em condições ambientais pode não ser o mesmo em outras (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

A produção de microalgas aumenta proporcionalmente de acordo com a temperatura ótima para cada espécie (PARK; CRAGGS; SHILTON, 2011). A temperatura deve ser próxima daquela do habitat natural. Por exemplo, uma espécie encontrada em ambientes polares pode apresentar dificuldades em cultivos realizados com temperaturas mais quentes. Normalmente se utiliza para diferentes espécies, uma temperatura de 25 °C (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Para os cultivos que são realizados em escala laboratorial, as salas de cultivos possuem temperaturas constantes, temperatura controlada por climatização, já para grandes sistemas é mais complexo manter a temperatura constante (LOURENÇO, 2006).

O pH da cultura é influenciado por vários fatores como: produtividade das algas, respiração, alcalinidade e composição iônica do meio de cultura, atividade microbiana e eficiência dos cultivos autotróficos e heterotróficos (PARK; CRAGGS e SHILTON, 2011). O pH pode alterar a disponibilidade de várias substâncias químicas, podendo levar a cristalização e precipitação dependendo do pH. O pH do meio deve estar próximo da neutralidade para que assim os componentes possam ser realmente absorvidos pelas microalgas (LOURENÇO, 2006).

A luz é um dos fatores mais importantes. Devendo ser fornecida na intensidade, duração e comprimento de onda adequada, pois podem influenciar no crescimento das microalgas. A luz excessiva pode provocar a foto-oxidação e foto-inibição, enquanto a luz insuficiente pode inibir o crescimento (GOUVEIA, 2011).

Quando os cultivos são realizados em escala laboratorial, estes são agitados pela aeração que é realizada pela injeção de ar por meio de mangueiras de silicone. Já nos cultivos em grande escala como nos tanques pequenos, em ambiente coberto, podem ser agitados por aeração com pás giratórias ou por bombeamento. Nos fotobioreatores tubulares, a mistura pode ser realizada por borbulhamento de ar ou bombas mecânicas (BRENNAN; WENDE, 2009).

3.5 CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

A curva de crescimento (Figura 4) pode ser identificada de acordo com as fases de crescimento:

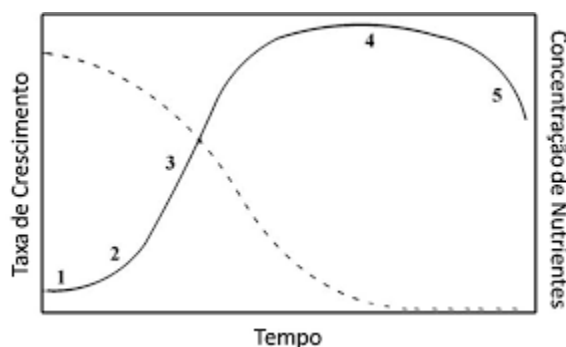
- 1- Fase de indução: acontece logo após a inoculação da célula, sendo um período de adaptação onde não existe incremento populacional, podendo ocorrer redução na densidade celular, ou ainda não acontecer ou ocorrer muito rapidamente;
- 2- Fase exponencial: é o crescimento logarítmico onde a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos de tempo regulares e a velocidade de crescimento chega ao seu ritmo máximo;
- 3- Fase de diminuição do crescimento relativo: ocorre a diminuição na taxa de crescimento celular, nesta fase a quantidade de nutrientes e a energia luminosa por célula já estão reduzidos, diminuindo assim a fotossíntese;

4- Fase estacionária: constância da densidade celular, a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade, ao ajustar a curva esta fase é representada graficamente por uma reta;

5- Fase de morte da cultura: O crescimento fica impossibilitado devido ao esgotamento dos nutrientes e ao autossombreamento, impossibilitando o crescimento (DERNER et al., 2006).

Há vários fatores que influenciam o crescimento de microalgas tais como os fatores abióticos, a luminosidade, temperatura, nutrientes, CO₂, pH, salinidade e substâncias químicas tóxicas. Os fatores bióticos tais como a existência de microrganismos patogênicos, a competição por outras microalgas, diluições mal efetuadas e a frequência de colheita (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Figura 4- Representação da taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada) em função de um período de tempo.



Fonte: Mata; Martins; Caetano, (2010)

3.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS

As microalgas têm grande importância nutricional, econômica e ecológica, devido a sua rica biodiversidade, taxa de crescimento, podendo ser utilizadas em uma ampla gama de aplicações biotecnológicas (CHU; RADHAKRISHNAN; LIM, 2010; COSTA et al., 2006). Podem ser utilizadas nas etapas de purificação de águas e também na remoção ou concentração de nutrientes de águas residuárias. Podendo também serem utilizadas em processos de biorremediação, uma vez que tem capacidade de acumular grandes quantidades de substâncias tóxicas (GARRIDO, 2008). São comumente utilizadas como suplemento na nutrição humana

podendo ser comercializadas em forma de comprimidos, cápsulas e líquidos (GOUVEIA et al., 2008). Também estão presentes no mercado de alimentos funcionais, em alguns produtos como: massas, pães, barras de chocolate, gomas, bebidas e iogurtes sendo comercializados em vários países do mundo (PULZ; GROSS, 2004). Podem ser ainda utilizadas na indústria de alimentos como: corantes, antioxidantes, emulsionantes, e gelificantes (WILLIAMS; LAURENS, 2010).

Muitas microalgas podem produzir óleos e isso gera grande interesse mundial tanto para obtenção de biocombustível como para produção de óleo comestível. Muitos desses microrganismos produzem até 100 vezes mais óleo por unidade de área comparando com plantas oleaginosas comumente utilizadas como soja ou palma e também apresentam alta taxa de crescimento (CHISTI, 2007; LARDON et al., 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Por possuírem valores nutritivos atraentes as microalgas também podem ser usadas como insumo para ração ou ração completa para animais, podendo ser utilizadas também na aquicultura, melhorando a água de cultivo, pela absorção de substâncias nitrogenadas tóxicas (amônia e nitrito) (BORGES et al., 2007). Também produzem compostos de elevado valor para a indústria farmacêutica e para a indústria de cosméticos (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Quadro 1- Algumas aplicações biotecnológicas das microalgas

Produto		Aplicações
Biomassa	Biomassa	Suplementos alimentares, aditivos para alimentos, aquicultura, condicionamento de solos.
Corantes e antioxidantes naturais	Xantofilas, luteína, betacaroteno, vitaminas C e E	Alimentos, suplementos alimentares e cosméticos
Ácidos graxos	Ácido araquidônico, ácido eicosapentaenoico, ácido linoleico	Aditivos alimentares
Enzimas	Luciferases, Fosfoglicerato, cinase (PGK)	Pesquisas médicas, alimentos
Polímeros	Polissacarídeos, amido, ácido polihidroxibutírico (PHB)	Aditivos alimentares, cosméticos e medicina
Outros produtos	Peptídeos, toxinas, isótopos, aminoácidos	Pesquisas na área médica e desenvolvimento de fármacos

Fonte: De Jesus et al., (2013)

3.7 MICROALGAS UTILIZADAS NA AQUICULTURA

Estima-se que cerca de 30% da produção de algas no mundo é vendida para aplicação em alimentação animal (BECKER, 2007). As microalgas são geralmente utilizadas na aquicultura constituindo-se uma prática secular (LOURENÇO, 2006). Representam a primeira base nutricional na cadeia alimentar aquática, devido à sua capacidade de sintetizar moléculas orgânicas que usam a luz solar e dióxido de carbono (FUENTES-GRÜNEWALD et al., 2012). Assim, o cultivo de microalgas tem sido fundamental para a produção de espécies comercialmente importantes na aquicultura (DAVID et al., 2015).

As microalgas possuem alto teor de fibras solúveis e ácidos graxos ômega-3 auxiliando positivamente na alimentação de organismos aquáticos (AZAZA et al., 2007). Normalmente o perfil de aminoácidos de quase todas as microalgas é comparado favoravelmente com a de outras proteínas de alimentos (SPOLARE et al., 2006).

No Brasil, espécies dos gêneros *Thalassiosira*, *Skeletonema*, *Chaetoceros* (diatomáceas), *Dunaliella* e *Nannochloropsis* estão entre as mais utilizadas na aquicultura marinha. As espécies mais utilizadas em água doce pertencem aos gêneros *Chlorella*, *Pseudokirchmeriella*, *Hematococcus* e *Cryptomonas* (LOURENÇO, 2006).

3.8 CARCINICULTURA BRASILEIRA

Os países asiáticos são os maiores produtores de camarão cultivado, correspondendo pelas maiores transações financeiras do mercado mundial do pescado. O camarão se transformou no produto aquícola mais valorizado, cujo comércio cresce cada vez mais. O maior produtor mundial de camarão é a China (1.238.236 t de camarão extrativo e 1.863.598 t de cultivo = um total de 3.101.834 t) e também se destacou como importante importador de camarão em 2014 (ROCHA, 2016).

Na carcinicultura ocorre a predominância de duas espécies cultiváveis, o camarão branco (*L. vannamei*) originário do Pacífico e o camarão tigre negro (*P. monodon*) cultivado na Ásia (SCOPEL, 2015). Em toda história da carcinicultura o cultivo do *L. vannamei* cresceu como nenhuma outra espécie (ROCHA, 2016). O camarão *L. vannamei*, originado do Oceano Pacífico em águas oligohalinas possui uma capacidade de adaptar-se às diferentes condições das áreas costeiras tropicais e semitropicais dos Continentes, surgiu e permanece sendo a primeira que se adaptou voltado para produção comercial (ROCHA, 2015).

Na Região Nordeste do Brasil, o cultivo do camarão marinho *L. vannamei*, está em constante evolução e já possui tecnologia que está difundida em vários Estados, inclusive apresentando meios técnicos e econômicos sólidos para garantir que essa atividade é viável para a geração de renda, empregos e negócios nos mais longínquos lugares do semiárido brasileiro (ROCHA, 2015). Os cultivos da região

Nordeste, são os principais responsáveis pelo bom desempenho da carcinicultura no país. Os estados do Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe e Pernambuco, são os mais expressivos pela quantidade de empreendimentos em vasta produção, pertencendo a micro e pequenos produtores na sua grande maioria e com rios, poços e açudes utilizados como fontes de extração de águas oligohalinas para o cultivo (ABCC, 2015).

A carcinicultura tem relevância no comércio internacional quando se considera seu destaque significativo no contexto da sócio economia pesqueira global. Os Estados Unidos é o maior importador de camarões do mundo seguido pelo Japão, Espanha e França (ROCHA, 2015).

3.9 NECESSIDADES NUTRICIONAIS DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

O camarão *Litopenaeus vannamei*, conhecido como camarão branco do pacífico, ou camarão cinza é uma espécie exótica, onívora, com hábito alimentar detritívoro, alimenta-se de qualquer tipo de matéria orgânica disponível (COSTA; SAMPAIO, 2004). Na década de 90, já estava sendo criado com sucesso no Equador e no Panamá, acabou influenciando a decisão na escolha da espécie a ser criada no Brasil. Esse camarão é nativo da costa sul-americana do Pacífico, de fácil adaptabilidade às condições climáticas brasileiras, devido à sua rusticidade, rápido crescimento e ampla faixa de tolerância à salinidade (ROCHA, 2005; XU et al., 2012; ZHOU et al., 2012). Sendo o camarão mais procurado com grande demanda compradora. A necessidade alimentar nos cultivos em confinamento é provida pelo uso de ração peletizada (COSTA et al., 2006).

A energia é extremamente importante para a manutenção dos processos fisiológicos dos animais (PORTZ; FURUYA, 2012). Os peixes e crustáceos utilizam a proteína como principal fonte de energia. Isso ocorre devido a cadeia alimentar aquática geralmente apresentar deficiência de carboidratos e excesso de lipídios e proteínas, levando a utilização destes nutrientes como fonte de energia (CUZON et al., 2004).

No cultivo de camarão marinho o suplemento de proteína é um dos mais importantes componentes da dieta dos animais. Já que é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento, representando um dos custos primários para

a formulação da ração (VENERO DAVIS; ROUSE, 2007). As necessidades proteicas variam entre as espécies de camarão, estando entre 30% - 60% (CANDIDO et al., 2005). Uma fonte de proteínas efetiva deve satisfazer as exigências em aminoácidos essenciais e não essenciais, podendo ser sintetizados pelos indivíduos a partir de carboidratos, lipídios ou outro tipo de composto nitrogenado (GLENCROSS, 2006). Os lipídios enriquecidos com ácidos graxos também são importantes para o metabolismo e energia do camarão e para a alimentação de juvenis de *L. vannamei* (GONG et al., 2000). Pesquisas sobre a utilização de carboidratos em dietas para camarões marinhos mostraram que estes utilizam carboidratos complexos (amido de trigo) para crescimento com mais eficiência do que açúcares simples, especialmente a glicose (ROCHA, 2015).

3.10 FARINHA DE PEIXE

A alimentação constitui um dos principais aspectos a ser considerado em cultivo de qualquer espécie aquática (BROWDY et al. 2006). No Brasil, o principal alimento do camarão é a ração comercial (WALDIGE; CASEIRO, 2004). A ração é fonte de proteínas, lipídios, carboidratos e normalmente é suplementada com vitaminas e minerais (SOUZA-SOARES, 2005).

O sucesso na aquicultura é baseado em vários critérios, em que a seleção de um alimento adequado e seu uso potencial é importante (VELU; MUNUSWAMY, 2007). A farinha de peixe é um desses ingredientes e foi escolhida como um alimento para a aquicultura por ter um alto teor de proteínas, vitaminas, minerais, excelente perfil de aminoácidos, alta digestibilidade e, normalmente não possuir fatores antinutricionais (GATLIN et al., 2007; SOOKYING; DAVIS; SILVA, 2013). É produzida a partir de peixes pelágicos (e.g., anchoveta, savelha, arenque, pescada branca) sendo um dos ingredientes mais utilizados na elaboração de rações para alimentação de organismos aquáticos (NRC, 2011).

A aquicultura acabou se tornando dependente da farinha de peixe devido aos seus valores nutricionais atraentes. Tacon e Metian (2009) estimaram que as rações aquáticas utilizaram 68,2% de toda produção mundial de farinha de peixe. Correspondendo a 3,724 milhões de ton. de farinha de peixe, sendo necessária a captura de 16,6 milhões de toneladas de peixes pelágicos forrageiros. O uso de

grandes quantidades de farinha de peixe na alimentação de peixes e crustáceos tem levantado questionamentos em relação aos efeitos ambientais e sociais que esta prática pode gerar. A oferta limitada e a crescente demanda ajudam a elevar ainda mais o seu preço (JACKSON; ALDON, 2013). Os preços altos podem levar a exploração ainda maior da matéria prima para a fabricação de farinha de peixe em locais onde as pescarias não são fiscalizadas ou onde os pescadores possuem um baixo nível socioeconômico (NAYLOR et al., 2009).

Com a intensificação dos sistemas de cultivo e a rápida expansão da carcinicultura, há uma demanda cada vez maior por dietas nutricionalmente balanceadas e com custo acessível, justificando as pesquisas que visem reduzir o custo da ração, com o melhor aproveitamento das fontes proteicas (LEMOS; LAWRENCE; SICCARDI, 2009). Ao escolher um ingrediente de origem vegetal para produção de rações para camarão marinho, este necessita ter baixos teores de fibra, amido e antinutrientes (SOOKYING; DAVIS; SILVA, 2013).

O desenvolvimento da aquicultura depende do surgimento de fontes sustentáveis de proteína para poder substituir a farinha de peixe. Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à produção de dietas para aquicultura com ingredientes alternativos para substituir a farinha de peixe (ZHU et al., 2013). No mercado existem outros produtos de origem animal, como a farinha de vísceras de aves e de carne e ossos, mas a demanda também é grande por estes produtos e a disponibilidade pequena, sendo assim se faz necessário à procura de fontes proteicas vegetais (HARDY, 2010). Alguns pesquisadores têm explorado o uso de plantas como alternativa para a substituição da farinha de peixe em cultivos de camarão (AMAYA; DAVIS; ROUSE, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

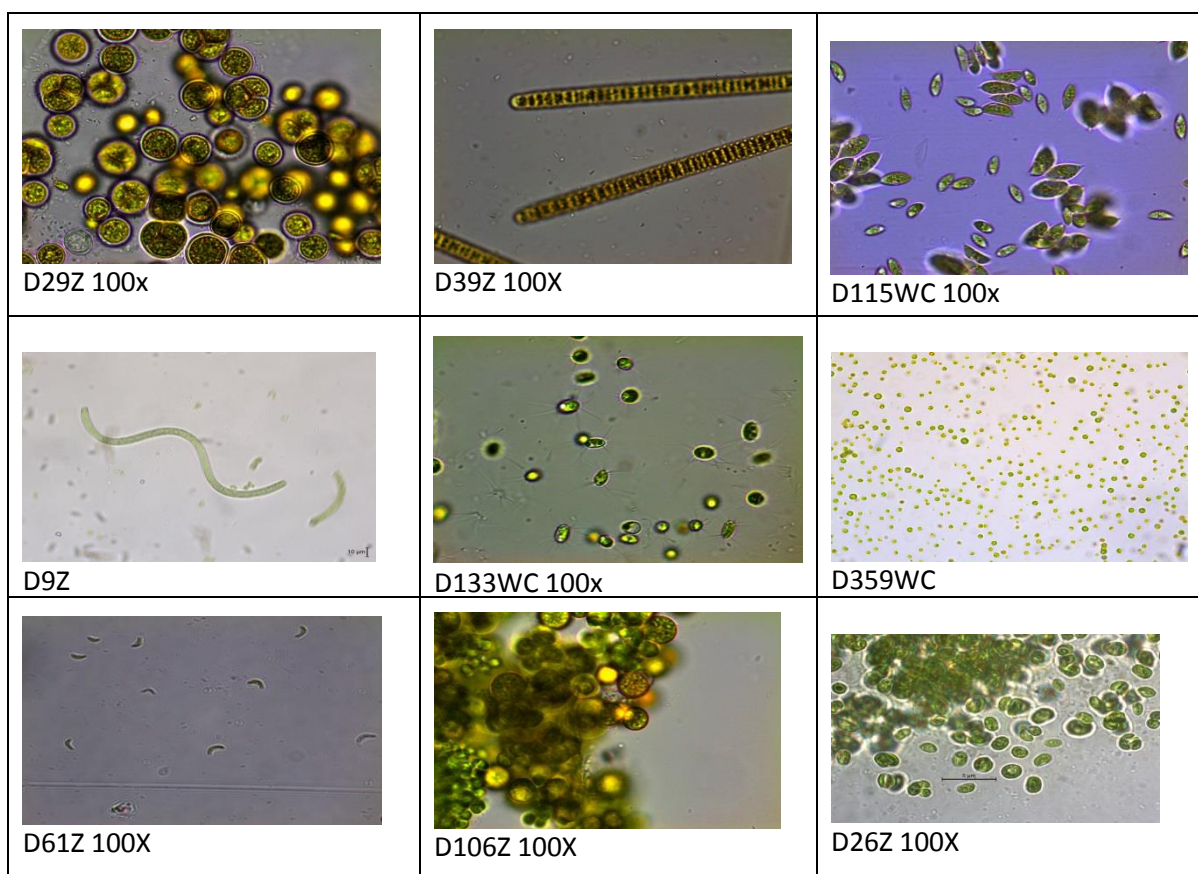
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

Este trabalho foi desenvolvido com sete espécies regionais de microalgas do banco de cultura Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), isoladas de distintos ambientes dulcícolas da região Nordeste do Brasil (Tabela 1), e com *Spirulina platensis*, uma espécie de amplo uso na alimentação humana e de animais (HABIB et al., 2008). A escolha dessas espécies regionais baseou-se no fato de que a maioria delas apresentam teores de ácidos graxos superiores aos da soja segundo autores prévios e pelo fato de que uma das espécies (*Planktothryx isothryx*, cepa D39Z), apresenta cerca de 18,1% de ácido γ -linolênico (c18:3 c6,9,12), sendo, portanto, uma potencial fonte de ácidos graxos essenciais. Todas as espécies foram fotografadas em microscópio LEICA DM 2500 e suas imagens estão na Prancha 1.

Tabela 1- Relação das microalgas escolhidas para o presente estudo utilizadas nos ensaios de produção de biomassa e análises químicas.

Código	Espécie	Procedência
D9Z	<i>Spirulina platensis</i>	Univ. Federal Fluminense, RJ, cepa cedida pelo Dr. Sérgio Lourenço.
D26Z	<i>Desmodesmus</i> sp.	Açude do Cais, Cuité, PB
D29Z	<i>Chlorococcum</i> sp cf <i>hypnosporum</i>	Açude do Cais, Cuité, PB
D39Z	<i>Planktothryx isothrix</i>	Açude de Acauã, Natuba, PB
D61Z	<i>Kirchneriella lunares</i>	
D115WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Bebedouro das Ovelhas, Frei Martinho, PB
D133WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Açude Malhada Limpa, RN
D359WC	<i>Chlorella</i> sp.	Filtro de água potável residencial, João Pessoa, PB

Prancha 1- Fotografias das espécies de microalgas utilizadas na pesquisa



As rações comerciais e os outros produtos utilizados na formulação das rações como a farinha de peixe, farelo de soja, fécula de mandioca, farinha de milho, óleo de peixe e premix vitamínico foram adquiridas no comércio local da cidade de João Pessoa.

Já a farinha de sangue foi obtida pelo método descrito por Cavalheiro (1993). Usando o sangue de aves obtido no comércio local de João Pessoa, sendo o mesmo coagulado e pré- cozido. Os coágulos de sangue foram cortados, triturados em liquidificador doméstico e secos em estufa a 65 °C, por 72 horas. Depois foram moídos em multiprocessador doméstico.

A farinha de sabugo de milho foi obtida pelo método descrito por Souza (2002). Os sabugos adquiridos no comércio local foram cortados em pedaços pequenos (aproximadamente 3 cm de comprimento) e submetidos à secagem em estufa a 65 °C por 60 horas. Depois, foi triturado em liquidificador doméstico e

pesado. Visto que este alimento possui um alto teor de fibras sendo indispensável na dieta do camarão.

4.2 CULTIVO DAS MICROALGAS

4.2.1 Lavagem e esterilização

A lavagem do material utilizado foi realizada de acordo com a rotina do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB). A lavagem da vidraria foi realizada com detergente neutro, carbonato de sódio (Na_2CO_3) e ácido clorídrico (HCL) diluído, com enxágues sucessivos em água corrente, após adição de cada um desses componentes e por último enxaguou-se com água destilada. O material foi seco em estufa à 40 °C, e depois foi esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 minutos. A água destilada utilizada para preparação dos meios de cultura também foi esterilizada em autoclave a 121 °C, por 30 minutos.

4.2.2 Meios de cultura

Foi utilizado o meio de cultura Zarrouk (1966) (Quadro 2) e o meio de cultura WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) (Quadro 3) de acordo com as espécies de microalgas cultivadas.

Quadro 2- Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966)

Soluções estoque	Quantidades
1-Nitrato de Potássio (KNO_3)	15,0 g em 200 ml
2-Cloreto de Sódio (NaCl)	33,0 g em 200 ml
3-Sulfato de Magnésio 7-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,5 g em 200 ml
4-Fosfato de Potássio (K_2HPO_4)	1,5 g em 200 ml
5-Cloreto de Cálcio 2-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,58 g em 200 ml
6-Solução dissódica (Na_2EDTA)	6,4 g em 100 ml
7-Sulfato Ferroso 7-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g em 100 ml
8-Ácido Bórico (H_3BO_3)	1,14 g em 100 ml
9-Solução mista	
Solução mista Dissolver os 5 sais abaixo g) em 100 ml, preparando uma única solução	Quantidades
Nitrato Cobaltoso 6-hidratado [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0,049
Cloreto de Manganês 4-hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,144
Sulfato de Zinco 7-hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,882
Sulfato de Cobre 5-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,0157
Oxido de Molibdênio (MoO_3)	0,071
Preparação de 1 L de meio de cultura:	
1. Dissolver em 600 ml de água 15,0 g de NaHCO_3 2. Na solução anterior, dissolver 2 g de Na_2CO_3 3. Acrescentar 10 ml das soluções 1,2,3,4 e 5 4. Acrescentar 1,0 ml das soluções 6,7,8 e 9 5. Completar o volume a 1.000 ml e autoclavar	

Quadro 3- Composição do meio WC

Solução estoque	Fórmula	Quantidade
Cloreto de cálcio 2.H2O	CaCl2. 2H2O	36.8 g
Sulfato de magnésio 7.H2O	MgSO4. 7H2O	37 g
Bicarbonato de sódio	NaHCO3	12.6 g
Fosfato de potássio 3.H2O	K2HPO4.3H2O	11.4 g
Nitrato de sódio	NaNO3	85 g
Água destilada		1 L
Solução de silicato	Fórmula	Quantidade
Metasilicato de sódio 9.H2O	Na2SiO3.9H2O	21.2 g
Água destilada		1 L
Solução de micronutrients	Fórmula	Quantidade
Sal dissódico	Na2EDTA	4.36 g
Cloreto férrico 6.H2O	FeCl3. 6H2O	3.15 g
Sulfato de cobre 5.H2O	CuSO4. 5H2O	0.01 g
Sulfato de zinco 7.H2O	ZnSO4.7H2O	0.022 g
Cloreto de cobalto 6.H2O	CoCl2. 6H2O	0.01 g
Cloreto de manganês 4.H2O	MnCl2. 4H2O	0.18 g
Molibdato de sódio 2.H2O	Na2MoO4.2H2O	0.006 g
Ácido bórico	H3BO3	1 g
Água destilada		1 L
Solução de vitaminas	Quantidade	
Tiamina HCl	0.1	
Biotina	0.0005	
Água destilada	1 L	
Composição do meio	Quantidade	
Solução estoque, Solução de silicato, Solução de micronutrientes e Solução de vitaminas: usar 1mL a cada litro de meio.		
Tri(hidroximetil)-amino metano	0.115 g a cada litro de meio	

4.2.3 Condições de cultivo

Os cultivos das microalgas foram realizados em bancada, numa sala de cultura climatizada, com temperatura mantida em 25±1°C, dotada de sistema de iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, e fotoperíodo de 12 horas, com aeração contínua de ar atmosférico (2mL.min⁻¹), usando um mini compressor de membrana.

Figura 5- Sala de cultivo do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB)



Fonte: própria

4.2.4 Avaliação do crescimento dos cultivos

O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por contagem celular em microscópio binocular e por análises da fluorescência “in vivo” das amostras num Fluorômetro Turner Design. Os experimentos foram interrompidos na fase estacionária. Ao final dos cultivos foram determinadas a taxa máxima de crescimento da população (R_{max}), que corresponde ao numero máximo de células registrado ao final de cada experimento descontando-se o valor da densidade celular dos inóculos, e rendimento máximo em biomassa ($g.L^{-1}$), após liofilização.

4.2.5 Produção da biomassa

Os cultivos seguiram o Fluxograma e foram realizados em bancada, onde inicialmente, a espécie selecionada foi inoculada em frascos de 250 mL, contendo 100mL de meio de cultura sem aeração. Após uma semana aproximadamente, os cultivos foram inoculados em um balão de fundo chato de 6 litros contendo 5 litros do meio. Foram realizados sucessivamente para cada microalga escolhida até se ter obtido a quantidade necessária de biomassa para realização das análises e da formulação das rações.

Fluxograma 1- Fluxograma do preparo do cultivo

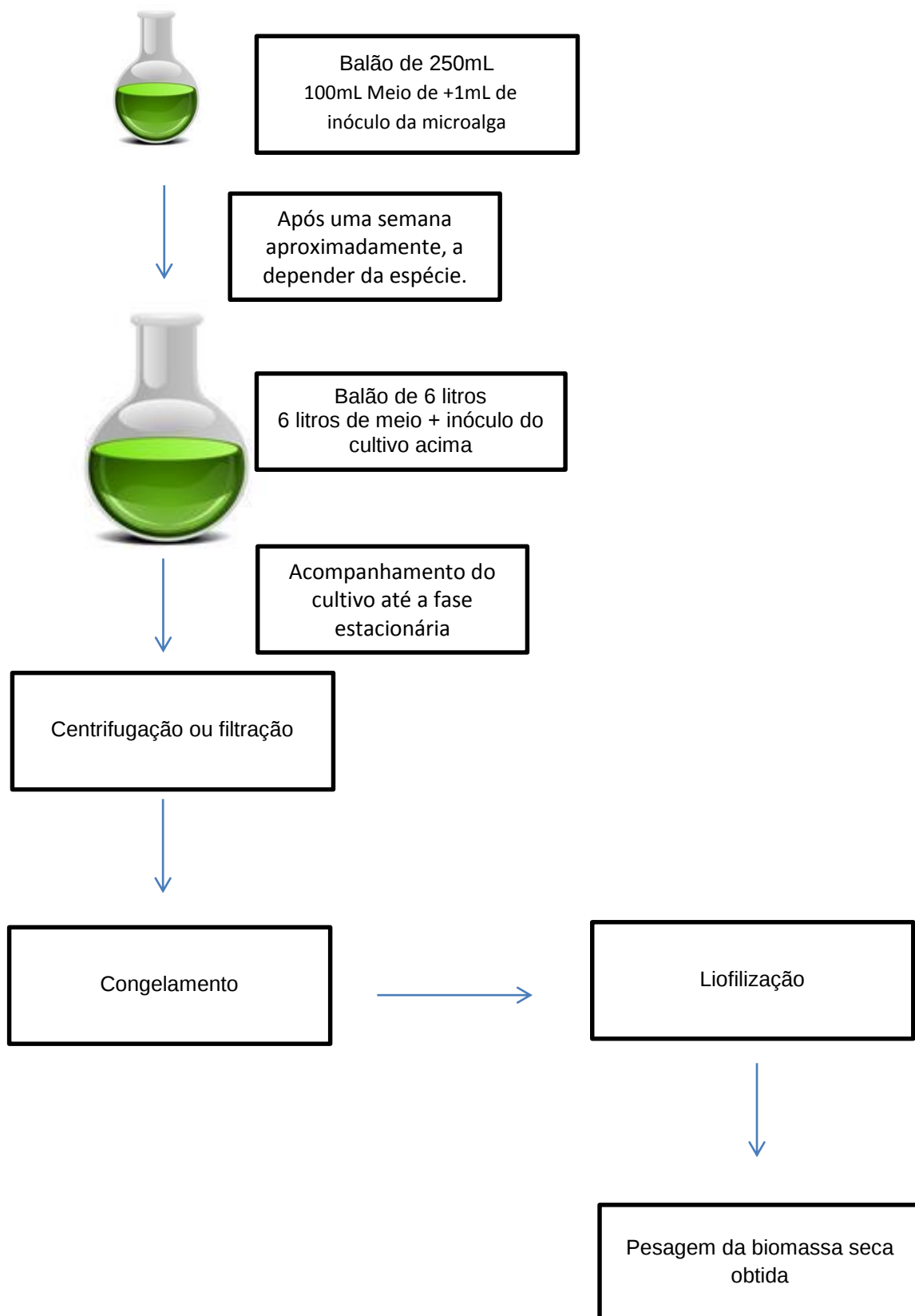


Figura 6- Cultivo das microalgas usadas nos experimentos. Fase A- Balões de 250 ml; Fase B - Balões de 6 litros.



Fonte: própria

4.2.6 Centrifugação ou filtração

A espécie *Spirulina platensis* (D9Z) foi filtrada quando os seus cultivos entraram na fase estacionária, utilizando tela de nylon com abertura de malhas de 20 μm . Adotou-se esta técnica visando a filtração convencional que é mais apropriada para colheita de microalgas relativamente grandes (dimensões superiores a 70 μm) como para os gêneros *Coelastrum* e *Spirulina* (MORCELLI, 2011).

As outras microalgas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (18°C) (Nova Técnica-NT825) (Figura 7A), com capacidade para centrifugação de 4 tubos simultâneos de 500 mL (Figura 7B) . O processo de centrifugação foi realizado a 4500 rpm, com duração variável dependendo da espécie. Após a centrifugação a camada superior ou sobrenadante foi descartada e a biomassa algal foi retirada com auxílio de uma pipeta e acondicionada em bandejas de alumínio previamente envolvidas com plástico filme e congelada a -30 °C.

Figura 7- Processo de centrifugação. A) Centrífuga refrigerada (Nova Técnica-NT825); B) Tubos de 500 mL



Fonte: própria

4.2.7 Congelamento e liofilização

As bandejas de alumínio com a biomassa concentrada (Figura 8B) foram acondicionadas em ultrafreezer (-30 °C). A liofilização foi realizada em um liofilizador Terroni (modelo LD1500) (Figura 8A).

Figura 8- Processo de liofilização. A) Liofilizador Terroni (modelo LD1500); B) Bandeja de alumínio com a biomassa concentrada.



A liofilização é considerada um ótimo processo de conservação de biomassa a seco, pois neste processo toda a água é retirada das amostras em temperaturas muito baixas, - 48 °C (LOURENÇO, 2006).

4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DA BIOMASSA

Todas as análises químicas das biomassas foram realizadas em triplicatas.

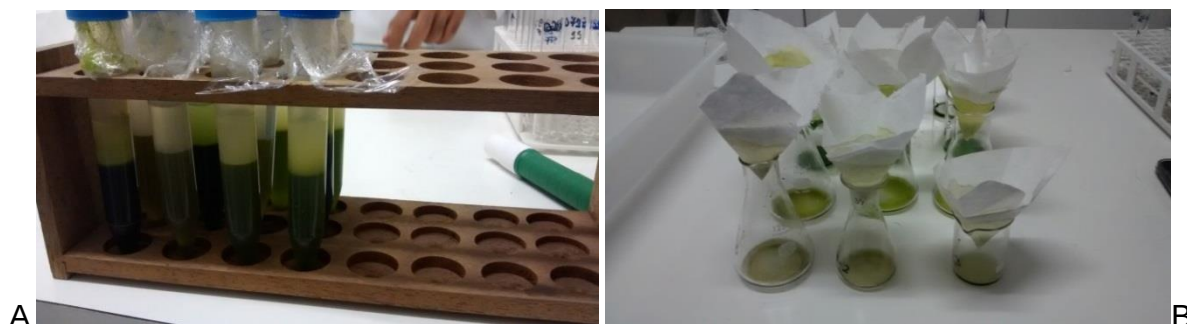
Proteínas totais: Determinados pelo método de Kjeldahl. Colocou-se dentro de tubos de Kjeldahl 0,1 g da amostra e 0,5 g de uma mistura catalítica. Acrescentou-se 5 ml de ácido sulfúrico PA e realizou-se uma pré-digestão a frio. Aqueceu-se a placa digestora gradualmente até alcançar 350 °C e as amostras foram digeridas até que a solução alcançassem uma coloração “verde piscina”. Após digeridas, os tubos foram retirados do digestor e resfriados. Transferiu-se o conteúdo de cada tubo para um balão volumétrico de 100 mL com primeiramente 30 mL de água destilada. Do balão de 100 mL (extrato 1), retirou-se 1 mL e o transferiu para um balão volumétrico de 50 mL (com ± 20 mL), depois de resfriada, adicionou-se 1 mL de Hidróxido de sódio 10%, 1 mL de silicato de sódio 20% e 2 mL de Reagente de Nessler. Completou-se o volume do balão, este foi deixado em repouso durante 30 minutos e as amostras foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 420nm (SANTOS, 2007). Utilizou-se para calcular o teor de proteínas totais (%) a curva padrão e o valor foi multiplicado por 6,25 para a *Spirulina* e de 5,95 para as demais microalgas (LÓPEZ et al., 2010).

Carboidratos totais: Determinados pelo método adaptado de Kochert (1978). Para tal, utilizou-se 0,01 g de cada amostra. Adicionou-se 4,0 mL de NaOH 1,0N, e aqueceu-se a amostra em banho-maria por 1h a 100 ± 10 °C. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada a 3000rpm por 10min. Retirou-se 0,5 mL do extrato alcalino (sobrenadante) e adicionou-se 1,0 mL de NaOH 1,0N mais 0,5 mL de fenol 4,0% e agitou-se em vortex. Após 30 minutos em repouso, acrescentou-se 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e agitou-se em vortex. Deixou-se as amostras esfriarem e, por fim, estas foram lidas em espectrofotômetro a 485nm.

Lipídios totais: Determinados pelo método de Folch, Less e Stanley (1957). Para tal, 50 mg das biomassas, foram tratadas em homogeneizador turrax em velocidade média durante 5 minutos, com 10 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1). As amostras foram centrifugadas em 4000 rpm por 8 minutos e em seguida retirou-se o sobrenadante. Adicionou-se uma solução de KCl a 0,88%, correspondente a $\frac{1}{4}$ do volume do sobrenadante. O sistema foi agitado manualmente e após 10 minutos

de repouso formaram-se duas fases muito nítidas: a superior com água, metanol e outros compostos, e a inferior com os lipídios dissolvidos (Figura 9A). A fase superior foi removida e à solução de lipídios foi adicionada determinada mistura de metanol:água (1:1), correspondente a $\frac{1}{4}$ do volume da solução. O sistema foi mantido em repouso e a separação e remoção da fase superior foi feita por aspiração. A fase inferior foi filtrada, em papel filtro, preenchidos com Na_2SO_4 em funis de 60 mm de diâmetro e a amostra filtrada em balões de vidro (Figura 9B), em seguida, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada à 40 °C. As amostras secas no interior dos balões foram solubilizadas com 5 mL de clorofórmio. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi tomada em frascos de vidros pré-pesados em balança analítica para determinação dos lipídios totais por gravimetria após a evaporação total do solvente em estufa.

Figura 9- Determinação de lipídios totais segundo o método de Folch et al. (1957), A) Separação das fases; B) Filtração das amostras.



Fonte: própria

4.4 FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES

Foram formuladas quatro rações experimentais (Tabela 2) para fase juvenil do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, com 35% da proteína bruta, sendo a farinha de peixe substituída por: a) 40% da biomassa de *Spirulina platensis*, b) 40% de biomassa de duas espécies de microalgas regionais cultivadas, selecionadas dentre as que apresentaram os maiores teores de proteínas nas condições de cultivo efetuadas, e c) uma ração sem microalga, com 100% de farinha de peixe. Todos os preparados foram comparados com duas rações comerciais de camarão.

A formulação das rações experimentais foi efetuada com o software CRAC versão 4.0. Utilizando como base a formulação da ração experimental para camarão juvenil *Litopenaeus vanammei* da pesquisa de Gadelha (2013). As rações foram elaboradas misturando todos os ingredientes utilizados, exceto o premix e o óleo numa bateadeira convencional. A massa foi umedecida com água a 70°C e introduzida em um moedor de carnes, formando pellets com 2 mm de diâmetro, que foram secos em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 12 horas e armazenados em sacos de papel.

Tabela 2- Ingredientes utilizados nas formulações das rações para camarões juvenis *Litopenaeus vanammei*

Ingredientes (%)	Spirulina plantensis	<i>Chlorococcum</i> <i>sp cf</i>	Chlorella sp.	RS*	
Biomassa	12	12	12	-	
Farinha de peixe	18	18	18	30	
Fécula de mandioca	3	3	3	3	
Farinha de milho	25	25	25	25	
Sabugo de milho	4	5	4	4	
Óleo de soja	1,5	2	2	1,5	
Farinha de soja	22	23,5	23	22	
Farinha de sangue	13	10	11,5	13	
Premix	1	1	1	1	
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5	
Propostas de Composição química (%)	Spirulina plantensis	<i>Chlorococcum</i> <i>sp cf</i>	Chlorella sp	RS	RC**
Proteína bruta	35	35,8	35,6	36	35
Lipídios	9,8	8,9	7,4	7	8,9
Umidade	10,5	11,1	11	11,8	13
Cinzas	7,7	7	9,2	8	12

*Ração sem microalga ** Ração comercial

Farinha de peixe (PB:50 EE: 8,7 UM: 11,0 CZ: 18,2) Farinha de milho (PB: 8,5 EE: 10,0 UM: 9,5 CZ: 2,5) Farinha de sangue (PB: 80,0EE: 0,25 UM: 3,5 CZ: 2,7); Farinha de soja (PB: 33,4 EE: 1,3UM: 11,0 CZ: 3,5) Fécula de mandioca (PB: 0,45 EE: 0,55 UM: 10,5 CZ: 1,45) Sabugo de milho (PB: 3,5 EE: 1,7 UM:13,2 CZ: 2,0).

4.5 ANÁLISES QUÍMICAS DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS

Os teores de umidade, cinzas e proteínas foram determinados em triplicata utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005). O extrato etéreo foi realizado seguindo os procedimentos de Folch, Less e Stanley (1957). O teor de cálcio foi determinado por titulometria com EDTA, segundo (AOAC, 2005).

O teor de fósforo foi determinado pelo método colorimétrico, onde o fósforo da solução mineral reagiu com o molibdato de amônio, produzindo o amônio fosfomolibdato. A quantidade de fósforo foi determinada medindo-se a intensidade de cor azul, que foi produzida pela formação de fosfomolibdato a um comprimento de onda de 650 nm (RANGANA, 1979).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da cinética de crescimento das microalgas foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão, utilizando o software Excel. Os dados da composição química das microalgas e das rações foram analisados quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene, utilizando o programa Statística 6.0 (STATSOFT, 2001). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), seguida de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$) e o teste de Kruskal-Wallis (Teste H) quando os dados não foram paramétricos utilizando o programa Assistat 7,6 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

REFERÊNCIAS

- ABCC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Seção Estatística**. Natal, 2014. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/category/s1-abcc/c5-estatisticas/>. Acesso em: 11/03/2015.
- ABCC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Carcinicultura Marinha: Um caso no Brasil e na Tailândia**. 2015. Disponível em: <http://abccam.com.br>. Acesso em: 15/10/2016.
- AMAYA, E.; DAVIS, A.; ROUSE, D. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. **Aquaculture**, v.262, n.2, p.393-401, 2007.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. **Official Methods of the AOAC International**, 18th ed. Maryland, USA.
- AZAZA, M.S.; MENSİ, F.; KSOURI, J.; DHRAIEF, M.N.; BRINI, B.; ABDELMOULEH, A.; KRA, M.M.. Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with diets containing graded levels of green algae ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of Southern Tunisia. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, n.2, p. 202-207, 2007.
- AZEREDO, V. B. S. **Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. 188 f. Dissertação de mestrado em Planejamento Energético. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
- BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v.25, n.2, p. 207-210.
- BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.26, n.1, p.9-20, 2008.
- BORGES, L.; FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um "Mecanismo de Desenvolvimento Limpo". **Atlântica**, v.29, n.1, p.35-46, 2007.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biodiesel from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.2, p.557-577, 2009.
- BROWDY, C.; SEABORN, G.; ATWOOD, H.; DAVIS, D.A; BULLIS, R.; SAMOCHAT; WIRTH, E.; LEFFLER, J. Comparison of Pond Production Efficiency, Fatty Acid

Profiles, and Contaminants in *Litopenaeus vannamei* Fed Organic Plant-based and Fish-meal-based Diets. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 37, n.4, p. 437-451, 2006.

BOROWITZKA, M. A., Culturing microalgae in outdoor ponds.algal Culturing Techniques, R. A. Andersen, **Elsevier Inc**, p.205-218 , 2005.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology**, v.25, p. 294–306, 2007.

CANDIDO, A. S., MELO JÚNIOR, A. P., COSTA, O. R., COSTA, H. J. M. S., IGARASHI, M. A. Effect of different densities in feed conversion of tilapia *Oreochromis niloticus*. With marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in policulture system. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 36, n. 3, p. 279-284, 2005.

CAVALHEIRO, J. M. O. **Estudo sobre alguns parâmetros químicos-cinéticos envolvidos no crescimento de *Macrobrachium rosenbergii* com rações balanceadas**. Dissertação de Mestrado em Ciência Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1993.

COPLIN, L. G. (Ed.). **Sustainable development of algal biofuels in the United States**. Washington: The National Academies Press, 2012.

COSTA, E.F.; SAMPAIO, Y. Geração de empregos diretos na cadeia produtiva do camarão marinho cultivado. **Revista Economia Aplicada**, v.8, n.2, p.1-19, 2004.

COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C.C.; DURANTE, A.J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.61, p. 105-110, 2006.

CHU, W..L.; LIM, Y.W; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P.E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p. 3-8, 2010.

CHU W-L. Biotechnological applications of microalgae. **leJSME**. v. 6 (Suppl 1), p. S24-S37, 2012.

CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v.235, p.513-551, 2004.

DASGUPTA, C.N., GILBERT, J.J., LINDBLAD, P., HEIDORN, T., BORGVANG, S.A., SKJANES, K. & DAS, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.10218-10238, 2010.

DAVID, U.; SANTOS-BALLARDO A.; ROSSI, S.B.C.; HERNÁNDEZ, S. D.; GÓMEZ, R.V.D.; RENDÓN-UNCETA, M.C. D.; CARO-CORRALES, J. A.; ORTIZ, A.V. .A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture **Aquaculture**, v.448, p.87–92, 2015.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, R. M. S. C.; DE MORAIS, A. M. M. B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life sciences**, v.93, n.15, p.479–86, 2013.

DE JESUS TORRES, H. S.; CASSINI, S. T. A.; GONÇALVES, R. F. **Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis**. In: IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, Porto Alegre: ABES, 2014.

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

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v.30, n.9, p.1525–1536, 2008.

FAÇANHA, F.N.; OLIVEIRA-NETO, A.R.; SILVA, C.F.; NUNES, A.J. A densidade de estocagem de camarões pode afetar a exigência dietética de metionina em dietas para o *Litopenaeus vannamei*. **Revista ABCC**, v.18, n.1, 2016.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497-509. 1957.

FRANCO, A.L.C.; LÔBO, I.P.; CRUZ, R.S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, n.3, p.437-448, 2013.

FREITAS, U.; NIENCHESKI, L.F.; ZARZUR, S.; MANZOLLI, R.P.; VIEIRA, J.P.; ROS, L.; Influência de um cultivo de camarão sobre o metabolismo bêntico e a qualidade da água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.3, p.293–301, 2008.

FUENTES-GRÜNEWALD, C.; ALACID, E.; GARCÉS, E.; ROSSI, S.; CAMP, J. Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors. **Marine Biotechnology**, v.15, n.1, p.37-47, 2012.

FURUYA, W.M., FURUYA, V.R.B. Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, (supl. especial), v.39, p.88-94, 2010.

GADELHA, R. G. F. **Eficiência da microalga *Spirulina platensis* na alimentação do camarão *Litopenaeus vannamei*** 110f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

GARRIDO, I.M. Microalgae immobilization: current techniques and uses. **Bioresource Technology**, v.99, n.10, p.3949 – 3964, 2008.

GATLIN III, D. M.; BARROWS, F. T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T.G.; HARDY, R. W.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, A.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E. J.; STONE, D.; WILSON, R.; 73 WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, Singapura, v.38, n.6, p. 551–579, 2007.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

GLENCROSS, B. D. The nutritional management of barramundi, *lates calcarifer* - a review. **Aquatic Nutrition**, v.12, n.4, p.291-309, 2006.

GONG, H.; LAWRENCE, A. L.; JIANG, D. H.; GALTIN III, D. M. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* II. Active components of soybean lecithin. **Aquaculture**, v.190, p.325-342, 2000.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. BANDARRA, N.M. Microalgae in Novel Food Products. **Food Chemistry Reserch Developments**, v.2, p.1-37, 2008.

GOUVEIA, L. **Microalgae as a Feedstock for Biofuels**. Springer. 2011.

HABIB, M.A.B.; PARVIN, T.C. HUNTINGTON, HASAN, R.N. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**, n.1034, FAO, Rome, 2008.

HARDY, R., W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research**, v.41, n.5, p.770-776, 2010.

HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X. & CHEN, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v.87, p.38- 46, 2010.

HOEK, C.V. **Algae: na introducion to phycology**. London: Cambridge University, 1995.

JACKSON, A.; ALDON, F. How much fish is consumed in aquaculture. IFFO offers updated FIFO calculation method. **Global Aquaculture Advocate**, St. Louis, v.16, n.1, p.28–30, 2013.

JORQUERA, O. et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource technology**, v.101, n.4, p.1406–1413, 2010.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: HELLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). **Handbook of Phycological Methods**. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge: Cambridge University, p.95-97. 1978.

LARDON, L.; HÉLIAS, A.; SIALVE, B.; STEYER, J.P.; BERNARD, O. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae. **Environmental Science & Technology**, v.43, n.17, p.6475–6481, 2009.

LEE, R.E. **Phycology**. Ed. Cambridge University Press, New York, US, 4th edition, p.561, 2008.

LOPES, T. G. G. **Efeito Sinérgico da Radiação Gama e da Refrigeração na Conservação do Camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*)**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Piracicaba. 2006.

LÓPEZ, C.V.G.; GARCIA, M.C.G.; FERNANDÉZ, F.G.A.; BUSTOS, C.S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J.M.A. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v.101, n.19, p.7587-91, 2010.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, Rima Editora. 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renew able and Sustainable Energy Reviews**, Portugal, v.14, p.217-232, 2010.

MELLO, C.C.A. **A luta por justiça ambiental e os grandes projetos de carcinicultura no Estado da Bahia**. In: Superintendência de Recursos Hídricos (Org.). Justiça pelas águas: enfrentamento ao racismo ambiental. (Série Textos Água e Ambiente, 2). Salvador: SRH, 2007.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, I. J.; NUNES, I. L. Prospeção tecnológica da utilização da *Spirulina platensis*. **Cadernos de Prospeção Tecnológica**, v.5, n.1, p.44-52, 2012.

MORCELLI, A. V.; GRISS, L. R. S. **Estudo da Eficiência de Diferentes Agentes Coagulantes na Sedimentação de Microalgas Cultivadas em Fotobiorreatores**. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

NAYLOR RL, RW HARDY, DP BUREAU, A CHIU, M ELLIOTT, AP FARRELL, I FORSTER, DM GATLIN, RJ GOLDBURG, K HUA, & PD NICHOLS. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.106, n.36, p.15103-15110, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: The National Academies Press, 376 p, 2011.

PARK, J.; CRAGGS, R.; SHILTON, A. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v.102, n.1, p.35-42, 2011.

PENTEADO, D. M. R. **Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga** *Phaeodactylum tricornutum* para produção de lipídios. Dissertação de mestrado. PósGraduação em Bioquímica. Curitiba, 2010.

PORTZ, L.; FURUYA, W. M. (Org.). Energia, Proteína e Aminoácidos. In: **Nutriaqua: Nutrição e Alimentação de Espécies de Interesse para Aquicultura Brasileira**. Ed. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, Brasil, p. 65, 2012.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, n.6, p.635-648, 2004.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. Tata:McgrawRiu, 1979.

ROCHA, I. P. Carcinicultura Brasileira: Processos Tecnológicos, Impactos Sócioeconômicos, Sustentabilidade Ambiental, Entraves e Oportunidades. In: **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**. Rio Grande do Norte, 75p, 2012.

ROCHA, I.P. Cultivo do camarão branco do pacífico: quebra de paradigmas, desafios e oportunidades para o fortalecimento do setor pesqueiro e da economia primária do Brasil. **Revista ABCC**, v.17, n.1, 2015.

ROCHA, I.P. As iniciativas da carcinicultura brasileira para promover a retomada de seu crescimento e das exportações. **Revista ABCC**, v.18, n.1, 2016.

RODOLFI L, ZITTELLI GC, BASSI N, PADOVANI G, BIONDI N, BONINI G, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.102, n.1, p.100–12. 2009.

RYAN, C. Cultivating Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels. **Terrapin Bright Green**, LLC e NRDC. 2009.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese de Doutorado em Engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SCOPEL, B. R. Mergulhando na Aquicultura Asiática Inovações e Tecnologias da Ásia para a Carcinicultura Brasileira. **Revista ABCC**, v. 16, n.1, 2014.

SILVA, F.; AZEVEDO, A.S.E. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

SOOKYING, D.; DAVIS, D.A.; SILVA, S.D., 2013. A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v.19, p.441–448, 2013.

SOUZA, E. O. **Caracterização e utilização de silagem de cabeça de camarão marinho na elaboração de dietas para criação de tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757)**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

SOUZA-SOARES, L.A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: Ed. Universidade UFPEL, 138p, 2005.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSEN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Comercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STATISTICA. **Statistica 6.0 Software**. Tulsa: StatSoft, 2001.

TAHIM, E.F.; ARAÚJO, I.F.A.J. carcinicultura do nordeste brasileiro e sua inserção em cadeias globais de produção: foco nos APLs do Ceará. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.52, n.3, p. 567-586, 2014.

TACON, A. G. J.; METIAN, M.; HASAN, M. R. **Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals: sources and composition**. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. n. 540. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 209 p, 2009.

VELU, C.S.; MUNUSWAMY, N. Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. **Food Chemistry**, v.100, n. 4, p. 1435–1442, 2007.

VENERO, A.; J. DAVIS, A. D.; ROUSE, B. D. Variable feed allowance with constant protein input for the pacific white shrimp *L.vannamei* reared under semi-intensive conditions in tanks and ponds. **Aquaculture**, v. 269, p. 490-503, 2007.

XU, L.; WEATHERS, J.; PAMELA, X.; XUE-ROUNG, LIU, C. Review: “Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities”. **Engineering in Life Sciences**, v.9, n.3, p.178-189, 2009.

YAAKOB, Z.; ALI, E.; ZAINAL, A.; MOHOAMAD, M.; TAKIFF, M.S. Na overview; Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. **Journal of Biologic Reserch-Thessaloniki**, v.21, n.6, 2014.

XU, W.; PAN, L.; ZHAO, D.; HUANG, J. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. **Aquaculture**, v.350–353, p. 147–153, 2012.

WALDIGE, V; CASEIRO, A.A. Indústria de rações: situação atual e perspectivas. **Panorama da Aqüicultura**, v.81, n.14, p. 27-32, 2004.

WILLIAMS P.J.L.; LAURENS, L.M.L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy Environ Science**, v.3, p.554–590, 2010.

ZAMALLOA, C., VULSTEKE, E., ALBRECHT, J. & VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae **Bioresource Technology**, v.102, n.2, p. 1149-1158, 2011.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler**. Faculty of Science, Universite des Paris, Paris, 1966.

ZHOU , Q.; ZENG, W.; WANG, H.; WANG, T.; WANG, Y.; XIE, F. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.364–365, p.252–258, 2012.

ZHU, X.Z.; DAVIS, D.A.; ROY, L.A.; SAMOCHA, T.M.; LAZO, J.P. Response of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to Three Sources of Solvent Extracted 103 Soybean Meal. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.44, n.3, p. 396-404, 2013.

Formulação de ração para juvenis de *Litopenaeus vanammei* a partir de espécies regionais de microalgas

Roberta Conceição Ribeiro Varandas⁽¹⁾ , João Andrade de Silva⁽²⁾ , Marta Maria

Conceição⁽²⁾, Alerson Araújo de Souza⁽²⁾ e Roberto Sassi⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, Campus 1 CEP 58051-900 João Pessoa, PB, Brasil. E-mail: robertacoriva@hotmail.com, sassi_rs@yahoo.com.br ⁽²⁾Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), Rua dos Escoteiros, s/nº, Mangabeira VII, Distrito Industrial de Mangabeira, CEP 58058-600 João Pessoa, PB, Brasil. E-mail: joaoctdr@gmail.com, martamaria8@yahoo.com, alerson.araujo@hotmail.com

Resumo- Esta pesquisa procurou selecionar microalgas com uso potencial para alimento de juvenis de *Litopenaeus vannamei* e formular rações usando biomassa de microalgas em substituição da farinha de peixe. Um total de sete espécies regionais além de *Spirulina platensis*, mundialmente conhecida na indústria alimentícia, foram pesquisadas. Os cultivos foram desenvolvidos em condições controladas de luz, temperatura e fotoperíodo, sendo o crescimento acompanhado por contagem celular e fluorescência “in vivo”. Os maiores crescimentos foram registrados em *Desmodesmus* sp., *S. platensis*, *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum*, *Planktothrix isothryx* e *Chlorella* sp, que apresentaram, respectivamente, os maiores valores de biomassa e número de células. A segunda e a terceira e a última foram selecionadas para a formulação das rações por apresentaram os maiores teores de proteína. Quatro rações foram preparadas com 35% da proteína bruta, sendo a farinha de peixe substituída parcialmente por 40% da biomassa dessas microalgas. Nas rações foram determinados os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, cálcio e fósforo. As rações formuladas têm composição química semelhante à das rações comerciais. Os dados indicam que *Chlorella* sp., *C. sp cf hypnosporum* e *S.*

platensis podem ser utilizadas na substituição parcial da farinha de peixe em rações para camarão juvenis de *L. vannamei*.

Termos para indexação: carcinicultura, proteína unicelular, dieta, camarão.

Abstract- This research sought to select microalgae with potential use for juvenile food *Litopenaeus vannamei* and formulate rations using microalgae biomass to replace fishmeal. A total of seven regional species plus *Spirulina platensis*, known worldwide in the food industry were studied. The cultures were developed under controlled conditions of light, temperature and photoperiod and the growth followed by cell counting and fluorescence "in vivo". The highest increases were registered in *Desmodesmus sp.*, *S. platensis*, *Chlorococcum sp cf hyphosporum*, *Planktothrix isoethrix* and *Chlorella sp.*, which presented, respectively the higher biomass and cell number. The second and the third and last were selected for the formulation of rations had the highest protein content. Four diets were prepared with 35% crude protein, and fishmeal partially replaced by 40 % of the biomass of these microalgae. In the diets were determined moisture, ash, protein, fat, calcium and phosphorus. The formulated feed rations have chemical composition similar to that of commercial pet food. The data indicate that *Chlorella sp.*, *C. sp cf hyphosporum* and *S. platensis* may be used in partial replacement of fishmeal in diets for juvenile shrimp *L. vannamei*.

Index terms: Shrimp farming, Celled protein, Diet, Shrimp

Introdução

A aquicultura é o setor de produção de alimento que mais cresceu no mundo nos últimos trinta anos superando a pesca extrativa (Rocha, 2016). No setor aquícola, a carcinicultura (cultivo de camarão em cativeiro) é uma das atividades que mais cresce no mundo nas últimas décadas. Os dez maiores países produtores

mundiais concentram em média 92,3% da produção total de camarão cultivado. O Brasil é o nono, correspondendo a 1,5% do total produzido (Rocha, 2015).

A carcinicultura marinha brasileira está localizada principalmente no Nordeste sendo a atividade do setor primário da economia nordestina que mais gera emprego e que mais contribui, de forma significativa, para a economia municipal (Rocha, 2015). No entanto, o uso de grandes quantidades de farinha de peixe na aquicultura levou ao aumento da demanda por esse produto, elevando ainda mais o seu preço (Jackson; Aldon, 2013). A busca por ingredientes alternativos, com alto teor de proteína, bom perfil de aminoácidos essenciais, e menor custo em relação à farinha de peixe, vem recebendo cada vez mais atenção dos pesquisadores.

Muitas microalgas possuem alto teor de proteínas, aminoácidos essenciais, ácidos graxos essenciais, pigmentos, vitaminas e minerais, podendo ser uma importante alternativa na alimentação de animais aquáticos (Radhakrishnan et al., 2014).

Considerando a quantidade de microalgas dentre as espécies nativas que ainda não foram pesquisadas sob esse foco, o presente trabalho teve o propósito de selecionar espécies regionais de microalgas com potencial para produzir ração para camarão juvenil da espécie *Litopenaeus vannamei* e de formular rações que possam substituir parcialmente a farinha de peixe.

Material e Métodos

Matérias-primas

Este trabalho foi desenvolvido com sete espécies regionais de microalgas do banco de cultura do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), isoladas de distintos ambientes dulcícolas da região Nordeste do Brasil (Tabela 1), e com *Spirulina platensis*, uma espécie de amplo uso

na alimentação humana e de animais (Habib et al., 2008). A escolha dessas espécies reginais baseou-se no fato de que a maioria delas apresenta teores de ácidos graxos superiores aos da soja segundo estudos prévios, e pelo fato de que uma das espécies (*Planktothryx isothryx*, cepa D39Z), apresenta cerca de 18,1% de ácido γ -linolênico (c18:3 c6,9,12), sendo, portanto, uma potencial fonte de ácidos graxos essenciais.

As rações comerciais e os outros produtos utilizados na formulação das rações como a farinha de peixe, farelo de soja, fécula de mandioca, farinha de milho, óleo de peixe e premix vitamínico foram adquiridas no comércio local da cidade de João Pessoa.

Ensaio de produção de biomassa

Os cultivos das microalgas foram realizados em bancada, numa sala de cultura climatizada, com temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dotada de sistema de iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, e fotoperíodo de 12 horas. Os cultivos foram desenvolvidos em balões de 6 litros contendo 5 litros dos meios de cultura Zarrouk e WC, de acordo com as espécies de microalgas cultivadas, com aeração contínua de ar atmosférico ($2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), usando um mini compressor de membrana.

O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por contagem celular em microscópio binocular e por análises da fluorescência “in vivo” das amostras num Fluorômetro Turner Design. Os experimentos foram interrompidos na fase estacionária, a biomassa foi concentrada em centrífuga refrigerada (18°C), congelada em ultrafreezer (-30°C), liofilizada e pesada em balança analítica. Ao final dos cultivos foram determinadas a taxa máxima de crescimento da população (R_{max}), que corresponde ao número máximo de células registrado ao final de cada

experimento descontando-se o valor da densidade celular dos inóculos, e rendimento máximo em biomassa (g.L^{-1}), após liofilização.

Composição química das biomassas produzidas

As proteínas totais foram determinadas segundo o método de Kjeldahl usando o Reagente de Nessler (Santos, 2007). Os carboidratos totais foram analisados pelo método adaptado de Kochert (1978) e os lipídios totais foram determinados seguindo a metodologia descrita por Folch et al. (1957).

Formulação das rações

Foram formuladas quatro rações experimentais (Tabela 2) para fase juvenil do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, com 35% da proteína bruta, sendo a farinha de peixe substituída por: a) 40% da biomassa de *Spirulina platensis*, b) 40% de biomassa de duas espécies de microalgas regionais cultivadas, selecionadas dentre as que apresentaram os maiores teores de proteínas nas condições de cultivo efetuadas, e c) uma ração sem microalga, com 100% de farinha de peixe. Todos os preparados foram comparados com duas rações comerciais de camarão.

A formulação das rações experimentais foi efetuada com o software CRAC versão 4.0. Utilizando como base a formulação da ração experimental para camarão juvenil *Litopenaeus vannamei* da pesquisa de Gadelha (2013). As rações foram elaboradas misturando todos os ingredientes utilizados, exceto o premix e o óleo numa batedeira convencional. A massa foi umedecida com água a 70 °C e introduzida em um moedor de carnes, formando pellets com 2 mm de diâmetro, que foram secos em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 12 horas.

Análises químicas das rações

Os teores de umidade, cinzas e proteínas foram determinados em triplicata utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005). O extrato etéreo foi

determinado seguindo os procedimentos descritos por Folch et al. (1957). O teor de cálcio foi quantificado por titulometria com EDTA, segundo (AOAC, 2005) e o teor de fósforo foi determinado pelo método colorimétrico, segundo Rangana (1979).

Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$) e quando os dados não foram paramétricos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (Teste H) com o auxílio do software estatístico ASSISTAT 7,6.

Resultados e Discussão

Rendimento máximo dos cultivos

As espécies cultivadas mostraram padrões diversos de crescimento, evidenciado pelas diferenças na duração da fase log e no rendimento máximo dos cultivos. As espécies *Chlorella* sp (D359WC), *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum* (D29Z), *Kirchneriella lunaris* (D61Z) e *Spirulina platensis* (D9Z) mostraram crescimentos mais expressivos, de acordo com as medidas da fluorescência “in vivo” das amostras (Figura 1), muito embora os maiores rendimentos em número de células (R_{max}) e em biomassa foram registrados para as cepas D26Z (*Desmodesmus* sp.) e D9Z (*Spirulina plantesis*) (Tabela 3). A não conformidade entre rendimento máximo celular e fluorescência in vivo é esperado, uma vez que não há necessariamente uma relação direta entre as duas variáveis.

A duração dos cultivos foi de 12 dias, mas o comportamento das curvas de crescimento obtido para cada espécie variaram expressivamente entre as microalgas pesquisadas. Crescimentos mais expressivos foram registrados para D359WC (*Chlorella* sp.), D61Z (*Kirchneriella lunares*), D29Z (*Chlorococcum* sp cf *hypnosporum*) e D9Z (*Spirulina platensis*). Dessas espécies, D26Z foi a que

apresentou o maior rendimento em biomassa ($0,625 \text{ g.L}^{-1}$) e o maior rendimento em número de células ($20,67 \text{ células.Lx10}^5$), seguindo-se pela D9Z (*Spirulina platensis*) a segunda a apresentar os maiores rendimento em biomassa ($0,610 \text{ g.L}^{-1}$) e em número de células ($0,610 \text{ g.L}^{-1}$) (Tabela 3). Rosa et al., (2015) registrou $0,62 \text{ g.L}^{-1}$ para *S. platensis* cultivada em meio com adição de monoetanolamina, mas concentrações de até $2,83 \text{ g.L}^{-1}$ foram encontradas por Andrade; Costa, (2008) em cultura realizada usando melaço. *Chlorococcum* sp. cf. *hypnosporum* foi a terceira espécie a apresentar os maiores rendimentos, com $16,11 \text{ células.Lx10}^5$ e $0,480 \text{ g.L}^{-1}$. Rendimento de até $0,85 \text{ g.L}^{-1}$ for encontrado por Beevi et al.,(2015) para *Chlorococcum* sp. em meio contendo 50% de água do mar.

Dentre as inúmeras alternativas que existem para estimar o tamanho de uma população em cultura pode-se usar a biomassa, o conteúdo de clorofila, o conteúdo de nitrogênio orgânico, a fluorescência da amostra, mas nenhum desses procedimentos determina diretamente o número de células individuais numa população (Andersen, 2005), de maneira que discrepâncias entre uma e outra análise podem ocorrer, mas no presente caso uma relação linear foi observada entre os valores de biomassa e o número de células registrados para as espécies pesquisadas (Tabela 3).

Análises químicas da biomassa das microalgas cultivadas

Os teores de proteínas, carboidratos e lipídios encontrados nas biomassas das microalgas pesquisadas mostraram que as proteínas foram os componentes mais abundantes em todas as espécies cultivadas (Tabela 4), corroborando com os resultados de Campos; Barbarino (2010), que quantificaram a composição química de dez espécies de microalgas. Os maiores teores de proteínas foram registrados para *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum* (D29Z) com 72,1%, seguida de *Chlorella* sp.

(D359WC) com 62,5%. Esses valores são superiores aos registrados por Matos et al. (2015) em *Chlorella* sp. cultivada em meio contendo concentrado de dessalinização (48,8%). Já os menores teores foram registrados em *Planktothrix isothrix* (D39Z) e *Desmodesmus* sp. (D26Z).

A espécie *Spirulina plantesis* (D9Z) mundialmente conhecida por apresentar altas concentrações de proteínas, mostrou, nesta pesquisa, um teor proteico de 50,02%. Volkman et al. (2008), reportaram para esta espécie um conteúdo proteico de 56,17% e Habib et al. (2008) relataram valores mais elevados, da ordem de 60-70% do seu peso seco.

Quanto aos lipídios o maior teor foi registrado na espécie *S. platensis* (32,6%), valor este muito superior ao relatado na literatura (entre 4-7%, Habib et al., 2008 e de até 8,94%, Ferreira et al., 2012, neste caso em cultivos usando fotobiorreatores tubulares com diferentes sistemas de circulações). No entanto, Sassano et al. (2010) encontraram valores de lipídios variando de 8,10 a 20,9% para *Spirulina platensis* em cultivos com diferentes concentrações de cloreto de amônio. As discrepâncias entre os valores registrados na pesquisa com os que tem sido publicados pode estar associado com as condições de cultivo utilizadas pelos diferentes autores.

Quanto aos carboidratos os maiores teores foram registrados para *Lagerheimia longiseta* (7,7%) e para *Chlorella* sp. (6,9%). Ho et al. (2013), encontraram valores de carboidratos de 51,3% para *Chlorella vulgaris* onde a privação de nitrogênio provocou o acúmulo de carboidratos nesta microalga.

Outras espécies que apresentaram valores expressivos de lipídios foram *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum* (D29Z), com 20,1% e *Planktothrix isothrix* (D39Z), com 22,7%. Um teor de lipídio de aproximadamente 30,55% foi encontrado por

Mahapatra e Ramachandra (2013) para *Chlorococcum* sp., indicando que o gênero pode abrigar espécies altamente produtivas. Por outro lado, apesar do alto valor de lipídio encontrado em *P. isothryx* deve-se ressaltar que esta espécie é uma cianobactéria toxigênica, e os perigos associados à sua utilização em aplicações biotecnológicas devem ser cuidadosamente avaliados (Churro et al., 2012).

Em culturas de microalgas o conteúdo de lipídios pode variar amplamente, deste 1% até 70% da biomassa seca (Mata et al., 2010). E entre os lipídios totais os Triacilglicerois (TAGs) merecem destaque por serem lipídios neutros que são usados pelas microalgas como estoque energético ao invés de apresentarem funções estruturais como outros lipídios (Hu, et al., 2008). O maior armazenamento de TAGs durante os cultivos ocorrem a partir do momento em que se inicia a depleção de nitrogênio do meio antes que a capacidade fotossintética das microalgas seja afetada (Wong et al., 2013).

Pesquisas de bioprospecção de espécies nativas como esta são extremamente relevantes pois podem resultar em achados surpreendentes de espécies que produzem altas concentrações de proteínas, lipídios ou carboidratos e que podem ser muito promissoras para aplicações na indústria de alimentos. Dentre as espécies pesquisadas ressalta-se que algumas espécies como *Planktothrix isothrix* (D39Z), *Kirchneriella lunaris* (D61Z) e *Scenedesmus acuminatus* (D115WC) não se mostram adequadas para a produção de ração, mas apresentam expressivas quantidades de lipídios podendo assim se tornar fonte potencial de ácidos graxos para outras aplicações.

Produção de ração para juvenis de camarão com espécies selecionadas

As espécies *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum* (D29Z), *Spirulina plantesis* (D9Z) e *Chlorella* sp. (359WC) foram selecionadas para a produção de ração para

camarão juvenil *Litopenaeus vannamei* por apresentarem os maiores teores proteicos. A primeira também apresentou um alto teor de lipídios (20,1%) e o maior rendimento em biomassa, fatos relevantes para o desenvolvimento de cultivos em massa visando sua aplicação na indústria de alimentos. *Chlorella* sp. (D359Z) apresentou o segundo maior teor de proteína (62,5 %), embora não tenha mostrado os outros requisitos observados em *Chlorococcum* quanto a produção lipídica e ao rendimento em biomassa. No entanto, ressalta-se que os parâmetros de crescimento das microalgas podem ser melhorados alterando as condições e as composições dos meios de cultura, através do que torna-se possível obter-se altas taxas de biomassa para uma espécie que produz muita proteína.

Spirulina plantesis (D9Z) já é mundialmente usada na indústria de alimentos e o fato de ter sido uma das espécies com maior taxa de duplicação celular, maior rendimento, e elevado teor proteico (Rojas et al., 2012), justificam o seu uso na preparação de ração de camarão. *Spirulina* apresenta alta digestibilidade e alta taxa de absorção pelos organismos (Habib et al., 2008), e já existem inúmeras pesquisas comprovando sua eficácia como ingrediente alternativo na elaboração de ração para camarão juvenil de *Litopenaeus vannamei* (Sancho et al., 2014).

Composição química da ração preparada com as microalgas selecionadas

A composição química das rações comerciais e da ração elaborada com as microalgas selecionadas nesta pesquisa é apresentada na tabela 5. Os resultados obtidos entre as diferentes rações não diferiram significativamente para a variável umidade, apresentando a ração com a *Spirulina* 9,65%, o maior valor, e a ração comercial 1 com 9,04%, o valor mais baixo. Valores abaixo de 13% são recomendados para os teores de umidade a fim de não causar decréscimo na qualidade proteica da ração (Cuzon; Guillaume, 1997).

A ração elaborada com *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum* apresentou o maior teor de lipídio (10,36%) dentre as rações formuladas. Ju et al. (2012), obtiveram valores entre 8,9% e 9,4% em rações com diferentes concentrações da microalga *Haematococcus pluvialis*.

No que se refere a composição química, as três formulações das rações com as microalgas usadas mostraram resultados semelhantes quando comparadas com as rações comerciais, evidenciando que a substituição parcial da farinha de peixe pelas microalgas é possível, e não apenas com a *Spirulina platensis* que já é uma espécie amplamente utilizada na aquicultura, mas também com *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum* e *Chlorella* sp, espécies que mostram grande potencial de serem utilizadas nas rações para o camarão marinho juvenil *L. vannamei* como importante fonte alternativa nutritiva. Igualmente à *Spirulina* a microalga *Chlorella* é amplamente comercializada pela indústria de alimentos. Igualmente à *Chlorella*, *Chlorococcum* sp. cf *hypnosporum* também é uma clorófitica, podendo apresentar qualidades similares. Por essa razão ela pode ser muito promissora não somente para a produção de ração animal, mas também para a indústria de alimentos nutracêuticos.

Conclusões

Com base nos resultados desta pesquisa conclui-se que o uso de microalgas para produção de ração para a carcinicultura é viável. E dentre as populações nativas de microalgas pode-se encontrar espécies que apresentam grande potencial de substituir parcialmente a farinha de peixe nas rações para o camarão marinho juvenil *L.vannamei* tornando-se uma fonte alternativa nutritiva importante para essa aplicação.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIMN/UFPB) pela infra-estrutura para o desenvolvimento desta pesquisa. Ao MCTi/FINEP (Processo: 2557-09) e ao “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq/Processo: 407519/2013-0) pelo suporte financeiro.

Referências

- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**, Elsevier Science Publishing Co Inc.2005.
- ANDRADE; M.R.; COSTA, J.A.V. Cultivo da microalga *spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p. 1551-1556, 2008.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. **Official Methods of the AOAC International**, 18th ed. Maryland, USA.
- BEVI, S.; SUKUMARAN, R.K. Cultivation of the fresh water microalga *Chlorococcum* sp. RAP13 in sea water for producing oil suitable for biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n.1, p.141–147, 2015.
- CAMPOS, V.B.; BARBARINO, S.O, L. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.339- 347, 2010.
- CHURRO, C.; PEREIRA, P.; VASCONCELOS, V.; VALERIO, E. Species-specific real-time PCR cell number quantification of the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. **Archives of Microbiology**, v.194, n.9, p.749-57, 2012.
- CUZON, G.; GUILLAUME, J. Energy and protein: energy rates. In: D’ABRAMO, L. R.; CONKLIN, D. E.; AKIYAMA, D. M. Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture. Baton Rouge, **World Aquaculture Society**, v. 6, p. 51-70, 1997.
- FERREIRA, L.S.; RODRIGUES, M.S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Kinetic and Growth Parameters of *Arthrospira (Spirulina) platensis* Cultivated

in Tubular Photobioreactor Under Different Cell Circulation Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.109, n. 2, p. 444-450, 2012.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simples methord for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497-5091, 957.

GADELHA, R. G. F. **Eficiência da microalga *Spirulina platensis* na alimentação do camarão *Litopenaeus vannamei*** 110f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

HABIB, M.A.B.; PARVIN, T.C. HUNTINGTON,HASAN, R.N. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, **Fisheries and Aquaculture Circular**, n.1034, FAO, Rome,2008.

HO, S.H.; HUANG, S.W.; CHEN, C.Y.; HASUMUNA, T.; KONDO, A. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, v.135, p.157–165, 2013.

HU, Q. SOMMERFELD, M. JARVIS, E. GHIRARDI, M. POSEWITZ, M. SEIBERT, M.DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v.54, n.4, p.621–639, 2008.

JACKSON, A.; ALDON, F. How much fish is consumed in aquaculture. IFFO offers updated FIFO calculation method. **Global Aquaculture Advocate**, St. Louis, v. 16, n. 1, p. 28–30, 2013.

JU, Z.Y.; DENG, D.F.; DOMINY, W. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). **Aquaculture**, v.354–355, p.50–55, 2012.

MAHAPATRA, D.M; RAMACHANDRA, T.V. Algal biofuel: bountiful lipid from *Chlorococcum* sp. Proliferating in municipal wastewater. **Current science**, v. 105, n. 1, p.47-55, 2013.

MATA, T.M., MARTINS, A.A. & CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.217-232, 2010.

MATOS, A.P.; MORIOKA, L.R.; ANNA, E.S.; FRANÇA, K.B. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp. cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.45, n.2, p.364-370, 2015.

RADHAKRISHNAN, S.; SARAVANA, B.P.; SEENIVESAN, C.; SHANTHI, T. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenberg*. **Journal of Basic & Applied Zoology**, v.67, n.2, p.25-33, 2014.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. Tata:McgrawRiu, 1979.

ROCHA, I.P. Cultivo do camarão branco do pacífico: quebra de paradigmas, desafios e oportunidades para o fortalecimento do setor pesqueiro e da economia primária do Brasil. **Revista ABCC**, v.17, n.1, 2015.

ROCHA, I.P. As iniciativas da carcinicultura brasileira para promover a retomada de seu crescimento e das exportações. **Revista ABCC**, v.18, n.1, 2016.

ROJAS, E.; AVILA, M.; PARADA, G. Application of nutritional strategies and their effect in continuous culture of *Spirulina* (*Arthospira plantensis*). **Latin american journal of aquatic research**, v.40, n.3, p.763-771, 2012.

ROSA, G.M.; MORAES, L. ;CARDIAS, B.B.; ANDRADE, M.R.; SOUZA, Z.; COSTA, J.A.V. Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in

semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v.192, p.321-327, 2015.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese de Doutorado em Engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SANCHO, J.M.; POERSCH, L.F.; BAUER, W.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY, W.; TESSER, M. Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina platensis)* in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. **Aquaculture**, v.426–427, p.120–125, 2014.

SASSANO, C.E.N.; GIOIELLI, L.A.; FERREIRA, L.S.; RODRIGUES, M.S.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1732–1738, 2010.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E.S. Cultivation of *Arthrospira (spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, n.1, p.98-101, 2008.

WONG, D.; FRANZ, M.; ANNALIESE, K. A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy. **Journal of Microbiological Methods**., v.95, p. 122–128, 2013.

Tabela 1. Relação das microalgas escolhidas para o presente estudo utilizadas nos ensaios de produção de biomassa e análises químicas.

Código	Espécie	Procedência
D9Z	<i>Spirulina platensis</i>	Univ. Federal Fluminense, RJ, cepa cedida pelo Dr. Sérgio Lourenço.
D26Z	<i>Desmodesmus</i> sp.	Açude do Cais, Cuité, PB
D29Z	<i>Chlorococcum</i> sp cf <i>hypnosporum</i>	Açude do Cais, Cuité, PB
D39Z	<i>Planktothrix isothrix</i>	Açude de Acauã, Natuba, PB
D61Z	<i>Kirchneriella lunares</i>	
D115WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Bebedouro das Ovelhas, Frei Martinho, PB
D133WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Açude Malhada Limpa, RN
D359WC	<i>Chlorella</i> sp.	Filtro de água potável residencial, João Pessoa, PB

Tabela 2. Ingredientes utilizados nas formulações das rações para camarões juvenis

Litopenaeus vanammei.

Ingredientes (%)		<i>Spirulina plantensis</i>	<i>Chlorococcum sp.cf hypnosporum</i>	<i>Chlorella sp.</i>	RS ⁽¹⁾	
Biomassa		12	12	12	-	
Farinha de peixe		18	18	18	30	
Fécula de mandioca		2	3	3	3	
Farinha de milho		25	25	25	25	
Farinha de trigo		1,5	2	2	1,5	
Óleo de soja		4	5	4	4	
Farinha de soja		22	23,5	23	22	
Farinha de sangue		13	10	11,5	13	
Premix		1	1	1	1	
Sal		0,5	0,5	0,5	0,5	
Composição	química	<i>Spirulina plantensis</i>	<i>Chlorococcum sp.cf hypnosporum</i>	<i>Chlorella sp.</i>	RS	RC ⁽²⁾
(%)						
Proteína bruta		35	35,7	35,9	35	35
Lipídios		9,8	8,9	7,3	8,5	8,9
Umidade		9,4	9,5	9,5	10,5	13
Cinzas		10,5	10	10,2	10	12

⁽¹⁾Ração sem microalga ⁽²⁾Ração comercial

Tabela 3. rendimento máximo celular (R_{max}) e rendimento biomassa (g/L) das microalgas estudadas.

Código da cepa	R_{max} (cél.s.mL ⁻¹ $\times 10^5$)	Biomassa (g/L)
D9Z	18,89	0,610
D26Z	20,67	0,625
D29Z	16,11	0,480
D39Z	13,11	0,439
D115WC	6,78	0,171
D133WC	7,78	0,180
D359WC	8,11	0,300
D61Z	7,06	0,180

D9Z = *Spirulina plantesis*; D26Z= *Desmodesmus* sp; D29Z= *Chlorococcum* sp cf *hypnosporum*; D39Z=*Planktrothrix isothrix*; D115WC=*Scenedesmus acuminatus*; D133WC=*Lagerheimia longiseta*; D359WC=*Chlorella* sp; D61Z= *Kirchneriella lunaris*

Tabela 4. Teores de proteínas, carboidratos e lipídios encontrados nas biomassas das microalgas cultivadas.

Espécies estudadas	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
<i>Spirulina platensis</i> (D9Z)	50,02* d±0,70	3,93* c,d±0,64	32,6* a±0,32
<i>Desmodesmus sp.</i> (D26Z)	47,22* e±0,39	5,45* b,c±0,30	11,6* d±2,10
<i>Chlorococcum sp cf hypnosporum</i> (D29Z)	72,10* a±0,08	3,7* c,d±0,30	20,1* b±1,21
<i>Kirchneriella lunaris</i> (D61Z)	47,70* e±0,86	2,3* d± 0,46	15,6* c±1,56
<i>Lagerheimia longiseta</i> (D133WC)	60,83* b,c±0,24	7,7* a± 1,36	8,00* e±0,75
<i>Chlorella sp.</i> (D359WC)	62,54*b±0,09	6,9* a,b±1,12	8,00* e±1,00
<i>Scenedesmus acuminatus</i> (D115WC)	60,21*b±1,64	3,7* c,d±0,3	15,00*c±1,0
<i>Planktothryx isoethrix</i> (D39Z)	27,33* c±0,08	3,8* c,d± 0,76	22,7* b±0,76

*Diferença significativa pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

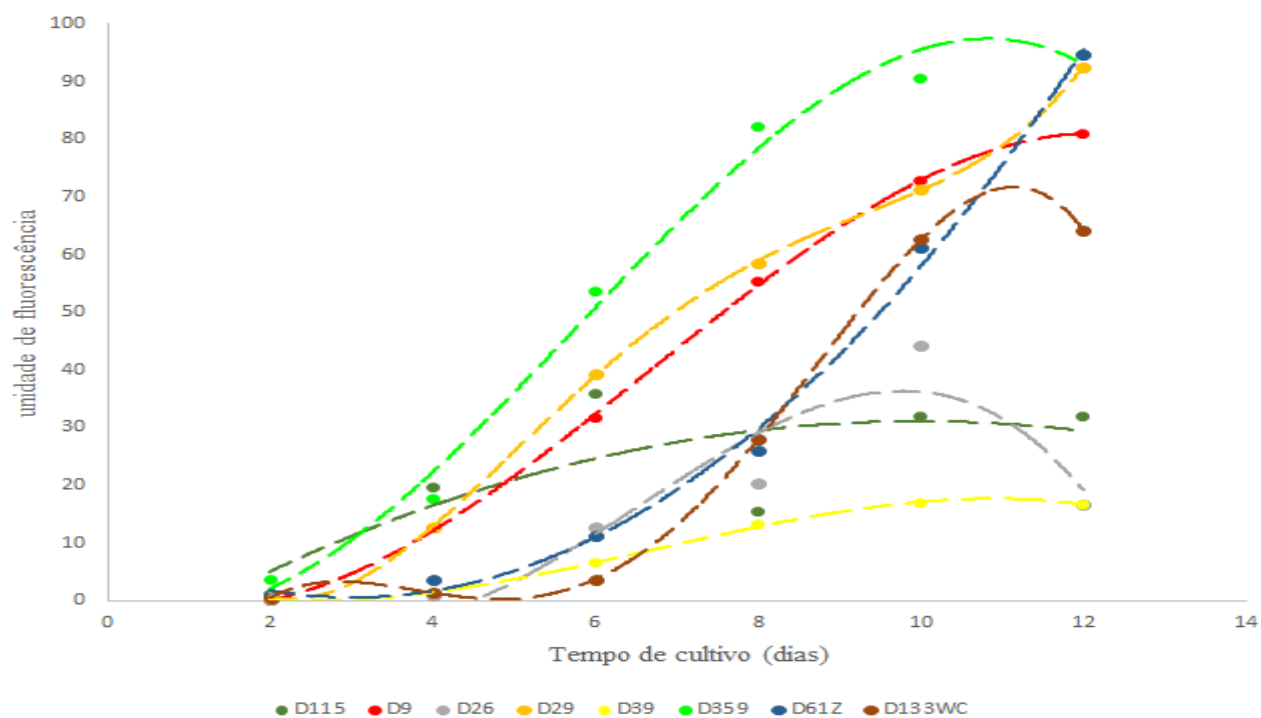
Tabela 5. Composição química das rações comerciais e da ração elaborada tendo como base as microalgas.

Itens %	Ração com <i>Spirulina</i>	Ração com <i>Chlorococum sp cf hypnosporum</i>	Ração com <i>Chlorella</i>	Rsem	RC-1	RC-2
Lipídios	8,67 ^d ±0,28	10,36 ^b ±0,13	8,34 ^d ±0,06	9,37 ^c ±0,07	11,98 ^a ±0,45	10,49 ^a ±0,47
Proteínas	36,55 ^f ±0,03	36,74 ^d ±0,05	36,88 ^c ±0,04	36,65 ^e ±0,04	38,46 ^a ±0,03	37,17 ^b ±0,03
Umidade	9,65 ^{ns} a±0.14	9,23 ^{ns} a±0,62	9,54 ^{ns} a±1,57	9,37 ^{ns} a±1,28	9,04 ^{ns} a±	8,45 ^{ns} a±0,15
Cinzas	16,21 ^a ,b±0,21	15,98 ^a ,b±1,54	17,57 ^a ±0,73	13,48 ^b ,c±0,99	12,15 ^c ±1,14	11,64 ^c ±0,9
Cálcio	3,28 ^{ns} a±0,62	1,88 ^{ns} a±1,03	2,38 ^{ns} a±1,44	2,85 ^{ns} a±	2,63 ^{ns} a±1,01	2,76 ^{ns} a±1,53
Fósforo	1,07 ^{ns} a±0,96	1,24 ^{ns} a±1,12	0,98 ^{ns} a±1,01	1,16 0,88 ^{ns} a ±0,80	0,98 ^{ns} a ±1,02	0,95 ^{ns} a±1,01

^{ns}Não significativo. *Diferença significativa pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Figura 1. Curvas de crescimento obtidas para as oito espécies de microalgas estudadas. Valores médios das medidas da fluorescência in vivo de cada amostras. D9Z = *Spirulina plantesis*; D26Z= *Desmodesmus sp*; D29Z= *Chlorococum sp cf*

hypnosporum; D39Z=*Planktrothrix isothrix*; D115WC=*Scenedesmus acuminatus*; D133WC=*Lagerheimia longiseta*; D359WC=*Chlorella* sp; D61Z= *Kirchneriella lunaris*



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioprospecção de espécies nativas como esta são extremamente importantes pois podem resultar em achados surpreendentes de espécies que produzem altas concentrações de proteínas, lipídios ou carboidratos e que podem ser muito promissoras para aplicações na indústria de alimentos.

As espécies D39Z (*Planktrotrix isothrix*), D61Z (*Kirchneriella lunaris*) e D115WC (*Scenedesmus acutus*) apresentaram altos teores de lipídios podendo ser utilizadas como matéria-prima para produção de biodiesel ou óleos comestíveis.

No que se refere a composição química, as três formulações das rações com as microalgas obtiveram resultados semelhantes quando comparadas com as rações comerciais demonstrando que a substituição parcial da farinha de peixe pelas microalgas é possível e não apenas com a *Spirulina* que já é uma espécie amplamente utilizada na aquicultura mas também com a *Chlorococum sp cf hyporosporum* e a *Chlorella sp* que podem ser utilizadas nas rações para o camarão marinho juvenil *L. Vannamei* como uma fonte alternativa nutritiva interessante para carcinicultura.

