

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA/DOCTORADO

GLACIO SOUZA ARAUJO

UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS NA BIOTECNOLOGIA, COM ÊNFASE PARA
BIODIESEL E ANÁLISE DE IMUNOPARÂMETROS EM CAMARÕES MARINHOS

FORTALEZA

2011

GLACIO SOUZA ARAUJO

UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS NA BIOTECNOLOGIA, COM ÊNFASE PARA
BIODIESEL E ANÁLISE DE IMUNOPARÂMETROS EM CAMARÕES MARINHOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Pesca/Doutorado da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Biotecnologia de Recursos
Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo
Farias.

FORTALEZA

2011

A689u Araujo, Glacio Souza

Utilização de microalgas na biotecnologia, com ênfase para biodiesel e análise de imunoparâmetros em camarões marinhos / Glacio Souza Araujo. – 2011.

111 f. : il., enc.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias

Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos

Tese (doutorado)–Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2011.

1. Microalgas – Biomassa 2. Biotecnologia 3. Lipídios 4. Cultivo I. Farias, Wladimir Ronald Lobo (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca III. Título

CDD 639.2

GLACIO SOUZA ARAUJO

UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS NA BIOTECNOLOGIA, COM ÊNFASE PARA
BIODIESEL E ANÁLISE DE IMUNOPARÂMETROS EM CAMARÕES MARINHOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca/Doutorado da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.

Aprovada em: 05/08/2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Rodrigo Magiioni

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Sérgio de Oliveira Lourenço

Universidade Federal Fluminense - UFF

Aos meus pais, Valdeglacio e Lucivânia, que
simplesmente foram incomparáveis em
mais uma etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo, a Deus, pelo seu grande poder e grande misericórdia para conosco, por nos amar, dar forças e coragem para vencer sempre os nossos desafios, cabendo a nós apenas confiar e lutar até o fim, sem desfalecer;

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pela orientação em todos esses anos (desde a graduação), pelo incentivo e concretização de toda a minha vida acadêmica, além de me passar, sem restrições, seus grandiosos conhecimentos;

A todos os professores que compõem o corpo docente do Departamento de Engenharia de Pesca, pelo apoio durante minha passagem pela Universidade Federal do Ceará, pois neles tenho amizade e muito orgulho;

Aos meus amigos e alunos do Curso de Graduação e Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, sem nenhuma exceção, em especial ao Renato, Luís Paulo, Alan, William, João, Pedro, pela grande ajuda e motivação nesta etapa;

Ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA), Centro de Tecnologia em Aquicultura (CTA), Laboratório de Bioquímica Marinha e Laboratório de Planctologia, pela utilização da parte física na realização dos experimentos;

Ao Laboratório de Nutrição Animal, pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, pela utilização da parte física na realização dos experimentos;

Ao Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Processos, pertencente ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará pela utilização da parte física na realização dos experimentos;

Às empresas de carcinicultura que cederam gentilmente os animais para a realização dos experimentos;

À indústria de rações Poli-Nutri, pela doação da ração comercial utilizada nos experimentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES dentro do Projeto de Cooperação Acadêmica – PROCAD (CAPES/PROCAD), pela ajuda financeira na realização desta pesquisa;

A todos os pesquisadores dos laboratórios em que foram realizadas as análises presentes nessa tese;

A minha namorada Gerlane Maria Gouveia, pela força e presença fiel na realização desse trabalho;

Enfim, a todos que não mencionei, mas fizeram parte da minha história, os meus mais sinceros agradecimentos.

“Deus não é homem para que minta, nem filho do homem para que se arrependa. Porventura, tendo Ele dito, não o fará? ou, havendo falado, não o cumprirá?”

(Números 23:19)

“Vós sois as minhas testemunhas, diz o SENHOR, e meu servo, a quem escolhi; para que o saibais, e me creiais, e entendais que eu sou o mesmo, e que antes de mim deus nenhum se formou, e depois de mim nenhum haverá. Eu, eu sou o SENHOR, e fora de mim não há Salvador. Eu anunciei, e eu salvei, e eu o fiz ouvir, e deus estranho não houve entre vós, pois vós sois as minhas testemunhas, diz o SENHOR; eu sou Deus.

Ainda antes que houvesse dia, eu sou; e ninguém há que possa fazer escapar das minhas mãos; agindo eu, quem o impedirá?”

(Isaías 43:10-13)

RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares capazes de usar a energia solar e o dióxido de carbono com elevada eficiência fotossintética para produção de biomassa, além de serem facilmente cultivadas. Devido a essas características são objetos de pesquisa principalmente na aquicultura e biotecnologia. Esta tese, composta de quatro capítulos, teve como primeiro objetivo avaliar a eficiência de cinco métodos de extração de óleo da biomassa obtida de culturas da microalga *Chlorella vulgaris*, sendo quatro destas extrações assistidas por ultrassom (a frio) e um método por aquecimento. Após a determinação do melhor método de extração de lipídios, foi avaliada a influência da salinidade do meio de cultivo na recuperação da biomassa e rendimento de óleo de dez microalgas cultivadas em meio Guillard f/2. Em seguida, foi avaliada a influência de diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo na recuperação da biomassa e no rendimento de óleo de quatro microalgas. Por último, foram determinados a recuperação da biomassa e rendimento de óleo de *C. vulgaris* cultivada em ambiente externo, bem como identificados os principais ácidos graxos presentes no óleo para a produção de biodiesel. Além disso, foram avaliados o desempenho zootécnico e alguns imunoparâmetros do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* após inclusão da biomassa obtida dessa cultura externa da microalga em sua dieta, antes e após o processo de extração de óleo. A extração de lipídios pelo método de Bligh e Dyer apresentou o maior rendimento ($52,49 \pm 3,37\%$) dentre os métodos assistidos por ultrassom. Das dez microalgas cultivadas em salinidades diferentes, seis tiveram seus rendimentos de óleo aumentados quando a salinidade foi reduzida de 35 para 25, com um incremento máximo de oito vezes em *Tetraselmis* sp., enquanto o rendimento de óleo aumentou em três espécies quando a salinidade foi elevada de 25 para 35, com um incremento de três vezes em *C. vulgaris*. O aumento das quantidades de nitrato de sódio nos meios de cultivo resultou na elevação da recuperação de biomassa das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *C. vulgaris*, enquanto a redução das quantidades desse nutriente resultou no aumento dos rendimentos de óleo de todas as microalgas, principalmente para as espécies descritas acima. Finalmente, foi constatado que alguns parâmetros zootécnicos de crescimento dos camarões marinhos foram bem melhores no experimento que utilizou inclusão da biomassa natural de *C. vulgaris* no lugar da biomassa delipidada, embora a inclusão de 0,5% da última também tenha apresentado resultados satisfatórios. Com relação aos imunoparâmetros, a inclusão da biomassa natural ou delipidada de *C. vulgaris* na dieta dos camarões, independente da

quantidade utilizada, aumentou a concentração de proteínas totais e reduziu a atividade da fenoloxidase no soro dos animais.

Palavras-chave: Cultivo. Parâmetros imunológicos. Lipídio. Rendimento.

ABSTRACT

Microalgae are unicellular organisms capable of using solar energy and carbon dioxide with high photosynthesis efficiency to produce biomass, and are easy to cultivate. Due to these characteristics, they have been the object of research, especially in the fields of aquaculture and biotechnology. This thesis, consisting of four chapters, had as its first objective to evaluate the efficiency of different extraction methods of biomass oil from cultures of microalga *Chlorella vulgaris*. Four of these methods were ultrasound-assisted (cold) and one by heating. After determining the best method for lipid extraction, we evaluated the influence of salinity of the culture medium in biomass recovery and oil yield for ten microalgae cultivated in Guillard f/2 medium. Next, the influence of different amounts of sodium nitrate was evaluated in the culture medium for biomass recovery and oil yield for four microalgae. Lastly, biomass recovery and oil yield was determined for *C. vulgaris* cultivated outdoors, and the main fatty acids present in the oil for biodiesel production were identified. Also, the performance and certain immunoparameters of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* were evaluated following inclusion of biomass obtained from outdoor microalgae culture in the diet, before and after the oil extraction process. Lipid extraction using the Bligh and Dyer method showed the highest yield ($52.49 \pm 3.37\%$) among the ultrasound-assisted methods. Of the ten microalgae cultivated under different salinities, six saw their oil yields increase when salinity was reduced from 35 to 25; the highest increase (eight-fold) was observed in *Tetraselmis* sp., whereas oil yield increased in three species when salinity was raised from 25 to 35, with a threefold increase for *C. vulgaris*. The higher amounts of sodium nitrate in cultivation media resulted in increased biomass recovery from microalgae *Nannochloropsis oculata* and *C. vulgaris*, whereas the reduction in the quantity of this nutrient resulted in higher oil yields for all microalgae, especially for the species described above. Finally, it was observed that certain growth performance parameters of marine shrimp were vastly superior in the experiment using inclusion of natural *C. vulgaris* biomass in replacement of defatted biomass, although 0.5% inclusion of the latter also showed satisfactory results. With regard to immunoparameters, inclusion of natural or defatted biomass of *C. vulgaris* in the diet of shrimps, regardless of amount used, increased the concentration of total proteins and reduced phenoloxidase activity in animal serum.

Keywords: Culture. Immunological parameters. Lipid. Yield.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1	Métodos utilizados para extração de lipídios totais da microalga <i>C. vulgaris</i> .	23
TABELA 2	Rendimentos de óleo obtidos da microalga <i>C. vulgaris</i> utilizando diferentes metodologias. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 1%.	27
TABELA 3	Índice de acidez do óleo obtido da microalga <i>C. vulgaris</i> utilizando diferentes metodologias. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 1%.	30

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Recuperação de biomassa (%) das microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades, obtida por floculação química com NaOH 2 N. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 5%.	40
TABELA 2	Produtividade de recuperação da biomassa (kg/m ³ /dia) das microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 5%.	41
TABELA 3	Rendimentos de óleo (%) a partir da biomassa das dez microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades utilizando o método Bligh e Dyer (1959) para a extração. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 5%.	42

CAPÍTULO 3

TABELA 1	Densidades celulares (cels. mL ⁻¹) iniciais das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.	57
TABELA 2	Densidades celulares (cels. mL ⁻¹) finais das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.	57
TABELA 3	Concentrações iniciais reais de nitrato nos meios de cultivo das quatro microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.	58
TABELA 4	Concentrações finais de nitrato nos meios de cultivo das quatro microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.	58

TABELA 5	Recuperação de biomassa (%) das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo.	60
----------	--	----

TABELA 6	Rendimento de óleo (%) das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo.	62
----------	---	----

CAPÍTULO 4

TABELA 1	Composição de ácidos graxos presentes no óleo obtido de <i>C. vulgaris</i> cultivada no ambiente externo.	88
----------	---	----

TABELA 2	Parâmetros zootécnicos dos camarões dos camarões marinhos <i>L. vannamei</i> após inclusão de <i>C. vulgaris</i> na dieta antes (biomassa natural) e depois do processo de extração de lipídios (biomassa delipidada). Letras iguais nas linhas indicam ausência de diferenças estatísticas ao nível de 5%.	90
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1 Correlação entre a densidade celular (cels. mL⁻¹) e a densidade óptica (DO_{680 nm}) para a microalga *T. tetrahele*. 53
- FIGURA 2 Correlação entre a densidade celular (cels. mL⁻¹) e a densidade óptica (DO_{680 nm}) para a microalga *T. chui*. 53
- FIGURA 3 Correlação entre a densidade celular (cels. mL⁻¹) e a densidade óptica (DO_{680 nm}) para a microalga *N. oculata*. 54
- FIGURA 4 Correlação entre a densidade celular (cels. mL⁻¹) e a densidade óptica (DO_{680 nm}) para a microalga *C. vulgaris*. 54
- FIGURA 5 Curvas de crescimento da microalga *T. tetrahele* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio. 55
- FIGURA 6 Curvas de crescimento da microalga *T. chui* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo, nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio. 55
- FIGURA 7 Curvas de crescimento da microalga *N. oculata* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo, nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio. 56
- FIGURA 8 Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio. 56
- FIGURA 9 Consumo de nitrato pelas microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo. 59

CAPÍTULO 4

- FIGURA 1 Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho do soro de camarões *L. vannamei* alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa (p<0,01). 95

- FIGURA 2 Concentração de proteínas totais no soro (CP) dos camarões alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,01$). 97
- FIGURA 3 Atividade da fenoloxidase (PO) no soro dos camarões alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,01$). 99
- FIGURA 4 Contagem diferencial de hemócitos (CDH) na hemolinfa dos camarões alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,01$). 101

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	18
RESUMO	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	21
2.2. Recuperação da biomassa algal	22
2.3. Extração dos lipídios totais	23
2.3.1. Extração a quente - Método de Soxhlet	23
2.3.2. Extração a frio	23
2.3.3. Método de Folch, Less e Stanley	24
2.3.4. Método de Chen, Shen e Sheppard	24
2.3.5. Método de Bligh e Dyer	25
2.3.6. Método de Hara e Radin	25
2.4. Determinação do índice de acidez (IA)	26
2.5. Análises estatísticas	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Recuperação da biomassa da microalga <i>C. vulgaris</i>	27
3.2. Rendimentos de óleo da microalga nos diferentes métodos	27
3.3. Índice de acidez (IA)	29
4. CONCLUSÃO	30
5. REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2	34
RESUMO	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Cultivo das microalgas	37
2.2. Flocculação das culturas	38
2.3. Extração do óleo	39
2.4. Análises estatísticas	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Recuperação da biomassa das microalgas	39
3.2. Produtividade de recuperação da biomassa das microalgas	40
3.3. Influência da salinidade no rendimento de óleo das microalgas	41
4. CONCLUSÃO	43
5. REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO 3	47
RESUMO	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Cultivo das microalgas	50

2.2. Flocculação das culturas	51
2.3. Extração do óleo	51
2.4. Análises estatísticas	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1. Correlação entre a densidade celular e a densidade óptica	52
3.2. Desempenho das culturas	54
3.3. Consumo de nitrato pelas microalgas	58
3.4. Recuperação da biomassa das microalgas	60
3.5. Influência da concentração de nitrato no rendimento de óleo das microalgas	61
4. CONCLUSÃO	65
5. REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 4	68
RESUMO	69
1. INTRODUÇÃO	70
1.1. Produção aquícola brasileira	70
1.2. Produção de camarões no Brasil	70
1.3. Imunoestimulantes em organismos aquáticos	72
1.4. Parâmetros imunológicos em camarões marinhos	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1. Cultivo da microalga	75
2.1.1. Cultivo em sistema interno	75
2.1.2. Cultivo em ambiente externo e recuperação da biomassa de <i>C. vulgaris</i>	76
2.1.3. Determinação do teor de proteína bruta da microalga	77
2.1.4. Determinação do teor de lipídios da microalga	77
2.1.5. Caracterização dos lipídios presentes no óleo extraído de <i>C. vulgaris</i>	77
2.2. Preparo da ração contendo a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i>	79
2.3. Experimento 1: Avaliação do desempenho zootécnico e imunológico dos camarões marinhos <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com ração contendo a biomassa da microalga que não passou pelo processo de extração de óleo	80
2.4. Experimento 2: Avaliação do desempenho zootécnico e imunológico dos camarões alimentados com ração contendo a microalga após o processo de extração de óleo	81
2.5. Análise dos parâmetros de crescimento dos camarões	82
2.6. Parâmetros físicos e químicos da água	83
2.7. Análise dos parâmetros imunológicos dos camarões	84
2.7.1. Avaliação da capacidade hemaglutinante da hemolinfa	85
2.7.2. Concentração de proteínas totais no soro dos camarões (CP)	85
2.7.3. Atividade da fenoloxidase (PO)	85
2.7.4. Contagem diferencial de hemócitos (CDH)	86
2.8. Análises estatísticas	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1. Cultivo da microalga <i>C. vulgaris</i> em ambiente interno e externo	87
3.2. Recuperação da biomassa da microalga cultivada no ambiente externo	87
3.3. Teor de proteína bruta e lipídios totais de <i>C. vulgaris</i>	88
3.4. Identificação dos ácidos graxos presentes no óleo da microalga	88

3.5. Desempenho zootécnico dos camarões	89
3.6. Parâmetros físicos e químicos da água	93
3.7. Parâmetros imunológicos dos camarões	94
3.7.1. Avaliação da capacidade hemaglutinante da hemolinfa	95
3.7.2. Concentração de proteínas totais no soro dos camarões (CP)	96
3.7.3. Atividade da fenoloxidase (PO)	98
3.7.4. Contagem diferencial de hemócitos (CDH)	100
4. CONCLUSÃO	102
5. REFERÊNCIAS	102

CAPÍTULO 1

ESTUDO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE MICROALGAS ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE ULTRASOM

RESUMO

As microalgas marinhas são extremamente importantes na natureza, principalmente por sua vasta contribuição para a produção primária dos oceanos e da própria Terra. Além disso, elas podem ser utilizadas como fonte de alimento para animais e para homens, indicadores ambientais, fonte de substâncias de importância farmacológica, industrial dentre outras. Nesse primeiro capítulo foi observada a eficiência de extração do óleo da microalga *Chlorella vulgaris*, comparando vários métodos assistidos por ultrassom (a frio) e um método por aquecimento. Previamente a pasta da microalga gerada após o cultivo foi concentrada e seca para depois ser processada à extração do óleo. Dos métodos a frio, o maior percentual de lipídios totais extraídos foi observado quando se utilizou clorofórmio como solvente ($52,49 \pm 3,37$ e $16,06 \pm 1,91\%$), seguido do diclorometano ($10,86 \pm 1,71\%$) e por último o hexano ($2,15 \pm 0,23\%$), com o método Soxhlet obteve-se o menor rendimento ($1,67 \pm 0,28\%$). Outro aspecto diferencial entre os métodos é a utilização de água no método de Bligh e Dyer, já que em meio aquoso o processo de extração de lipídios é beneficiado pela maior intensidade de energia liberada na evaporação, enfraquecendo a parede celular das microalgas.

Palavras-chave: Extração. Lipídio. Microalga. Ultrassom.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas marinhas são extremamente importantes na natureza, principalmente por sua vasta contribuição para a produção primária dos ecossistemas aquáticos. Além disso, elas podem ser utilizadas como fonte de alimento para animais e homens, como fonte de substâncias de importância farmacológica e industrial dentre outras (LOURENÇO, 2006). Além disso, podem ser utilizadas como bioindicadores para avaliar o nível de eutrofização dos corpos d'água (TROBAJO; COX; QUINTANA, 2004).

As microalgas são organismos unicelulares capazes de usar a energia solar e o dióxido de carbono com eficiência fotossintética maior que as plantas superiores para produção de biomassa (MIAO; WU, 2006). Esta característica, aliada à simplicidade das técnicas de cultivo, tornam as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários das mais modernas áreas de investigação. Isto se deve à essencial importância destas nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse da indústria alimentar, química e farmacêutica (GROBBELAAR, 2004).

A principal vantagem de se cultivar comercialmente as microalgas é a obtenção de seus produtos metabólicos, que são utilizados na alimentação de organismos marinhos e terrestres, como suplementos alimentares para os seres humanos, ou para seu uso em processos ambientais, como tratamento de águas residuais, fertilização dos solos, biocombustíveis e fitorremediação de resíduos tóxicos (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

De acordo com Wijffels (2007), a biotecnologia marinha visa a descoberta de novos produtos que possam contribuir para a saúde dos seres humanos, como por exemplo, novos nutracêuticos obtidos de algas, além da contribuição também no setor da energia, como a produção de biocombustíveis. De acordo com o autor, os ácidos-graxos da série $\omega 3$, comprovadamente benéficos para a saúde dos seres humanos, também podem ser uma potencial fonte de biocombustíveis. No entanto, o maior desafio é obter estes produtos com qualidade e em quantidade suficiente e de uma maneira sustentável.

As vantagens do uso do óleo de microalgas para a produção de biodiesel são dadas pela sua elevada taxa de crescimento, pela possibilidade de serem cultivadas em águas residuais como, por exemplo, efluentes de esgoto doméstico e industrial e o seu cultivo

requerer uma área muito menor do que o necessário para a produção de plantas superiores (CHISTI, 2007).

Apesar da grande produtividade de óleo nas microalgas, uma das maiores dificuldades do processo está relacionada aos custos para secagem e extração do óleo destes microrganismos. As microalgas devem ser colhidas e processadas para a liberação de lipídios e outros produtos. A dificuldade está na liberação de lipídios, de localização intracelular. É importante que o óleo extraído seja liberado sem contaminação significativa por outros componentes celulares ou outros compostos (SCOTT *et al.*, 2010).

Guschina e Harwood (2006) mostraram que dependendo da espécie de microalga, podem ser obtidos diferentes teores de lipídios. Entretanto, as microalgas mais utilizadas na aquicultura possuem elevadas quantidades de óleo, formados principalmente por ácidos graxos poli-insaturados.

Wijffels (2007) comenta que a quantidade de óleo produzida pelas microalgas vai depender da taxa de crescimento da espécie utilizada e do teor de lipídios presente na mesma. Microalgas com produção elevada de óleo são as mais desejáveis para a obtenção do biodiesel. Dependendo da espécie, as microalgas produzem diferentes tipos de lipídios, hidrocarbonetos e outros óleos complexos.

Qin (2005) avaliou a influência de algumas variáveis na produção de lipídios pela microalga de água doce *Botryococcus braunii*, entre elas a temperatura de cultivo, intensidade de luz e salinidade, constatando a existência de faixas ótimas para as melhores produções.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o rendimento da extração de lipídios, utilizando um método tradicional de extração a quente e quatro métodos de extração a frio, assistidos por ultrassom.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*

O cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* foi realizado no Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, utilizando um meio de cultivo orgânico proveniente de um tanque de alvenaria com o cultivo

da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, localizado na Estação de Piscicultura Prof. Dr. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. A água do tanque foi coletada e em seguida esterilizada através de um autoclave por 15 minutos a 121 °C. Para o cultivo, foi utilizado apenas o sobrenadante.

A cultura foi iniciada a partir de uma cepa, obtida no próprio laboratório, com volume de 20 mL, em um erlenmeyer de 250 mL, e a cada dois dias, foi acrescentado aproximadamente o mesmo volume de meio de cultura. Após 12 dias, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para outro, com capacidade para um litro até a cultura atingir o volume total do recipiente. Finalmente, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para um recipiente com três litros de meio e, a partir deste momento, a cultura foi submetida a uma aeração constante e irradiância de aproximadamente $20 \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, determinada através de um luxímetro digital. A temperatura da sala de cultivo ficou em torno de 28 ± 1 °C.

2.2. Recuperação da biomassa algal

Para separar as microalgas do meio de cultivo foi utilizada a técnica de floculação química, através da adição de 90 mL de uma solução de NaOH 2N. A completa floculação foi monitorada através da obtenção da mínima densidade ótica, determinada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 680 nm. A floculação ocorreu quando a microalga iniciou a fase estacionária de cultivo.

O sobrenadante contendo o meio de cultivo foi sifonado e a biomassa algal úmida foi lavada e em seguida seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por um período de 24 horas. Após a secagem, foi triturada em um processador de alimentos e pesada em balança semi analítica para a determinação da recuperação da sua biomassa.

2.3. Extração dos lipídios totais

Para a extração dos lipídios totais da microalga *C. vulgaris*, foi utilizado um método tradicional de extração a quente, e quatro métodos de extração a frio, sendo estes últimos através de ultrassom (Tabela 1).

Tabela 1 - Métodos utilizados para extração de lipídios totais da microalga *C. vulgaris*.

Método por aquecimento	Método Soxhlet (1879)
Métodos a frio conduzidos por ultrassom	Método de Folch, Less e Stanley (1957)
	Método de Bligh e Dyer (1959)
	Método de Hara e Radin (1978)
	Método de Chen, Shen e Sheppard (1981)

2.3.1. Extração a quente - Método de Soxhlet

Para extração pelo método de Soxhlet, foram pesadas em triplicata 2 g da microalga seca e armazenadas em sachês feitos com filtros de papel que foram colocados em balões de vidro, previamente pesados, com 110 mL de acetona e aquecidas de 120 a 180 °C no extrator de Soxhlet por um período de oito horas. Ao final da extração, as amostras foram retiradas e os balões foram levados à estufa a uma temperatura de 105 °C durante 24 horas e, em seguida, foram colocados em um dessecador para completar o processo de retirada de umidade. A quantidade de óleo presente na biomassa foi obtida a partir da diferença entre o peso do balão seco (antes do processo de extração do óleo) e o peso do mesmo balão, juntamente com o óleo, ao final do processo.

2.3.2. Extração a frio

Em todos os experimentos por extração a frio foram utilizadas cinco gramas da biomassa seca da microalga *C. vulgaris*.

Inicialmente, parte da biomassa obtida a partir de um único cultivo foi utilizada para determinação do percentual médio de umidade. Para isso foram pesadas cinco gramas da

biomassa seca em triplicata e em seguida levadas à estufa por um período de 24 horas na temperatura de 105 °C. A concentração de lipídios totais na biomassa foi determinada por balanço de massa do sólido e dada pela equação abaixo:

$$\left(\frac{5g - \text{Biomassa após extração}}{5g} \times 100 \right) \% - \text{Umidade média da biomassa \%} = \text{Lipídios totais \%}$$

2.3.3. Método de Folch, Less e Stanley

A extração pelo método de Folch, Less e Stanley (1957) foi realizada de acordo com as modificações propostas por Christie (1982). A biomassa seca da microalga (5 g), em triplicata, foi homogeneizada com 25 mL de metanol, durante três minutos em banho ultrasônico com frequência de 40 KHz e potência de 80 W. Após esta etapa, foram adicionados 50 mL de clorofórmio e a mistura foi submetida a uma nova sonicação por mais 27 minutos, sendo em seguida filtrada a vácuo e o resíduo sólido ressuspensionado em uma solução de clorofórmio e metanol 2:1 (v:v). O mesmo procedimento foi realizado mais uma vez, nas mesmas condições, e após a segunda filtragem o sólido foi seco em estufa durante 24 horas a 105 °C.

Os filtrados foram combinados e transferidos para um funil de separação com 1/4 de volume previamente preenchido com uma solução de KCl 0,88%. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso até a separação das fases. A fase inferior, ou seja, o extrato de clorofórmio contendo os lipídios foi removida para um erlenmeyer de 125 mL, sendo recolhida em papel de filtro com sulfato de sódio anidro. Foram retiradas alíquotas de 3 mL para a determinação do índice de acidez e o restante da miscela foi concentrada à vácuo em evaporador rotativo na temperatura de 40 a 45 °C, sendo o solvente recuperado.

2.3.4. Método de Chen, Shen e Sheppard

A maioria dos métodos a frio para extração de óleo utiliza o clorofórmio como solvente, estando associado ao alto grau carcinogênico. Por isso Chen, Shen e Sheppard

(1981) realizaram estudos de extrações de óleos seguindo o método de Folch, Less e Stanley (1957), onde a única diferença é a substituição do solvente clorofórmio pelo diclorometano o que reduz bastante o risco a saúde humana. O diclorometano é também mais volátil que o clorofórmio, portanto a evaporação do solvente é mais rápida. A extração seguiu o mesmo procedimento descrito no método de Folch, Less e Stanley.

2.3.5. Método de Bligh e Dyer

Para a extração pelo método de Bligh e Dyer (1959) foram adicionados à biomassa seca da microalga (5 g), em triplicata, em um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. O erlenmeyer foi tampado e posto para sonicar durante 40 minutos, em banho ultrasônico com frequência de 40 KHz e potência de 80 W. Em seguida, foram adicionados mais 12,5 mL de clorofórmio e 12,5 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e realizada outra sonicação com duração de 20 minutos. A parte sólida foi filtrada à vácuo e posteriormente seca em estufa durante 24 horas a 105 °C. O mesmo procedimento utilizado no método de Folch, Less e Stanley (1957) foi adotado para determinação do índice de acidez a partir da retirada de uma amostra da miscela da fase orgânica.

2.3.6. Método de Hara e Radin

Para a extração do óleo pelo método de Hara e Radin (1978), inicialmente a biomassa seca da microalga (5 g), em triplicata, foi misturada com 20 mL de isopropanol, e sonicada durante quatro minutos, em banho ultrasônico com frequência de 40 KHz e potência de 80 W. Em seguida, foram adicionados 30 mL de n-hexano e a mistura foi submetida a uma nova sonicação por mais 56 minutos. A mistura foi filtrada à vácuo e a parte sólida seca em estufa durante 24 horas a 105 °C. O filtrado foi transferido para um funil de separação ao qual foi adicionado 60 mL da solução de sulfato de sódio (1:15) (p:v). Procedeu-se agitação rigorosa até repouso completo. Retirou-se uma alíquota de 3 mL da fase superior da miscela rica em n-hexano para determinação do índice de acidez.

Vale salientar que o tempo de sonicação não foi capaz de variar o processo de extração nos diferentes métodos testados.

2.4. Determinação do índice de acidez (IA)

O índice de acidez (IA) foi determinado através do método AOCS 5a-40 (1997) modificado. Para isso, foram retiradas alíquotas de 3 mL, em triplicata, das misturas, contendo em média 0,4 g mL⁻¹. Adicionou-se algumas gotas de fenolftaleína como indicador (em torno de 1 mL), efetuando-se a titulação direta com solução padronizada de NaOH 0,1 N. O volume utilizado na titulação indicou o índice de acidez dado pela equação:

$$IA(\text{mgKOH} / \text{g}) = \frac{V \cdot 56,11 \cdot f \cdot N}{m}$$

Onde:

m = massa da amostra;

V = volume (mL) de solução de NaOH utilizada com a amostra;

f = fator de correção da solução de NaOH;

N = normalidade da solução de NaOH;

IA = índice de acidez (mg KOH g⁻¹).

2.5. Análises estatísticas

Os resultados referentes ao rendimento de óleo obtido da biomassa da microalga em cada um dos cinco métodos experimentados foram submetidos a um teste *t* para as médias com o intuito de verificar a existência de diferença estatisticamente significativa ao nível de 1% utilizando o programa BioEstat versão 4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Recuperação da biomassa da microalga *C. vulgaris*

Após a floculação química e secagem, foi obtido uma recuperação da biomassa da microalga *C. vulgaris* de 0,50% (g 100 mL⁻¹), considerado muito elevado, pois esse rendimento vai depender de diversos fatores, entre eles o tamanho das células, forma de assimilação de nutrientes, taxas de crescimento, secagem, entre outros.

3.2. Rendimentos de óleo da microalga nos diferentes métodos

A tabela 2 mostra os rendimentos de óleo obtidos da microalga *C. vulgaris* utilizando diferentes metodologias.

Tabela 2 - Rendimentos de óleo obtidos da microalga *C. vulgaris* utilizando diferentes metodologias. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 1%.

Método	Solvente	Rendimentos de óleo (%)
Bligh e Dyer	Clorofórmio/Metanol/Água	52,49±3,37 ^a
Folch, Less e Stanley	Clorofórmio e Metanol	16,06±1,91 ^b
Chen, Shen e Sheppard	Diclorometano e Metanol	10,86±1,71 ^c
Hara e Radin	n-Hexano e Isopropanol	2,15±0,23 ^d
Soxhlet	Acetona	1,67±0,28 ^d

Como podemos observar, os rendimentos de óleo da microalga *Chlorella vulgaris* apresentaram diferença estatisticamente significativa entre todos os métodos utilizados ($p < 0,01$), com exceção do Hara e Radin e Soxhlet, sendo o maior rendimento observado no método de Bligh e Dyer, com um valor de 52,49±3,37%, e o pior no método de Soxhlet (1,67±0,28%). Os métodos que utilizam o clorofórmio como solvente para a extração de lipídios foram os que apresentaram os melhores resultados, seguidos do método com diclorometano (Tabela 2).

Os maiores rendimentos foram obtidos com os métodos de Bligh e Dyer (1959) ($52,49 \pm 3,37\%$) e Folch, Less e Stanley (1957) ($16,06 \pm 1,91\%$), diferentes estatisticamente dos demais e entre si, os quais utilizam clorofórmio como solvente, porém o rendimento obtido com o primeiro foi mais de três vezes superior ao obtido com o último, já que o clorofórmio é muito polar, aumentando assim, a quantidade extraída. Outro fator que pode ter contribuído foi a utilização de água no método de Bligh e Dyer, já que em meio aquoso o processo de extração de lipídios é beneficiado pela maior intensidade de energia liberada na evaporação, pois a mesma enfraquece a parede celular das microalgas, liberando seu conteúdo intracelular (CECCHI, 2003).

Esses resultados são iguais aos verificados por Widjaja, Chien e Ju (2009), quando cultivaram a mesma espécie estudada nesse experimento e os lipídios foram extraídos também pelo método de Bligh e Dyer conduzido por ultrassom, onde o rendimento de óleo foi de 52,5%.

Ranjan, Patil e Moholkar (2010) observaram que o método de Bligh e Dyer conduzido por ultrassom resultou em uma extração de lipídios de cerca de 500% superior ao obtido pela aplicação do método de Soxhlet para a microalga *Scenedesmus* sp.

Gouveia e Oliveira (2009) cultivaram a microalga *C. vulgaris* no meio Vonshak (1986) e realizaram a extração de lipídios pelo método de Soxhlet. Os autores constataram um rendimento de óleo de 5,1%, superior ao encontrado nesse trabalho nos métodos de Hara e Radin e Soxhlet, mas não com relação ao método de Bligh e Dyer; Folch, Less e Stanley e Chen, Shen e Sheppard, com valores de $52,49 \pm 3,37$; $16,06 \pm 1,91$ e $10,86 \pm 1,71\%$, respectivamente.

Em comparação ao método de Folch, Less e Stanley, o método de Chen, Shen e Sheppard mostrou valores finais de rendimento de óleo bem moderados. No entanto, algumas variações ainda podem ser realizadas para melhorar o rendimento, como por exemplo, a modificação do tempo de sonicação.

Martin (1993); Luque-García e Castro (2003) afirmam que o rompimento celular através da sonicação faz com que o tempo de extração de lipídios seja reduzido, ocorrendo menor uso de solventes e maior penetração destes nos compostos celulares, otimizando a liberação do seu conteúdo intracelular. Porém, existe um elevado consumo de energia e dificuldades ao ser utilizado em larga escala.

Zheng *et al.* (2011) compararam nove métodos de extração de óleo de *C. vulgaris* cultivada em água salgada e avaliaram a recuperação de biomassa e rendimento de óleo visando a produção de biodiesel. Os autores obtiveram uma recuperação de 0,02% e, com

relação ao rendimento de óleo, a técnica de sonicação da biomassa apresentou um total de 15%, enquanto a moagem da biomassa com nitrogênio líquido apresentou o melhor rendimento (29%). Esses resultados são inferiores aos encontrados no presente trabalho com relação aos métodos de Bligh e Dyer (1959) e Folch, Less e Stanley (1957), mas superiores aos demais.

Prabakaran e Ravindran (2011) isolaram as microalgas *Chlorella* sp., *Nostoc* sp. e *Tolypothrix* sp. de um reservatório com o intuito de identificar o processo mais eficiente de rompimento celular, que incluíram autoclavagem, uso de microondas, sonicação e tratamento com solução de NaCl 10%. Os lipídios totais das três espécies foram extraídos com uma mistura de clorofórmio e metanol e a composição de ácidos graxos foi detectada por cromatografia gasosa (CG). Os autores verificaram que *Nostoc* sp. e *Tolypothrix* sp. apresentaram o maior teor de ácido oléico, 13,27 e 17,75 mg g de biomassa seca⁻¹, respectivamente, enquanto que a *Chlorella* sp. apresentou alto teor de ácido linoléico (17,61 mg g de biomassa seca⁻¹) quando as células foram rompidas pelo método de sonicação.

Halim *et al.* (2010) estudaram a extração de lipídios da microalga *Chlorococcum* sp. utilizando dióxido de carbono supercrítico, e verificaram que o rendimento máximo de lipídios foi baixo (7,1 mg g de biomassa seca⁻¹), sendo menor em condições de alta temperatura e baixa pressão. Quando compararam com o método de Soxhlet, utilizando o hexano como solvente, observaram que este foi significativamente menos eficiente do que a extração em questão.

3.3. Índice de acidez (IA)

A tabela 3 mostra o índice de acidez do óleo obtido da microalga *C. vulgaris* utilizando diferentes metodologias de extração.

De acordo com a tabela 3, as análises feitas para o índice de acidez variaram entre 0,3±0,01 a 0,7±0,02 mg KOH g⁻¹, não apresentando diferenças significativas entre si (p>0,01), mas indicando uma boa qualidade para a produção de biodiesel, pois apresentam uma reação completa na produção de óleo (KUSDIANA; SAKA, 2001).

Tabela 3 - Índice de acidez do óleo obtido da microalga *C. vulgaris* utilizando diferentes metodologias. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 1%.

Método	Índice de acidez (mg KOH g ⁻¹)
Bligh e Dyer	0,4±0,01 ^a
Folch, Less e Stanley	0,6±0,01 ^a
Chen, Shen e Sheppard	0,7±0,02 ^a
Hara e Radin	0,3±0,02 ^a
Soxhlet	0,3±0,02 ^a

4. CONCLUSÃO

Os métodos que utilizaram o clorofórmio como solvente apresentaram os melhores resultados, já que este é muito polar, bem como a presença de água demonstraram ser importantes fatores para aumentar a eficiência da extração. Os lipídios extraídos da microalga *Chlorella vulgaris* em todos os métodos utilizados apresentaram um baixo índice de acidez, sendo uma espécie em potencial para a produção de biodiesel.

5. REFERÊNCIAS

AOCS Official Method Ca 5a-40. Free fatty acids. In: Firestone, D. E. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign, IL: AOCS Press, 1997.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. rev. Campinas, SP: UNICAMP, 2003.

CHEN, I. S.; SHEN, C. S. J.; SHEPPARD, A. J. Comparasion of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 58, n. 5, p. 599-601, 1981.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHRISTIE, W. W. **Lipid analysis**. In: _____. Oxford: Pergamon Press, Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: general principles, 1982. cap.3, p.25-49.

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

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition. In: Richmond, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. [S.l.]: Blackwell, 2004. p. 97–115.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 160-186, mar. 2006.

HALIM, R. *et al.* Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 178-185, 2010.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420-423, 1978.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. Methyl esterification of free fatty acids of rapeseed oil as treated in supercritical methanol. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, Tokyo, v. 34, n. 3, p. 383–387, 2001.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. v. 1, 606 p.

LUQUE-GARCÍA, J.L.; CASTRO, M.D.L. Ultrasound: A powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.

MARTIN, P.D. Sonochemistry in industry. Progress and Prospects. **Chemistry Industry-London**, v. 1, p. 233–236, 1993.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 841–846, 2006.

PEREZ-GARCIA, O. *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A.D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 150-154, 2011.

QIN, J. **Bio-Hydrocarbons from algae**: impacts of temperature, light and salinity on algal growth. Barton, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 2005. 18 p.

RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, S. V. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 2979-2985, 2010.

SCOTT, S. A. *et al.* Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 277-286, 2010.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Polytechnisches Journal**, v. 232, p. 461–465, 1879.

TROBAJO, R.; COX, E.J.; QUINTANA, X.D. The effects of environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 79, n. 3-4, p. 433-445, nov. 2004.

VONSHAK, A. **CRC handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton: CRC Press, 1986. 528 p.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.C.; JU, Y.H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Taiwan**, v. 40, p. 13–20, 2009.

WIJFFELS, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 26-31, 2007.

ZHENG, H. *et al.* Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1215-1224, 2011.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA E RENDIMENTO DE ÓLEO DE DEZ MICROALGAS EM DUAS DIFERENTES SALINIDADES

RESUMO

As microalgas parecem ser as únicas fontes de lipídios que têm potencial para substituir completamente o diesel fóssil devido a inúmeros aspectos, onde níveis de óleo de 20 a 50% são bastante comuns. O objetivo desse trabalho foi avaliar a recuperação de biomassa e o rendimento de óleo de dez espécies de microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades (25 e 35). Foram realizadas culturas de *Tetraselmis* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp., *Tetraselmis chui*, *Dunaliella* sp., *Tetraselmis tetrathele*, *Chlorella vulgaris*, *Chaetoceros mulleri*, *Chaetoceros gracilis* e *Thalassiosira weissflogii* em meio Guillard f/2. Todos os cultivos partiram de um volume de 20 mL, sempre em volumes crescentes e finalizando em um recipiente de três litros, sendo aqui submetida a uma aeração constante através de bombas de diafragma com fluxo de ar de 2 L min⁻¹ e irradiância de 60 µE cm⁻² s⁻¹. Para separar as microalgas do meio de cultura foi utilizada a técnica de floculação química, através da adição de uma solução de NaOH 2N e a biomassa recuperada foi lavada e seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por um período de 24 horas, sendo o método Bligh e Dyer utilizado para extrair o óleo. Foi verificado que as microalgas *Chaetoceros mulleri*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis tetrathele* e *Chaetoceros gracilis* cultivadas na salinidade mais baixa (25), e *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis* sp., *Dunaliella* sp., *Tetraselmis tetrathele* e *Chlorella vulgaris* na salinidade mais elevada (35) são reportadas como as melhores espécies a serem exploradas em larga escala visando a produção de óleo, pois apresentaram valores acima de 20,00%. A microalga *C. gracilis* apresentou a melhor resposta no rendimento de óleo quando a salinidade foi reduzida, passando de 15,50 para 60,28%.

Palavras-chave: Biomassa. Lipídio. Microalga. Óleo.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são utilizadas na aquicultura como alimento para os diferentes organismos cultivados e têm grande importância na produção de oxigênio, no consumo de dióxido de carbono e de compostos nitrogenados (DERNER, 1996; LOURENÇO, 2006; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). São utilizadas como bioindicadores, informando sobre o nível de eutrofização dos corpos d'água (TROBAJO; COX; QUINTANA, 2004).

As espécies mais cultivadas pertencem, geralmente, às classes Bacillariophyceae (*Chaetoceros* spp. Ehrenberg, *Thalassiosira* spp. Cleve, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin e *Skeletonema costatum* Greville), Haptophyceae (*Isochrysis* spp. Parke), Cryptophyceae (*Rhodomonas* spp. Karsten), Chrysophyceae (*Monochrysis* spp. Skuja), Prasinophyceae (*Tetraselmis* spp. Stein), Cyanophyceae (*Arthrospira* spp. e *Spirulina* spp.) e Chlorophyceae (*Dunaliella* spp. e *Scenedesmus* spp. Bourrelly) (SILVA *et al.*, 2003; MULLER-FEUGA, 2004).

As microalgas são os principais produtores primários de matéria orgânica nos ambientes aquáticos. Através da fotossíntese, utilizam a energia luminosa, absorvem nutrientes e fixam o dióxido de carbono, transformando esta energia em moléculas orgânicas. A reserva energética das algas consiste em compostos de alto peso molecular, como os α -1,4 glucanos e β -1,3 glucanos e outros de baixo peso molecular, como os glicosídeos e polióis. Nesses microrganismos, a reserva lipídica tem como função básica a síntese de membranas lipoprotéicas (LEE; VALKIRS; SELIGMAN, 1989), sendo também utilizada para flutuação nas mesmas.

São reconhecidas como uma fonte alternativa promissora para a produção de biodiesel. Várias espécies podem ser induzidas a produzir mais lipídios e ácidos graxos específicos com manipulações simples das propriedades físicas e químicas de seus meios de cultura. Ao manipular o conteúdo de ácidos graxos, as microalgas representam uma fonte significativa de lipídios e ácidos graxos para diversas aplicações industriais (BEHRENS; KYLE, 1996).

A viabilidade da produção de éster metil ou biodiesel do óleo a partir da biomassa de microalgas já foi demonstrado por Belarbi, Grima e Chisti (2000).

Algumas microalgas podem acumular quantidades significativas de lipídios, podendo chegar a até 50% do seu peso seco em certas espécies (SHEEHAN *et al.*, 1998; CHISTI, 2007; MITCHELL, 2007). Muitas delas podem crescer em água salobra ou salgada,

evitando assim a demanda por água potável, um recurso limitado em muitas partes do mundo (ABREU, 2009; UMDU; TUNCER; SEKER, 2009). Várias espécies crescem muito rápido, dobrando sua biomassa em apenas 24 horas.

A bioprospecção de espécies é muito importante para selecionar as melhores cepas que podem produzir maior quantidade de produtos metabólicos desejáveis. Vários estudos têm avaliado a utilização de diversas microalgas para diversas finalidades (FRANCISCO *et al.*, 2010; YOO *et al.*, 2010; MUTANDA *et al.*, 2011), mas muitas pesquisas ainda devem ser realizadas, dado o elevado número de espécies existentes.

O acúmulo de lipídios pode ser atribuído ao consumo de açúcares, em uma taxa superior à de geração celular, o que promoveria a conversão de açúcar em excesso para lipídios (CHEN; JOHNS, 1991), e isso está relacionado a diversos fatores, como temperatura, pH, disponibilidade de micronutrientes e salinidade.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a recuperação de biomassa e o rendimento de óleo de dez espécies de microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades, após floculação química.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo das microalgas

Inicialmente, as microalgas *Tetraselmis sp.*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis sp.*, *Tetraselmis chui*, *Dunaliella sp.*, *Tetraselmis tetrathele*, *Chlorella vulgaris*, *Chaetoceros mulleri*, *Chaetoceros gracilis* e *Thalassiosira weissflogii* foram cultivadas para avaliar a influência de duas diferentes salinidades do meio de cultura (35 e 25) na recuperação de biomassa e rendimento de lipídios.

Todas as cepas utilizadas nesse estudo foram obtidas no cepário do Laboratório do Centro de Tecnologia em Aquicultura (CTA), pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, onde as mesmas são mantidas a 22 ± 2 °C, em tubos de ensaio, com iluminação artificial e fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro.

O meio de cultivo usado para a manutenção dos inóculos e condução dos experimentos foi o Guillard f/2 (GUILLARD, 1975).

Os cultivos partiram de um volume de 20 mL em um erlenmeyer de 250 mL, no qual, a cada dois dias, foi acrescentado aproximadamente o mesmo volume de meio de cultura autoclavado. Em seguida, dependendo da espécie, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para outro, com capacidade para um litro. Finalmente, 350 mL de cada cultura foram transferidos para um recipiente de três litros de volume útil. Neste momento, o volume foi completado para três litros e a cultura passou a ser submetida a uma aeração constante através de bombas de diafragma com fluxo de ar de 2 L min^{-1} . Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

A irradiância, fornecida constantemente por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, foi de $60 \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ determinada através de um luxímetro digital. A temperatura da sala de cultivo ficou em torno de $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, com exceção das microalgas *Isochrysis* sp., *Thalassiosira weissflogii* e *Chlorella vulgaris*, as quais foram cultivadas no próprio cepário, com temperatura mantida em $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Os cultivos foram realizados com volume constante, ou seja, em batelada (LOURENÇO, 2006). Os meios de cultivo e todas as vidrarias utilizadas nas culturas foram previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Vale salientar que os tempos de cultivo, partindo do volume da cultura em três litros foram variados, pois este parâmetro depende do crescimento algal de cada espécie, sendo sete dias para as microalgas *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis* sp., *Tetraselmis chui* e *Tetraselmis tetrathele*, nove dias para *Chaetoceros gracilis* e *Chaetoceros mulleri* e dez dias para *Isochrysis* sp. e *Thalassiosira weissflogii*.

2.2. Floculação das culturas

Para separar as microalgas do meio de cultivo foi utilizada a técnica de floculação química, através da adição de uma solução de NaOH 2N, conforme descrito no capítulo anterior. O mesmo ocorreu para a recuperação da biomassa das microalgas.

2.3. Extração do óleo

Para a extração do óleo e posterior determinação do seu rendimento a partir da biomassa seca das microalgas estudadas, foi utilizado o método de Bligh e Dyer (1959), conforme descrito no capítulo anterior.

2.4. Análises estatísticas

Os resultados referentes à quantidade de NaOH utilizados para a floculação, recuperação da biomassa e rendimento de óleo das dez microalgas cultivadas em ambas as salinidades foram submetidos a um teste *t* para as médias com o intuito de verificar a existência de diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% utilizando o programa Microcal Origin versão 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Recuperação da biomassa das microalgas

As concentrações de NaOH 2N necessárias para a floculação das dez espécies de microalgas cultivadas na salinidade de 35 variaram de $0,67 \pm 0,12\%$ (mL de NaOH 2N por 100 mL de cultivo) para a *Thalassiosira weissflogii* a $6,23 \pm 0,12\%$ para *Chaetoceros gracilis*. Quando os cultivos foram realizados na salinidade de 25, os valores variaram de $1,07 \pm 0,08\%$ para *Nannochloropsis oculata* a $7,00 \pm 0,16\%$ para *Chaetoceros gracilis*. De um modo geral, as concentrações de NaOH 2N foram mais elevadas quando as microalgas foram cultivadas na salinidade mais baixa, com exceção da *Tetraselmis chui* (Tabela 1).

Foi observado também que em todas as espécies estudadas ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com relação às concentrações de NaOH 2N

necessárias para a floculação em ambas as salinidades, exceto para a *Nannochloropsis oculata* e a *Tetraselmis tetrathele* (Tabela 1).

Tabela 1 - Recuperação de biomassa (%) das microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades, obtida por floculação química com NaOH 2 N. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 5%.

Microalgas	Salinidade 35		Salinidade 25	
	NaOH 2 N (%)	Recuperação da biomassa (%)	NaOH 2 N (%)	Recuperação da biomassa (%)
<i>Tetraselmis</i> sp.	2,53±0,10 ^a	0,002±0,01 ^a	3,50±0,16 ^b	0,024±0,04 ^b
<i>Chaetoceros mulleri</i>	1,10±0,12 ^a	0,011±0,03 ^a	2,88±0,12 ^b	0,024±0,03 ^b
<i>Nannochloropsis oculata</i>	0,83±0,18 ^a	0,024±0,03 ^a	1,07±0,08 ^a	0,017±0,02 ^b
<i>Isochrysis</i> sp.	1,00±0,19 ^a	0,007±0,02 ^a	3,00±0,20 ^b	0,027±0,01 ^b
<i>Tetraselmis chui</i>	4,00±0,10 ^a	0,018±0,05 ^a	1,25±0,16 ^b	0,007±0,01 ^b
<i>Dunaliella</i> sp.	0,83±0,09 ^a	0,009±0,04 ^a	3,46±0,12 ^b	0,021±0,03 ^b
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	1,00±0,17 ^a	0,022±0,02 ^a	1,25±0,07 ^a	0,031±0,04 ^b
<i>Chaetoceros gracilis</i>	6,23±0,12 ^a	0,031±0,02 ^a	7,00±0,16 ^b	0,033±0,05 ^a
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,67±0,12 ^a	0,005±0,06 ^a	2,00±0,15 ^b	0,015±0,02 ^b
<i>Chlorella vulgaris</i>	2,33±0,14 ^a	0,050±0,04 ^a	6,00±0,12 ^b	0,025±0,02 ^b

Com relação à recuperação de biomassa, quando os cultivos foram realizados na salinidade de 25, de uma maneira geral, os valores aumentaram quando comparados à salinidade mais elevada, e foram duplicados no caso das espécies *Chaetoceros mulleri* e *Dunaliella* sp., três vezes superior para a *Thalassiosira weissflogii* e quatro vezes para a microalga *Isochrysis* sp., chegando a ser cerca de dez vezes na microalga *Tetraselmis* sp.

Por outro lado, para as espécies *T. tetrathele* e *C. gracilis* a recuperação da biomassa praticamente não foi alterada com a redução da salinidade dos cultivos, sendo esta última a única espécie onde não foi verificado diferença estatística ($p > 0,05$) em ambas as salinidades verificadas. Já para as espécies *C. vulgaris*, *N. oculata* e *T. chui* os valores foram reduzidos em 0,5; 1,4 e 2,6 vezes, respectivamente (Tabela 1).

3.2. Produtividade de recuperação da biomassa das microalgas

A tabela 2 mostra a produtividade de recuperação da biomassa das microalgas cultivadas nas duas diferentes salinidades testadas.

Tabela 2 - Produtividade de recuperação da biomassa (kg/m³/dia) das microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 5%.

Microalgas	Produtividade de recuperação da biomassa (kg/m ³ /dia)	
	Salinidade 35	Salinidade 25
<i>Tetraselmis</i> sp.	0,0029±0,0014 ^a	0,0343±0,0057 ^b
<i>Chaetoceros mulleri</i>	0,0122±0,003 ^a	0,0267±0,0033 ^b
<i>Nannochloropsis oculata</i>	0,0343±0,0043 ^a	0,0243±0,0029 ^b
<i>Isochrysis</i> sp.	0,0070±0,0020 ^a	0,0270±0,0010 ^b
<i>Tetraselmis chui</i>	0,0257±0,0071 ^a	0,0100±0,0014 ^b
<i>Dunaliella</i> sp.	0,0129±0,0057 ^a	0,0300±0,0043 ^b
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	0,0314±0,0029 ^a	0,0443±0,0057 ^b
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,0344±0,0022 ^a	0,0367±0,0056 ^a
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0,0050±0,0010 ^a	0,0150±0,0020 ^b
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,0714±0,0057 ^a	0,0357±0,0029 ^b

Analisando a tabela 2, foi observado que ao se reduzir a salinidade, de uma maneira geral, a produtividade de recuperação da biomassa aumentou. Por outro lado, para a microalga *C. gracilis* a produtividade de recuperação da biomassa praticamente não foi alterada com a redução da salinidade nos cultivos, não sendo verificado diferença estatística entre a mesma ($p > 0,05$).

A maior produtividade de recuperação da biomassa ocorreu para a microalga *C. vulgaris*, com um total de 0,0714±0,0057 kg/m³/dia quando cultivada na salinidade 35.

3.3. Influência da salinidade no rendimento de óleo das microalgas

A tabela 3 mostra os rendimentos de óleo das dez espécies cultivadas em ambas as salinidades.

Como podemos observar, na salinidade 35, foi verificado o menor rendimento de óleo na microalga *Tetraselmis* sp. (1,00±0,22%). Nessas condições, as espécies *N. oculata*, *Isochrysis* sp., *Dunaliella* sp., *T. tetrathele* e *C. vulgaris* apresentaram rendimentos acima de 20,00%. Vale salientar que o maior rendimento foi apresentado pela *C. vulgaris* (52,49±0,15%) (Tabela 3).

Na salinidade 25, o menor rendimento de óleo foi obtido da espécie *Isochrysis* sp. (6,50±0,19%). Nessas condições, *C. mulleri*, *N. oculata*, *T. chui*, *T. tetrathele* e *C. gracilis* apresentaram valores acima de 20,00%. Vale salientar que o maior rendimento foi

apresentado por essa última ($60,28 \pm 0,18\%$), bem superior ao encontrado na salinidade mais elevada ($15,50 \pm 0,22\%$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Rendimentos de óleo (%) a partir da biomassa das dez microalgas cultivadas em duas diferentes salinidades utilizando o método Bligh e Dyer (1959) para a extração. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ao nível de 5%.

Microalgas	Rendimento de óleo (%)	
	Salinidade 35	Salinidade 25
<i>Tetraselmis</i> sp.	$1,00 \pm 0,22^a$	$8,00 \pm 0,15^b$
<i>Chaetoceros mulleri</i>	$11,67 \pm 0,12^a$	$25,25 \pm 0,24^b$
<i>Nannochloropsis oculata</i>	$23,00 \pm 0,16^a$	$22,75 \pm 0,20^a$
<i>Isochrysis</i> sp.	$21,25 \pm 0,13^a$	$6,50 \pm 0,19^b$
<i>Tetraselmis chui</i>	$17,25 \pm 0,10^a$	$23,50 \pm 0,28^b$
<i>Dunaliella</i> sp.	$30,12 \pm 0,18^a$	$12,00 \pm 0,13^b$
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	$29,18 \pm 0,19^a$	$30,25 \pm 0,16^b$
<i>Chaetoceros gracilis</i>	$15,50 \pm 0,22^a$	$60,28 \pm 0,18^b$
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	$6,25 \pm 0,11^a$	$13,21 \pm 0,14^b$
<i>Chlorella vulgaris</i>	$52,49 \pm 0,15^a$	$16,60 \pm 0,20^b$

De um modo geral, os cultivos realizados na salinidade mais baixa (25), apresentaram rendimentos de óleo mais elevados quando comparados com aqueles em salinidade mais elevada, observado assim, diferença estatisticamente significava ($p < 0,05$) em todas as espécies estudadas, com exceção apenas para a *N. oculata* (Tabela 3).

Para as microalgas *N. oculata*, *Isochrysis* sp. e *Dunaliella* sp. os rendimentos de óleo diminuíram quando foi reduzido a salinidade, sendo mais elevado para estas duas últimas.

Com relação à microalga *Isochrysis* sp., Chisti (2007), encontrou um rendimento de óleo na faixa de 25 a 33%, superior ao encontrado nesse trabalho quando cultivada na salinidade 35 ($21,25 \pm 0,13\%$). Porém, quando cultivamos essa espécie na salinidade 25, o rendimento de óleo diminuiu muito ($6,50 \pm 0,19\%$), bem inferior ao apresentado pelo autor.

O rendimento de óleo obtido nesse estudo para a *C. vulgaris*, *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp. e *Tetraselmis* sp. são similares aos reportados por Mata, Martins e Caetano (2010).

Nessas condições estudadas, as microalgas *C. mulleri*, *N. oculata*, *T. chui*, *T. tetrathele* e *C. gracilis* cultivadas na salinidade mais baixa (25), enquanto que *N. oculata*, *Isochrysis* sp., *Dunaliella* sp., *T. tetrathele* e *C. vulgaris* cultivadas na salinidade mais elevada (35) são reportadas como as melhores espécies a serem cultivadas em larga escala visando a produção de óleo, pois apresentaram rendimentos acima de 20,00%.

Ao contrário das citadas acima, as microalgas *Tetraselmis* sp. e *T. weissflogii* não são consideradas aconselháveis para a produção de óleo em larga escala devido ao baixo rendimento em ambas as salinidades estudadas.

Takagi, Karseno e Yoshida (2006) estudaram o efeito do estresse salino sobre o acúmulo de lipídios em microalgas do gênero *Dunaliella* e verificaram que a concentração de NaCl de 1,5 M causou inibição do crescimento celular. O aumento da concentração de NaCl de 0,5 (semelhante a água do mar) a 1,0 M resultou em um maior teor de lipídios (67%) em comparação com 60%, na concentração de 0,5 M.

Yeesang e Cheirsilp (2011) cultivaram quatro microalgas verdes do gênero *Botryococcus* variando a salinidade e verificaram que o crescimento e o acúmulo de lipídios por estes microrganismos são afetados por essa variável. Sob excesso de nitrogênio, todas as cepas sobreviveram a alta salinidade, mas o crescimento foi variado dependendo da espécie. O conteúdo lipídico de três delas diminuiu quando a salinidade foi aumentada.

A microalga verde de água doce *Botryococcus braunii* foi cultivada por Qin (2005) variando a salinidade visando a produção de biodiesel. O autor verificou que o teor de lipídios diminuiu acentuadamente quando a salinidade foi mais elevada, sendo similar entre 0,35 e 0,7 M de NaCl. Em ausência de sal foi observado o maior teor de lipídios, mas não foi diferente estatisticamente em 0,15 M. Contrariamente, Ben-Amotz, Tomabene e Thomas (1985) verificaram que o conteúdo lipídico dessa mesma espécie foi maior em 0,5 M de sal quando comparado com o cultivo em ausência de sal.

4. CONCLUSÃO

Com a realização desses experimentos, foi possível concluir que a salinidade do meio de cultivo teve grande influência sobre a recuperação da biomassa e rendimento de óleo das microalgas estudadas. Também foi constatado que cada espécie respondeu diretamente ao aumento ou diminuição da salinidade nas culturas. As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chaetoceros gracilis* foram as mais indicadas para serem cultivadas em larga escala, pois apresentaram rendimentos de óleo bem elevados.

5. REFERÊNCIAS

ABREU, P. C. V. Microalgas e biocombustíveis: entre o sonho e a realidade. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 115, p. 34–37, 2009.

BELARBI, E. H.; GRIMA, M. E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scalable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 516–529, 2000.

BEN-AMOTZ, T.G.; TOMABENE; THOMAS, W.H. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids, **Journal of Phycology**, v. 21, n. 1, p. 72-81, 1985.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BEHRENS, P. W.; KYLE, D. J. Microalgae as a source of fatty acids. **Food Lipids**, v. 3, p. 259-272, 1996.

CHEN, F.; JOHNS, M. R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 3, p. 203–209, 1991.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

DERNER, R. B. Cultivo de microalgas. In: **Curso Internacional sobre Produção de Pós-larvas de Camarão Marinho, Apostila do Curso**. Florianópolis: UFSC, 1996. p. 64-75.

FRANCISCO, E. C. *et al.* Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395-403, 2010.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.). **Culture of marine invertebrate animal**. New York: Plenum Publishing, 1975. p. 29-60.

LEE, R. F.; VALKIRS, A. O.; SELIGMAN, P. F. Importance of microalgae in the biodegradation of tributyltin in estuarine waters. **Environmental Science Technology**, v. 23, p. 1515-1518, 1989.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006.

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

MITCHELL, B. G. **Are microalgae a viable option for biofuel?** San Diego, 2007. Scripps Institution of Oceanography University of California.

MULLER-FEUGA, A. Microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture**: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 352–364.

MUTANDA, T. *et al.* Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 57-70, 2011.

PEREZ-GARCIA, O. *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

QIN, J. **Bio - Hydrocarbons from Algae: impacts of temperature, light and salinity on algal growth**. Rural Industries Research and Development Corporation, February, 2005. 18p.

SHEEHAN, J. *et al.* **A look back at the US department of energy's aquatic species program**: biodiesel from algae. Washington: NREL, 1998.

SILVA, F. C. *et al.* Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, C. R. *et al.* (Org.). **Aquicultura**: experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa, 2003. p. 93-120.

TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 223–226, 2006.

TROBAJO, R.; COX, E. J.; QUINTANA, X. D. The effects of environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 79, n. 3-4, p. 433-445, 2004.

UMDU, E. S.; TUNCER, M.; SEKER, E. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al_2CO_3 supported CaO and MgO catalysts. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2828–2831, 2009.

YEESANG, C.; CHEIRSILP, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3034-3040, 2011.

YOO, C. *et al.* Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S71-S74, 2010.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DO TEOR DE NITRATO DE SÓDIO NA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA E RENDIMENTO DE ÓLEO DE QUATRO MICROALGAS

RESUMO

A escolha do meio de cultivo é extremamente importante para a produção em massa das microalgas. Sua utilização pode afetar a taxa de crescimento e a composição bioquímica das células. O objetivo desse trabalho foi avaliar a recuperação de biomassa e o rendimento de óleo de quatro espécies de microalgas cultivadas com diferentes teores de nitrato de sódio no meio de cultivo. Foram cultivadas as microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis chui* e *Tetraselmis tetrahele* em cinco tratamentos com três repetições cada. As quantidades de nitrato de sódio foram 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ (T15; T30; T45; T60 e T75, respectivamente), mantendo constantes as quantidades dos outros nutrientes do meio Guillard f/2. Os inóculos iniciais partiram de um volume de 20 mL em um erlenmeyer de 250 mL com 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, sendo este volume aumentado gradativamente com a intensificação do cultivo. Após isso, o mesmo foi inoculado nos meios com diferentes quantidades de nitrato de sódio. Foi constatado que o consumo de nitrato por todas as microalgas foi bastante semelhante e foi aumentando na medida em que as quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo foram elevadas. O aumento das quantidades desse nutriente resultou em um incremento na recuperação da biomassa das microalgas *N. oculata* e *C. vulgaris*, enquanto os rendimentos obtidos das espécies *T. tetrahele* e *T. chui* praticamente não foram alterados. Por outro lado, com a redução das quantidades de nitrato de sódio, os rendimentos de óleo aumentaram para todas as microalgas, principalmente para a *N. oculata* e *C. vulgaris*. Assim, foi possível aumentar o rendimento de óleo pelas microalgas reduzindo o teor de nitrato de sódio nos meios de cultivo.

Palavras-chave: Biomassa. Microalga. Nitrato. Rendimento.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores físicos e químicos que afetam o crescimento das microalgas os principais são a luz, temperatura, salinidade, disponibilidade e qualidade dos nutrientes (RICHMOND, 2004).

Lourenço (2006) relata que a interação das microalgas com o meio de cultura e com o próprio ambiente físico do cultivo resulta em mudanças expressivas na densidade das células, que tendem a aumentar numericamente em grandes proporções a partir da inoculação. Por outro lado, as concentrações dos nutrientes dissolvidos no meio de cultivo tendem a diminuir com sua multiplicação, podendo chegar à exaustão completa, dependendo do tempo de desenvolvimento da cultura, causando estresse nas mesmas.

A escolha do meio de cultivo é extremamente importante para a produção em massa de microalgas. Sua utilização inadequada pode afetar a taxa de crescimento e a composição bioquímica das células (SÁNCHEZ; MARTINEZ; ESPINOLA, 2000). Para cada espécie de microalga, a produtividade e a composição bioquímica das células dependem fortemente do tipo de cultivo e do perfil de nutrientes do meio (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011).

De acordo com Lourenço (2006), a escolha do meio de cultivo não deve levar em conta apenas os custos operacionais envolvidos, pois muitas vezes meios de culturas de baixo custo podem ser deficientes em alguns componentes e não permitem a máxima produção da biomassa algal.

A taxa de crescimento e a produção de óleo também estão relacionadas diretamente com a concentração de nutrientes presentes no meio de cultivo das microalgas. O nitrogênio tem um papel importante no controle da produtividade desses organismos e existe uma determinada concentração de nitrogênio em que a biomassa e a produção de lipídios podem ser maximizadas (De La HOZ *et al.*, 2011). Dragone *et al.* (2011) mencionam que a limitação dos nutrientes do meio de cultivo faz com que o teor de amido se eleve, podendo tornar viável a produção de bioetanol.

Wijffels (2007) comenta que a produção de biocombustível a partir de microalgas vai depender da taxa de crescimento da espécie cultivada e do teor de óleo presente na mesma. Microalgas com produção elevada de lipídios são as mais desejáveis para a obtenção do biodiesel. Dependendo da espécie, as microalgas produzem diferentes tipos de lipídios, hidrocarbonetos e outros óleos complexos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a recuperação de biomassa e o rendimento de óleo de quatro espécies de microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo das microalgas

Para este estudo foram cultivadas as microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis chui* e *Tetraselmis tetrathele*, pois apresentaram rendimentos de óleo superiores a 20% no experimento anterior (Capítulo 2).

Todas as cepas utilizadas nesse estudo foram obtidas no cepário do Laboratório do Centro de Tecnologia em Aquicultura (CTA), pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, onde são mantidas a 22 ± 2 °C, em tubos de ensaio, com iluminação artificial e fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro. O meio de cultivo usado para a manutenção dos inóculos e condução dos experimentos foi o Guillard f/2 (GUILLARD, 1975).

Cada microalga foi cultivada, em triplicata, com cinco diferentes quantidades de nitrato de sódio, em três repetições cada. Foram utilizadas as quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L^{-1} (T15; T30; T45; T60 e T75, respectivamente) desse nutriente nos meios de cultivo, mantendo constantes as quantidades de fosfato monobásico de sódio, silicato de sódio, vitaminas e metais traços. Vale salientar que a quantidade de nitrato de sódio normalmente utilizada no meio de cultivo Guillard f/2 padrão é de 75 mg L^{-1} . Os meios de cultivo foram preparados com água do mar previamente autoclavada a 121 °C durante 15 minutos. A salinidade nos cultivos foi 25.

A cultura das microalgas partiu de um volume de 20 mL em um erlenmeyer de 250 mL, no qual, a cada dois dias, foi acrescentado aproximadamente o mesmo volume de meio de cultivo autoclavado. Nesse momento inicial, todas as microalgas foram cultivadas com 75 mg L^{-1} de nitrato de sódio. Em seguida, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para outro, com capacidade para um litro. Finalmente, 300 mL de cada cultura foram transferidos para um recipiente de três litros de volume útil. Esse volume foi completado para os três litros

e a cultura passou a ser submetida a uma aeração constante fornecida por bombas de diafragma com fluxo de ar de 2 L min^{-1} .

A irradiância, fornecida constantemente por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, foi de $60 \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ determinada através de um luxímetro digital. A temperatura da sala de cultivo ficou em torno de $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Os cultivos foram realizados com volume constante, ou seja, em batelada. Toda a vidraria utilizada nas culturas também foi previamente esterilizada em autoclave por 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foi determinada a correlação entre a densidade celular (cels. mL^{-1}) em câmara de Neubauer e a densidade óptica ($\text{DO}_{680 \text{ nm}}$) para cada uma das quatro espécies cultivadas. Quando foi observado um grande desenvolvimento da cultura, através da elevada $\text{DO}_{680 \text{ nm}}$, a mesma foi utilizada como inóculo dos meios de cultivo com diferentes quantidades de nitrato de sódio.

Diariamente foi determinada a $\text{DO}_{680 \text{ nm}}$ das culturas com o intuito de acompanhar a multiplicação celular de cada espécie em cada tratamento. Além disso, no início e ao final dos cultivos também foram determinadas as concentrações reais de nitrato nos meios de cultivo, utilizando o protocolo do espectrofotômetro de leitura direta HACH modelo DR 2000.

2.2. Flocculação das culturas

Para separar as microalgas do meio de cultivo foi utilizada a técnica de flocculação química, através da adição de uma solução de NaOH 2N, conforme descrito no capítulo anterior. O mesmo ocorreu para a recuperação da biomassa da microalga.

2.3. Extração do óleo

A determinação do teor de lipídios foi realizada pelo método de Bligh e Dyer (1959) modificado. Para isso, foram adicionados à biomassa seca da microalga (5,0 g), em triplicata, em um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. Em seguida, a mistura foi sonicada, durante 10 minutos, utilizando um desruptor de

células ultrasônico com frequência de 40 kHz e potência de 80 W. Posteriormente, foram adicionados mais 12,5 mL de clorofórmio, 12,5 mL de água e realizada uma nova sonicação por mais 5 minutos. Finalmente, a parte sólida da mistura foi filtrada a vácuo e seca em estufa com circulação de ar por um período de 24 h a 60 °C.

2.4. Análises estatísticas

Os valores referentes às concentrações finais de nitrato, recuperação da biomassa e rendimento de óleo das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e, no caso de diferença significativa, submetidos ao teste *t* para médias ao nível de 5% utilizando o programa Microcal Origin versão 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Correlação entre a densidade celular e a densidade óptica

Foi observada uma forte correlação linear positiva entre a densidade celular (cels. mL⁻¹) e a DO_{680 nm} das culturas das microalgas *T. tetrathele*, *T. chui*, *N. oculata* e *C. vulgaris* (Figuras 1 a 4) com coeficientes de determinação R² superiores a 0,9. Desta forma, foi possível a obtenção das equações de regressão linear entre estes dois parâmetros para cada microalga cultivada.

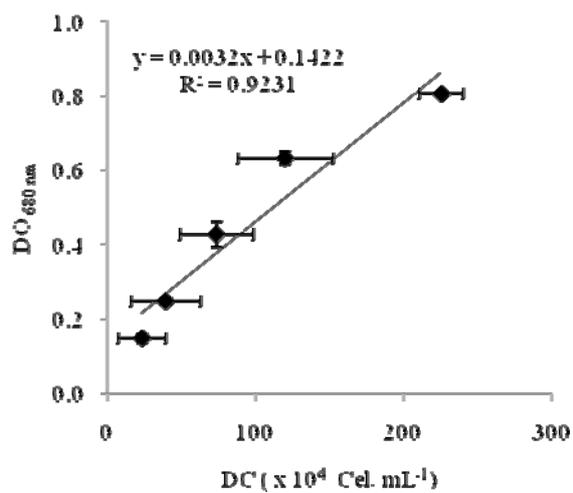


Figura 1 - Correlação entre a densidade celular (cels. mL⁻¹) e a densidade óptica (DO_{680 nm}) para a microalga *T. tetrahele*.

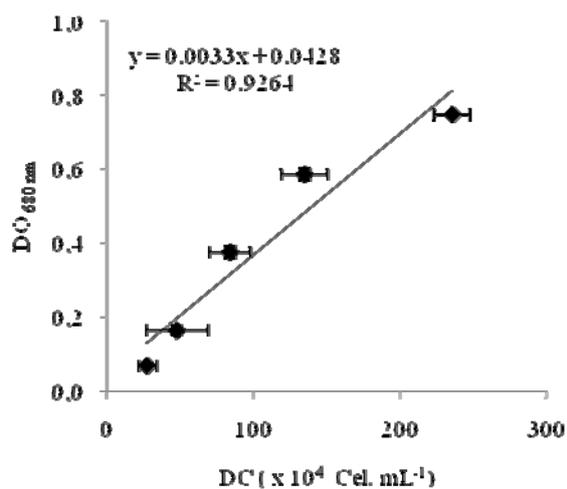


Figura 2 - Correlação entre a densidade celular (cels. mL⁻¹) e a densidade óptica (DO_{680 nm}) para a microalga *T. chui*.

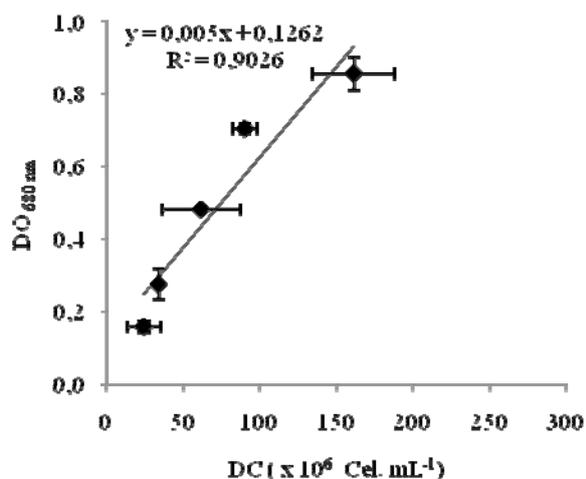


Figura 3 - Correlação entre a densidade celular (cels. mL $^{-1}$) e a densidade óptica (DO 680 nm) para a microalga *N. oculata*.

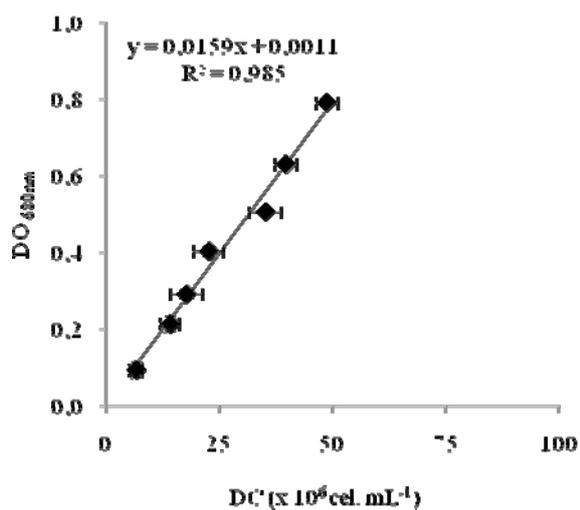


Figura 4 - Correlação entre a densidade celular (cels. mL $^{-1}$) e a densidade óptica (DO 680 nm) para a microalga *C. vulgaris*.

3.2. Desempenho das culturas

A partir das equações de regressão lineares, previamente estabelecidas, foram traçadas as curvas de crescimento (Figuras 5 a 8) e obtidas as densidades celulares iniciais (Tabela 1) e finais (Tabela 2) das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.

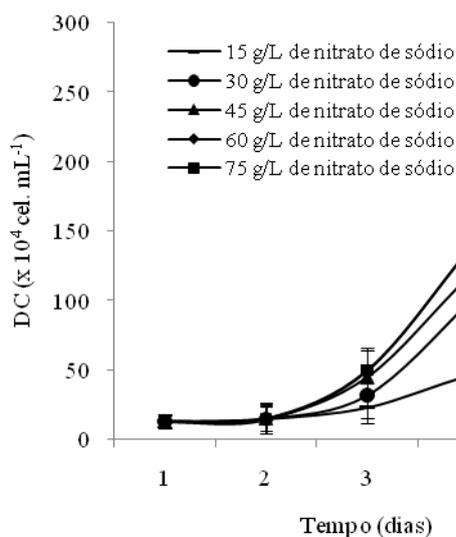


Figura 5 - Curvas de crescimento da microalga *T. tetrahele* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio.

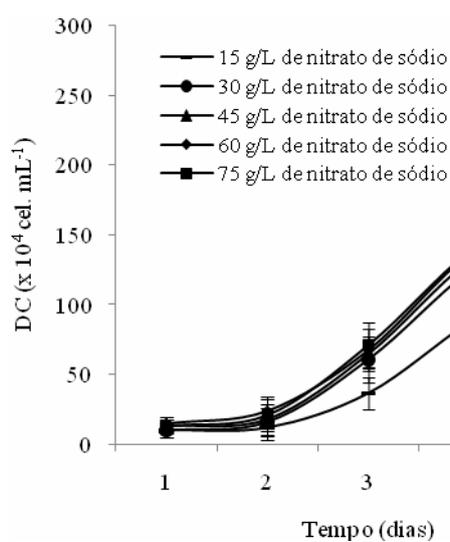


Figura 6 - Curvas de crescimento da microalga *T. chui* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo, nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio.

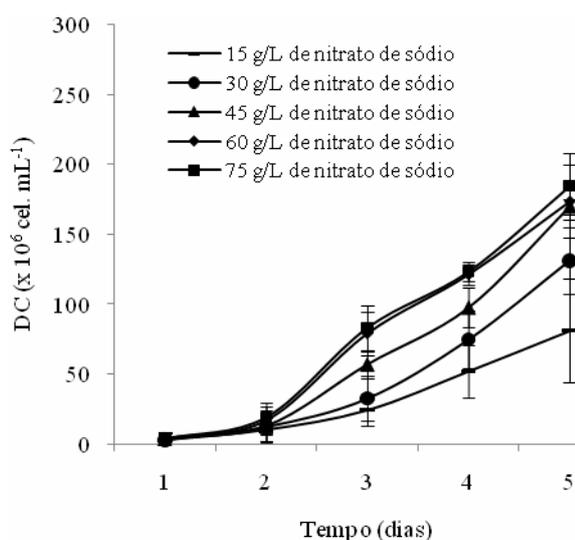


Figura 7 - Curvas de crescimento da microalga *N. oculata* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo, nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio.

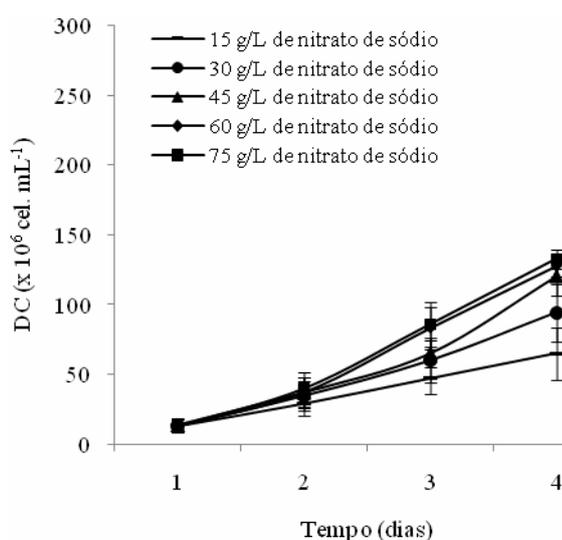


Figura 8 - Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris* expressas em termos de densidade celular (cels. mL⁻¹) por dia de cultivo nas quantidades de 15; 30; 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio.

A tabela 2 sumariza os resultados da análise estatística entre as densidades celulares finais dos cultivos, onde o desempenho das culturas foi avaliado para cada microalga nas diferentes quantidades de nitrato de sódio e para cada quantidade desse nutriente nas quatro microalgas.

Tabela 1 - Densidades celulares (cels. mL⁻¹) iniciais das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.

Microalgas	cels. mL ⁻¹ x 10 ⁴ para <i>T. tetrathele</i> e <i>T. chui</i> e cels. mL ⁻¹ x 10 ⁶ para <i>N. oculata</i> e <i>C. vulgaris</i>				
	T15	T30	T45	T60	T75
<i>T. tetrathele</i>	12,88±2,24	13,19±1,77	12,88±1,58	12,88±2,58	12,56±2,04
<i>T. chui</i>	9,76±1,71	9,76±1,20	12,79±2,03	14,61±1,82	12,79±2,40
<i>N. oculata</i>	2,84±0,42	3,04±0,31	3,64±0,27	3,64±0,29	3,44±0,40
<i>C. vulgaris</i>	13,11±1,11	12,99±1,10	13,61±1,62	13,24±0,98	13,11±1,33

Tabela 2 - Densidades celulares (cels. mL⁻¹) finais das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.

Microalgas	cels. mL ⁻¹ x 10 ⁴ para <i>T. tetrathele</i> e <i>T. chui</i> e cels. mL ⁻¹ x 10 ⁶ para <i>N. oculata</i> e <i>C. vulgaris</i>				
	T15	T30	T45	T60	T75
<i>T. tetrathele</i>	41,19±7,21 ^{a,A}	60,25±7,20 ^{b,A}	174,00±9,86 ^{c,A}	179,63±11,33 ^{c,A}	219,94±8,23 ^{d,A}
<i>T. chui</i>	134,61±9,45 ^{a,B}	169,45±10,12 ^{b,B}	171,58±10,85 ^{b,A}	175,82±8,43 ^{b,A}	185,21±9,71 ^{b,B}
<i>N. oculata</i>	80,96±12,54 ^{a,C}	130,96±9,95 ^{b,C}	169,56±9,67 ^{c,A}	173,36±11,74 ^{c,A}	202,17±8,44 ^{d,B}
<i>C. vulgaris</i>	64,99±8,88 ^{a,C}	94,24±11,45 ^{b,D}	120,36±11,80 ^{c,B}	136,37±7,59 ^{d,B}	138,50±9,83 ^{d,C}

Letras minúsculas diferentes nas linhas mostram diferenças significativas entre as densidades celulares finais de cada microalga nas diferentes quantidades de nitrato utilizadas;

Letras maiúsculas diferentes nas colunas mostram diferenças significativas entre as densidades celulares finais das diferentes microalgas em cada quantidade de nitrato utilizada.

Como podemos observar, os valores referentes às densidades celulares ao final dos cultivos foram menores quando foi utilizada a menor quantidade de nitrato de sódio (15 mg L⁻¹), com um total de 134,61±9,45 x 10⁴ cels. mL⁻¹; 80,96±12,54 x 10⁶ cels. mL⁻¹; 64,99±8,88 x 10⁶ cels. mL⁻¹ e 41,19±7,21 x 10⁴ cels. mL⁻¹, para *T. chui*, *N. oculata*, *C. vulgaris* e *T. tetrathele*, respectivamente. É importante ressaltar que houve diferença significativa (p<0,05) entre as densidades celulares finais das espécies cultivadas nessa quantidade de nitrato, com exceção de *N. oculata* e *C. vulgaris*.

O aumento da quantidade de nitrato de sódio no meio de cultivo resultou, de uma maneira geral, na elevação das densidades celulares das culturas, atingindo valores máximos na maior quantidade de nitrato de sódio (75 mg L⁻¹), com 219,94±8,23 x 10⁴ cels. mL⁻¹; 202,17±8,44 x 10⁶ cels. mL⁻¹; 185,21±9,71 x 10⁴ cels. mL⁻¹ e 138,50±9,83 x 10⁶ cels. mL⁻¹, para *T. tetrathele*, *N. oculata*, *T. chui* e *C. vulgaris*, respectivamente. Também foi observada diferença estatística (p<0,05) entre as densidades celulares finais das espécies cultivadas nessa quantidade de nitrato, com exceção de *N. oculata* e *T. chui* (Tabela 2).

Podemos ainda observar na tabela 2 que as microalgas *T. chui* e *T. tetrathele*, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, apresentaram densidades celulares finais significativamente diferentes nas quantidades de 15; 30 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, com

T. tetrathele apresentando um desempenho significativamente inferior nas menores quantidades de nitrato de sódio (15 e 30 mg L⁻¹) e significativamente superior em 75 mg L⁻¹. Já em 45 e 60 mg L⁻¹ não foram observadas diferenças significativas nas densidades celulares finais de ambas as microalgas. Além disso, para a espécie *T. chui*, o aumento da quantidade de nitrato de sódio acima de 30 mg L⁻¹ não resultou em um aumento significativo da densidade celular.

Como esperado, de uma maneira geral, as microalgas apresentaram densidades celulares finais diferentes em cada quantidade de nitrato de sódio utilizada. No entanto, em 45 e 60 mg L⁻¹ as diferentes espécies apresentaram as mesmas densidades celulares finais, com exceção de *C. vulgaris* que foram significativamente menores (Tabela 2).

3.3. Consumo de nitrato pelas microalgas

A partir dos valores iniciais reais (Tabela 3) e finais (Tabela 4) das concentrações de nitrato determinadas em cada tratamento, foi construída a curva de consumo desse nutriente pelas microalgas (Figura 9).

Tabela 3 - Concentrações iniciais reais de nitrato nos meios de cultivo das quatro microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.

Parâmetro	Concentração de nitrato (mg L ⁻¹)				
	T15	T30	T45	T60	T75
Nitrato	2,42±0,22 ^a	3,25±0,68 ^{ab}	4,50±0,72 ^b	6,34±0,53 ^c	7,41±0,60 ^c

Tabela 4 - Concentrações finais de nitrato nos meios de cultivo das quatro microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio.

Microalgas	Concentração de nitrato (mg L ⁻¹)				
	T15	T30	T45	T60	T75
<i>T. tetrathele</i>	0,342±0,024 ^{a,AB}	0,385±0,020 ^{a,A}	0,444±0,023 ^{b,A}	0,495±0,022 ^{b,AB}	0,502±0,030 ^{b,A}
<i>T. chui</i>	0,321±0,012 ^{a,A}	0,368±0,028 ^{ab,A}	0,412±0,032 ^{bc,A}	0,455±0,035 ^{bc,A}	0,484±0,037 ^{c,A}
<i>N. oculata</i>	0,380±0,020 ^{a,B}	0,400±0,030 ^{ab,A}	0,450±0,024 ^{b,A}	0,517±0,013 ^{cd,B}	0,533±0,011 ^{d,A}
<i>C. vulgaris</i>	0,500±0,032 ^{a,C}	0,525±0,013 ^{a,B}	0,544±0,011 ^{ab,B}	0,567±0,022 ^{bc,C}	0,584±0,013 ^{c,B}

Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre as concentrações finais de nitrato para cada microalga variando as concentrações desse nutriente;

Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre as concentrações finais de nitrato das diferentes microalgas em cada concentração desse nutriente.

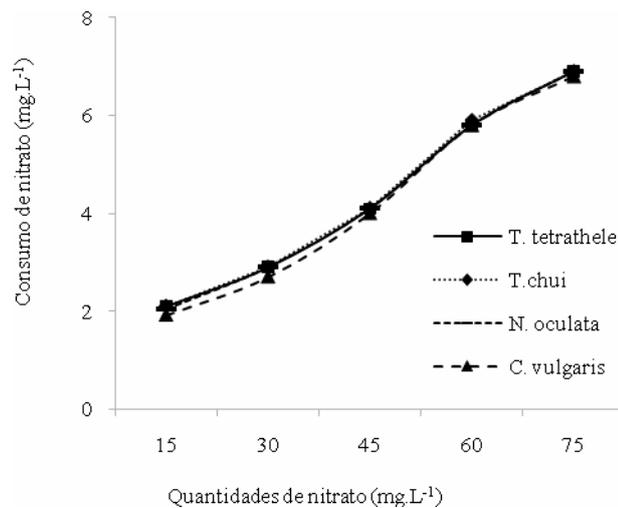


Figura 9 - Consumo de nitrato pelas microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo.

Como podemos observar o consumo de nitrato por todas as microalgas foi bastante semelhante e foi aumentando à medida que as quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo foram elevadas, variando de 2,1 a 6,9 mg L⁻¹ na menor (T15) e maior (T75) quantidade utilizada desse nutriente, respectivamente (Figura 9). Assim, a remoção de nitrato do meio de cultivo variou de 86,6 a 93,1% nas quantidades de 15 e 75 mg L⁻¹, respectivamente.

Charity *et al.* (2009) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em uma água oriunda de um efluente de cultivo de peixes visando avaliar a remoção de nutrientes, crescimento e rendimento de biomassa através de sedimentação natural. Os cultivos foram realizados em tanques externos de 150 L com aeração constante e em condições naturais de fotoperíodo e temperatura. As microalgas removeram 94,44% (23,80 mg L⁻¹) de amônia, 77,54% (7,04 mg L⁻¹) de fosfatos e 35,59% (26,09 mg L⁻¹) de matéria orgânica.

Nas maiores quantidades de nitrato de sódio (T60 e T75), as duas microalgas do gênero *Tetraselmis* apresentaram um consumo de nitrato significativamente superior aos observados para as microalgas *N. oculata* e *C. vulgaris* que foram bem semelhantes, principalmente com relação a esta última, que apresentou o mais baixo consumo de nitrato de sódio entre as quatro espécies estudadas.

Lourenço (2006) afirma que a amônia (NH₃) e o íon amônio (NH₄⁺) são formas nitrogenadas utilizadas preferencialmente pelo fitoplâncton como fontes de nitrogênio.

Por outro lado, a microalga *Dunaliella tertiolecta* já apresentou uma preferência por nitrato em vez de amônio, reduzindo em 86,5% o teor do primeiro enquanto a concentração do último permaneceu constante em um cultivo de sete dias, utilizando o meio Erdschreiber (CHEN *et al.*, 2011).

3.4. Recuperação da biomassa das microalgas

As concentrações de NaOH 2N necessárias para a realização do processo de separação química foram de 1,8; 1,8; 1 e 2,5% (mL de NaOH 2N por 100 mL de cultivo) para as microalgas *T. tetrathele*, *T. chui*, *N. oculata* e *C. vulgaris*, respectivamente.

Como pode ser observado na tabela 5, o aumento das quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo não resultou no aumento da recuperação da biomassa para as duas espécies de microalgas do gênero *Tetraselmis*, que apresentaram valores bastante semelhantes.

Por outro lado, o aumento da quantidade desse nutriente para 45 mg L⁻¹ resultou em um aumento significativo (p<0,05) na recuperação da biomassa para as microalgas *N. oculata* e *C. vulgaris*, sendo cerca de quatro e duas vezes superiores aos obtidos na menor quantidade de nitrato de sódio (T15) utilizada para as duas espécies, respectivamente. No entanto, o aumento das quantidades desse nutriente para 60 e 75 mg L⁻¹ não foi mais capaz de elevar a recuperação da biomassa para essas duas espécies.

Tabela 5 - Recuperação de biomassa (%) das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo.

Microalgas	Recuperação de biomassa (%)				
	T15	T30	T45	T60	T75
<i>T. tetrathele</i>	0,014±0,001 ^{a,A}	0,013±0,003 ^{a,A}	0,017±0,005 ^{a,A}	0,016±0,001 ^{a,A}	0,019±0,003 ^{a,AB}
<i>T. chui</i>	0,011±0,004 ^{a,A}	0,011±0,003 ^{a,A}	0,009±0,001 ^{a,A}	0,011±0,005 ^{a,A}	0,012±0,005 ^{a,A}
<i>N. oculata</i>	0,004±0,001 ^{a,B}	0,006±0,001 ^{a,B}	0,017±0,004 ^{b,A}	0,019±0,004 ^{b,A}	0,022±0,002 ^{b,B}
<i>C. vulgaris</i>	0,014±0,002 ^{a,A}	0,015±0,002 ^{a,A}	0,032±0,008 ^{b,B}	0,032±0,004 ^{b,B}	0,034±0,006 ^{b,C}

Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre a recuperação de biomassa para cada microalga variando as concentrações de nitrato;

Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre a recuperação de biomassa das diferentes microalgas em cada concentração de nitrato utilizada.

Os cultivos das microalgas *T. tetrathele*, *T. chui* e *N. oculata*, realizados nas quantidades de 45, 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, resultaram em valores de da

recuperação da biomassa bem semelhantes entre si, no entanto, nessas mesmas quantidades, a espécie *C. vulgaris* apresentou uma recuperação significativamente superior. Já nas menores quantidades de nitrato de sódio (T15 e T30), a espécie *N. oculata* apresentou resultados significativamente inferiores aos obtidos para as demais espécies de microalgas (Tabela 5).

Rodolfi *et al.* (2009) cultivaram a microalga *Nannochloropsis* sp. em fotobioreatores de 110 L sob luz solar direta variando a concentração de nitrogênio. Os autores observaram uma redução de 16,7% na recuperação de biomassa quando a referida microalga foi cultivada com depleção de nitrogênio, semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho para as espécies *N. oculata* e *C. vulgaris* (Tabela 5).

Di Termini *et al.* (2011) cultivaram microalgas do gênero *Scenedesmus* em fotobioreatores tubulares em sistema interno sob condições controladas e em sistema externo, após a decantação de um efluente obtido de uma estação de tratamento de água, visando a remoção de nitrogênio e fósforo e a produção de biomassa e lipídios. Os resultados mostraram que houve uma remoção de cerca de 99,9% desses nutrientes em ambos os fotobioreatores. Os autores também observaram uma recuperação de biomassa de 0,025% no fotobioretator em sistema fechado, enquanto no sistema externo, devido à instabilidade das condições ambientais e da concentração dos nutrientes limitantes, a recuperação de biomassa foi reduzida para 0,016%.

Foi observado, no presente trabalho, que a recuperação de biomassa das microalgas do gênero *Tetraselmis* não sofreu nenhuma influência com o aumento da quantidade de nitrato de sódio no meio de cultivo, mas os resultados obtidos para as microalgas *N. oculata* e *C. vulgaris* aumentaram significativamente quando o teor desse nutriente foi elevado para 45 mg L⁻¹.

3.5. Influência da concentração de nitrato no rendimento de óleo das microalgas

Como observado na tabela 6, nas baixas quantidades de nitrato de sódio os rendimentos de óleo foram maiores para todas as microalgas, atingindo valores máximos na menor quantidade utilizada (15 mg L⁻¹), com rendimentos de 21,63±0,10; 34,63±0,78; 36,35±0,61 e 49,41±0,14% para as microalgas *C. vulgaris*, *T. tetrahele*, *T. chui* e *N. oculata*, respectivamente. Nesse caso, houve diferença estatisticamente significativa entre os

rendimentos de óleo de todas as microalgas cultivadas ($p < 0,05$), o que também ocorreu quando as mesmas foram cultivadas na quantidade mais elevada de nitrato de sódio (T75).

Tabela 6 - Rendimento de óleo (%) das microalgas cultivadas com diferentes quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo.

Microalgas	Rendimento de óleo (%)				
	T15	T30	T45	T60	T75
<i>T. tetrathele</i>	34,63±0,78 ^{a,A}	32,10±0,99 ^{b,A}	31,84±0,13 ^{b,A}	31,14±0,24 ^{b,A}	30,88±0,62 ^{b,A}
<i>T. chui</i>	36,35±0,61 ^{a,B}	32,33±0,72 ^{b,A}	29,54±0,13 ^{c,B}	26,04±0,98 ^{d,B}	24,25±0,41 ^{e,B}
<i>N. oculata</i>	49,41±0,14 ^{a,C}	35,68±0,12 ^{b,B}	31,21±0,58 ^{c,A}	26,77±0,36 ^{d,B}	23,36±0,15 ^{e,C}
<i>C. vulgaris</i>	21,63±0,10 ^{a,D}	20,77±0,58 ^{a,C}	19,19±0,22 ^{b,C}	17,95±0,37 ^{c,C}	17,19±0,31 ^{d,D}

Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre o rendimento de óleo para cada microalga variando as concentrações de nitrato;

Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre o rendimento de óleo das diferentes microalgas em cada concentração de nitrato utilizada.

Quando a quantidade de nitrato de sódio foi reduzida de 75 para 15 mg L⁻¹, as espécies *T. tetrathele* e *T. chui* aumentaram em 12,1 e 50% seus teores de óleo, respectivamente (Tabela 6). No entanto, como discutido anteriormente, a recuperação de biomassa obtida dos cultivos realizados nesses teores de nitrato não apresentaram diferenças significativas (Tabela 5). Dessa forma, para otimizar a produção de óleo, essas microalgas devem ser cultivadas com 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, principalmente a *T. chui*.

Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, a *T. chui* mostrou-se bem mais sensível à redução de nitrato de sódio no meio com relação ao aumento do rendimento de óleo do que a *T. tetrathele*. Além disso, as duas espécies do gênero *Tetraselmis* apresentaram rendimentos de óleo significativamente diferentes, sendo inferior para a *T. chui* em 45; 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio. Já quando as mesmas foram cultivadas com 30 mg L⁻¹, os rendimentos foram semelhantes e, na menor quantidade desse nutriente (T15), o rendimento de óleo obtido da *T. chui* passou a ser superior ao da *T. tetrathele* (Tabela 6).

O maior incremento foi registrado para a espécie *N. oculata* que aumentou em 111,5% sua produção de óleo quando a quantidade de nitrato de sódio foi reduzida de 75 para 15 mg L⁻¹. Enquanto a microalga *C. vulgaris* aumentou em apenas 25,8% nessas mesmas condições (Tabela 6). No entanto, a recuperação de biomassa para essas duas microalgas cultivadas com 15 mg L⁻¹ foi significativamente menor (Tabela 5).

Por outro lado, a redução de 75 para 45 mg L⁻¹ na quantidade de nitrato de sódio ainda fez com que a microalga *N. oculata* aumentasse em 33,6% sua produção de óleo, enquanto *C. vulgaris* aumentou em apenas 11,63%. Vale salientar que na quantidade de 45 mg L⁻¹, a recuperação de biomassa para essas duas espécies foi significativamente superior ao

obtido na menor quantidade desse nutriente (T15) e sem diferença significativa aos obtidos em 60 e 75 mg L⁻¹ (Tabela 5). Dessa forma, para otimizar a produção de óleo dessas duas espécies, o cultivo deve ser realizado com 45 mg L⁻¹ de nitrato de sódio no meio de cultivo.

A produção de óleo por *C. vulgaris* foi significativamente inferior à obtida pelas demais espécies, independente da quantidade de nitrato de sódio adicionada no meio de cultivo. Já a produção de óleo por *N. oculata*, foi significativamente superior às demais espécies nas quantidades de 15 e 30 mg L⁻¹. No entanto, o teor de lipídios dessa microalga não apresentou diferença significativa aos obtidos para *T. tetrathele* e *T. chui* nas quantidades de 45 e 60 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, respectivamente.

Converti *et al.* (2009) estudaram os efeitos da temperatura e concentração de nitrogênio no conteúdo lipídico das microalgas *N. oculata* e *C. vulgaris* visando a produção de biodiesel. Os autores observaram que um aumento na temperatura de 20 para 25 °C praticamente dobrou o conteúdo lipídico da *N. oculata*, passando de 7,90 para 14,92%, enquanto um aumento de 25 para 30 °C resultou na redução de cerca de 40% em *C. vulgaris*. Quando a concentração inicial de nitrogênio no meio de cultivo foi reduzida em 75%, foi verificado um aumento no teor lipídico em cerca de 48 e 64% para *N. oculata* e *C. vulgaris*, respectivamente. Esses resultados contrastam um pouco com os obtidos nesse trabalho, pois reduzindo em 80% a quantidade de nitrato de sódio no meio, observamos um acréscimo de 115,0 e 25,8% no rendimento de óleo para as mesmas microalgas, respectivamente.

Li *et al.* (2011) cultivaram a microalga *Chlorella* sp. em água obtida de esgotos domésticos com elevada quantidade de nutrientes, visando seu tratamento e a produção de biocombustíveis em um cultivo do tipo estacionário. Os resultados mostraram que as algas removeram a amônia, nitrogênio total, fósforo total e a demanda química de oxigênio (DQO) em 93,9; 89,1; 80,9 e 90,8%, respectivamente. Os autores mostraram que o teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi de 11,04% na biomassa seca, proporcionando um rendimento de 0,12 g de biodiesel L⁻¹.

Rodolfi *et al.* (2009) cultivaram a microalga *Nannochloropsis* sp. em fotobioreatores de 110 L sob luz solar direta com depleção de nitrogênio e observaram que o teor lipídico passou de 32%, sob condições ótimas de nitrogênio, para 60% com a depleção desse nutriente.

Ota *et al.* (2009) avaliaram a produção de ácidos graxos pela microalga verde *Chlorococcum littorale* nas concentrações de 5 e 50% de CO₂ na fase logarítmica de crescimento da cultura. Os autores mostraram que o teor de ácidos graxos foi quase constante em ambas as concentrações do gás. Por outro lado, após o esgotamento do nitrato no meio, o

teor de ácidos graxos aumentou consideravelmente nos cultivos com 5% de CO₂, alcançando 34% do peso seco, enquanto com 50% desse gás este valor foi reduzido para 14%.

Mandal e Mallick (2009) cultivaram a microalga de água doce *Scenedesmus obliquus* em diferentes concentrações de nutrientes com o intuito de analisar o conteúdo lipídico e verificaram que o aumento mais significativo, alcançando 43% do peso seco, ocorreu quando houve deficiência de nitrogênio. Com deficiência de fósforo e suplementação de tiosulfato, o teor de lipídios também aumentou em até 30%, sendo o palmitato e o oleato os principais constituintes lipídicos dessa microalga, o que a torna uma fonte para a produção de biodiesel.

No cultivo da alga verde *Neochloris oleoabundans* em um digestor anaeróbio de efluentes e em cultivo tipo *batch*, Levine, Costanza-Robinson e Spatafora (2011) observaram que as microalgas assimilaram de 90 a 95% de nitrato de amônio do meio após seis dias do início da cultura, com um rendimento de 10 a 30% de ésteres metílicos de ácidos graxos em relação ao peso seco. Além disso, a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (C16:3; C18:2 e C18:3) diminuiu com o aumento da concentração desse nutriente ao longo do tempo, enquanto o teor de C18:1 foi elevado.

A microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* foi cultivada por Massart, Aubry e Hamtson (2010) para verificar a taxa de crescimento e o teor de óleo em diferentes concentrações de nutrientes no meio de cultivo. Os autores utilizaram a técnica de fluorescência, que permite a determinação do nível de óleo no interior das células, que foi reduzido com o aumento no crescimento populacional das microalgas. No presente trabalho, o estresse causado pela depleção de nitrato no meio de cultivo reduziu o crescimento das culturas mas, por outro lado, aumentou a produção de óleo das mesmas.

As microalgas marinhas do gênero *Chaetoceros* foram cultivadas de forma estacionária com teores de 0,5 a 1,0 g L⁻¹ de nitrogênio a uma temperatura de 26 °C. As algas foram coletadas quando a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento e analisados os rendimentos de proteína, lipídios e carboidratos, além da taxa de crescimento. Em elevados níveis de nitrogênio (0,75 e 1,0 g L⁻¹), as microalgas apresentaram valores de recuperação de biomassa de 0,1-0,2%, teor de proteínas de 38-46%, carboidratos de 7-18% e lipídios de 20-45%. Em baixos níveis de nitrogênio (0,50 g L⁻¹), as microalgas marinhas apresentaram 42% de proteína, 11% de carboidratos e 55% no teor de lipídios (ANANADHIPADMANABHAN; RENITA; STANLEY, 2010).

Dragone *et al.* (2011) citam que o acúmulo de amido também ocorre em condições de depleção de nitrogênio, onde foi observado um crescimento celular muito mais

lento ($5,5 \times 10^7$ cels. mL⁻¹), em 0,0 g L⁻¹ de uréia no meio quando comparado ao cultivo com maiores quantidades desse nutriente ($1,1 \times 10^8$ cels. mL⁻¹), em 2,2 g L⁻¹ de uréia.

Chen *et al.* (2011) mostraram que a maior acumulação de lipídios para a microalga marinha *D. tertiolecta* foi obtida quando foi reduzida a fonte de nitrogênio do meio de cultivo.

Dessa forma, o estresse por depleção de nutrientes é uma ferramenta útil quando se deseja maximizar a produção de óleo por algumas microalgas, apesar da redução da recuperação da biomassa. Conforme demonstrado no presente trabalho, os teores de óleo apresentaram valores crescentes quando foram reduzidos os conteúdos de nitrato de sódio no meio de cultivo, principalmente para as espécies *Tetraselmis chui* e *Nannochloropsis oculata*.

4. CONCLUSÃO

Com a realização dessa etapa do trabalho, podemos concluir que o consumo de nitrato por todas as microalgas foi bastante semelhante e foi aumentando à medida que as quantidades de nitrato de sódio no meio de cultivo foram elevadas. A redução das quantidades de nitrato de sódio fez com que os rendimentos de óleo se elevassem em todas as microalgas, principalmente para a *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis chui*.

5. REFERÊNCIAS

ANANADHIPADMANABHAN, M. R.; RENITA, A.; STANLEY, S. A. Studies on the effect of nitrogen source and the growth of marine microalgae algae. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON "RECENT ADVANCES IN SPACE TECHNOLOGY SERVICES AND CLIMATE CHANGE - 2010", RSTS and CC-2010, Tamil Nadu. **Anais...** Tamil Nadu: Sathyabama University, 2010. p. 350-352.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

CHARITY, E. *et al.* Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. **Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia**, Zulia, v. 32, n. 2, p. 126-134, 2009.

CHEN, M. *et al.* Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1649-1655, 2011.

CONVERTI, A. *et al.* Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 28, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

De La HOZ, S.; BEN-ZVI, A.; BURRELL, R.E.; McCAFFREY, W.C. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5764-5774, 2011.

DI TERMINI, I. *et al.* On the nitrogen and phosphorus removal in algal photobioreactors. **Ecological Engineering**, v. 37, p. 976-980, 2011.

DRAGONE, G. *et al.* Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, Kidlington, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, 2011.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 597-613, 2011.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.). **Culture of marine invertebrate animal**. New York: Plenum Publishing, 1975. p. 29-60.

LEVINE, R. B.; COSTANZA-ROBINSON, M. S.; SPATAFORA, G. A. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 40-49, 2011.

LI, Y. *et al.* Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5138-5144, 2011.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 281-291, 2009.

MASSART, A.; AUBRY, E.; HAMTSON, A. L. Study of culture strategies of *Dunaliella tertiolecta* combining high cell density and accumulation of lipids to produce biodiesel. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 14, n. 2, p. 567-572, 2010.

OTA, M. *et al.* Fatty acid production from a highly CO₂ tolerant alga, *Chlorococcum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5237-5242, 2009.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell, 2004.

RODOLFI, L. *et al.* 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. 100-112, 2009.

SÁNCHEZ, S.; MARTINEZ, M. E.; ESPINOLA, F. Biomass production and biochemical variability of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p.13-18, 2000.

WIJFFELS, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, 2007.

CAPÍTULO 4

**INFLUÊNCIA DA BIOMASSA SECA DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* NO
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E IMUNOLÓGICO DO CAMARÃO MARINHO
*Litopenaeus vannamei***

RESUMO

Com a intensificação da aquicultura, os organismos passaram a ser expostos a elevados níveis de estresse, tanto de natureza abiótica como biológica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico e alguns imunoparâmetros do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* após o cultivo e inclusão da biomassa natural e delipidada da microalga *Chlorella vulgaris* na dieta. Além disso, objetivou-se avaliar o rendimento de óleo da microalga e identificar os ácidos graxos com potencial para a produção de biodiesel. Em um primeiro experimento, camarões ($9,51 \pm 1,37$ g; $11,48 \pm 0,81$ cm) foram alimentados com ração contendo a biomassa natural da microalga *C. vulgaris* em quatro repetições, nas concentrações de 0,5; 1 e 2% e, no tratamento controle, com ração sem a adição da microalga. Os animais foram alimentados durante 14 dias na proporção de 1,5% do peso vivo diário e a ração foi oferecida, em duas refeições diárias, sobre bandejas para monitorar possíveis sobras após cada trato alimentar. Noutro experimento, camarões ($10,53 \pm 1,61$ g; $12,32 \pm 0,65$ cm) foram distribuídos de acordo com o mesmo delineamento do primeiro, utilizando a biomassa delipidada da microalga. Em ambos, 20 indivíduos foram coletados, ao acaso, para a retirada da hemolinfa e realização das análises iniciais dos imunoparâmetros (dia 0) para a contagem diferencial de hemócitos (CDH), atividade da fenoloxidase (PO), capacidade hemaglutinante da hemolinfa e concentração de proteínas totais no soro (CP), sendo os mesmos também realizados no final dos experimentos. Alguns parâmetros zootécnicos de crescimento dos camarões foram melhores no experimento que utilizou a biomassa natural da microalga. No entanto, a inclusão de 0,5% da biomassa delipidada na dieta dos animais também apresentou resultados satisfatórios. Foi obtido um rendimento de $57,86 \pm 5,18\%$ de lipídios totais na biomassa de *C. vulgaris*, os quais foram constituídos principalmente de ácido palmítico (16:0), oléico (18:1) e linoléico (18:2), sendo os dois primeiros preferíveis para a produção de biodiesel. Com relação aos imunoparâmetros, as diferenças mais significativas foram encontradas na concentração de proteínas totais no soro (CP) e na atividade da fenoloxidase, as quais foram aumentadas e reduzidas, respectivamente, nos camarões que receberam a biomassa natural ou delipidada da microalga na dieta, independente da concentração utilizada.

Palavras-chave: Desempenho zootécnico. Imunoparâmetros. Lipídio. Microalga.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção aquícola brasileira

A aquicultura é o cultivo de organismos aquáticos com a intervenção do homem no processo de criação para aumentar a produção, em operações como reprodução, estocagem, alimentação, proteção contra predadores entre outras (FAO, 1990).

No ano de 2008, o Brasil produziu um total de 290.195 t das quais 78.435 t foram provenientes da aquicultura marinha e 211.760 t da continental. A composição da produção da aquicultura brasileira em 2008, a exemplo da mundial, foi majoritariamente formada por: (1) peixes de água doce (72,68%), com 210.812 t; (2) carcinicultura do *Litopenaeus vannamei* (22,49%) com 65.000 t, enquanto que o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* contribuiu com apenas 250 t; (3) cultivo de mexilhões e ostras (4,62%) e, em último lugar (4), a insipiente produção de jacarés e rãs (0,21%) (FAO, 2010).

De acordo com a mesma instituição, em nosso país, a liderança da produção da aquicultura foi das tilápias (33,08%), seguida do camarão marinho (22,40%), da carpa (12,61%), do tambaqui (10,54%), do pacu (4,27%), dos mexilhões (4,14%) e do tambacu (3,10%), sendo o restante (9,85%) representado por outros organismos cultivados (FAO, 2010).

Em termos de crescimento dos cultivos, os destaques ficaram por conta do tambaqui (46,88%), da tilápia (48,02%), dos mexilhões (39,41%), do tambacu (39,41%) e outros organismos (71,11%). No entanto, a produção total do setor aquícola nacional apresentou apenas um crescimento de 6,19% no período de 2006 a 2008 (FAO, 2010).

1.2. Produção de camarões no Brasil

O cultivo de camarões é uma ramificação da aquicultura que promove a cultura desses organismos em águas marinhas, estuarinas ou em água doce sob condições controladas (BARBIERE; OSTRENSKY, 2002), sendo o setor que mais cresceu no mundo nos últimos anos, principalmente no que diz respeito ao fator econômico (NUNES, 2000). Nesse contexto,

esta atividade ocupa o segundo lugar em escala mundial, tendo aumentado consideravelmente entre os anos de 2002 a 2004, só perdendo para a piscicultura de água doce (FAO, 2007).

A carcinicultura teve início no Brasil por volta dos anos setenta tomando força e expansão na década de oitenta, mas a partir da década de noventa, com a introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*, a atividade se consolidou devido a adaptação desse camarão às nossas condições estuarinas chegando a uma produtividade superior a 6000 kg/ha/ciclo (SAMPAIO; COSTA, 2003).

O camarão *L. vannamei* é normalmente encontrado desde a porção leste do oceano Pacífico, próximo da cidade de Sonora, no México, até Thumbes, no norte do Peru (BARBIERE; OSTRENSKY, 2002). O camarão branco do Pacífico, como também é conhecido, é uma das mais importantes espécies cultivadas nas Américas, especialmente no Equador e México (CUZON *et al.*, 2004).

O cultivo do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, tornou o Brasil uma referência no hemisfério Sul (ROCHA; RODRIGUES, 2004), principalmente, os estados do Rio Grande do Norte e Ceará, com este último se destacando pelas maiores produtividades (ABCC, 2006). Em poucos anos, a espécie ganhou popularidade, devido a sua fácil adaptação às nossas condições climáticas, resultando em altas produtividades e crescimento uniforme (BRASIL, 2001).

Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarões, no ano de 2008 foram produzidos no Brasil 70.000 toneladas de camarão, em uma área de mais de 19.000 ha, resultando em uma produtividade de 3.700 kg/ha/ano. Mesmo com a produção estável a partir de 2005, as exportações sofreram quedas significativas a cada ano, tanto nos volumes como nos valores. Foram exportadas no Brasil, no ano de 2008, um total de 9.397 toneladas, com a participação de 1.908 toneladas para o estado do Ceará, ou seja, 20,30%. Vale salientar que nesse ano, 87% de toda a produção de camarão em nosso país foi destinada para o mercado interno, contrastando com o volume total de 34,6% que foi exportado nos anos de 2003 a 2005 (ABCC, 2010).

A alimentação é um dos aspectos mais importantes no cultivo de camarão marinho, pois os custos podem tornar-se bastante elevados, dependendo da estratégia alimentar adotada (MARTINEZ-CORDOVA *et al.*, 1998). Nesse contexto, a inclusão de uma biomassa de microalga na elaboração de uma ração comercial poderá otimizar o desempenho zootécnico e imunológico dos camarões, podendo a mesma ser ainda destinada para a extração de lipídios visando a produção de biocombustíveis em cultivos de larga escala.

1.3. Imunoestimulantes em organismos aquáticos

Com a intensificação da aquicultura, os organismos passaram a ser expostos a elevados níveis de estresse, tanto de natureza abiótica como biológica. As altas densidades de estocagem, a presença de grandes quantidades de alimento e os dejetos dos organismos elevam os níveis de matéria orgânica e bactérias nos cultivos intensivos, prejudicando a qualidade da água e causando doenças (VADSTEIN, 1997).

Assim, nos últimos anos, o país passou a enfrentar diversos problemas devido ao surgimento de doenças bacterianas e virais, o que reduziu acentuadamente a produção de crustáceos (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Dentre as doenças viróticas que afetam o camarão destacam-se a necrose hepatopancreática (NHP), a mionecrose infecciosa (IMNV) (BUCHELI *et al.*, 2004; NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004) e a síndrome da mancha branca (WSSV) (NUNES; MARTINS, 2002), esta última confirmada inicialmente no estado de Santa Catarina em janeiro de 2005, pelo Ministério da Agricultura (JURGENFELD, 2005). Em junho do mesmo ano, o DNA do vírus da mancha branca (WSSV) foi detectado em camarões oriundos de cultivos realizados no município de Aracati-CE, pelos técnicos do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (GESTEIRA, 2006).

Visando minimizar maiores perdas, várias práticas são utilizadas para combater o surgimento de doenças na aquicultura tais como profilaxia sanitária, desinfecção, uso de antibióticos e vacinas contra doenças específicas. Porém, algumas dificuldades estão associadas ao emprego de medicamentos, como os antibióticos, que podem provocar um aumento na resistência microbiana e acúmulo de resíduos (COOK *et al.*, 2003).

Por outro lado, vários estudos têm sugerido o uso de imunoestimulantes na prevenção de doenças, como os fatores nutricionais lactoferrina e as vitaminas B e C, além de fatores hormonais como a prolactina. Outros compostos, extraídos de vários organismos, tais como os polissacarídeos quitina, obtido do exoesqueleto de crustáceos, o β -glucano, presente nas paredes celulares de fungos e leveduras e os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas também têm apresentado efeitos imunoestimulantes. Esses compostos ativam principalmente a fagocitose e a atividade antibacteriana das células de defesa contra patógenos e seus metabólitos (SAKAI *et al.*, 1992; SAKAI, 1999; CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2002; RIVERA *et al.*, 2002; FARIAS *et al.*, 2004; HUANG; ZHOU; ZHANG, 2006).

Além do efeito imunestimulante, os PS de algas marinhas também são conhecidos por possuírem outras atividades biológicas, tais como antiviral, anticoagulante, antitrombótica e antinociceptiva (HAYASHI; HAYASHI; KOJIMA, 1996; FARIAS; NAZARETH; MOURÃO *et al.*, 2001; FARIAS *et al.*, 2011).

A imunestimulação resulta em um melhor desenvolvimento dos animais e/ou no aumento da sobrevivência, quando os mesmos são expostos a situações de estresse (SAKAI, 1999).

Campa-Córdova *et al.* (2002) reportaram um aumento na capacidade oxidativa dos hemócitos de juvenis do camarão branco *L. vannamei*, após imersão dos animais em soluções de β -glucano e de um PS extraído de uma microalga cianofícea, a *Spirulina platensis*.

Determinados estudos relatam que a administração de uma concentração ótima de um determinado composto com atividade imunestimulatória é extremamente importante para resultar numa resposta efetiva. Alguns relatos têm demonstrado que concentrações baixas surtem um melhor efeito do que as mais elevadas (BOONYARATPALIN *et al.*, 1995; PARK; JEONG, 1996; TINMAN *et al.*, 2000).

Os imunostimulantes podem ser considerados as melhores ferramentas na indução do crescimento e sobrevivência em camarões (AZAD *et al.*, 2005), sendo também a melhor alternativa na prevenção de doenças infecciosas oportunistas, ocasionadas pelo estresse que reduz as defesas desses organismos (ALDAY-SANZ, 2007).

A utilização de testes com diferentes concentrações de substância ditas imunostimulantes é uma estratégia chave para a descoberta das doses ótimas que possam ser mais efetivas na prevenção de problemas resultantes do estresse, como durante o transporte e no ciclo reprodutivo dos animais aquáticos (BRICKNELL; DALMO, 2005).

1.4. Parâmetros imunológicos em camarões marinhos

Os crustáceos não apresentam memória imunológica, sendo destinada ao sistema imunológico inato ou inespecífico, a proteção do organismo contra infecções por patógenos ou outros fatores externos que tragam complicações à saúde dos animais (SARATHI *et al.*, 2007).

Em crustáceos decápodes, os hemócitos desempenham um papel crucial na atividade imunológica inata. Entre os três tipos de hemócitos, as células semi granulares e granulares (GCs) são responsáveis pela degradação dos agentes microbianos ou moléculas estranhas ao organismo como os lipopolissacarídeos (LPS), β -glucano e peptidoglicano (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998). Sabe-se que os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), como os LPS e β -glucano são reconhecidos e se ligam a proteínas específicas que desencadeiam uma série de reações em cascata com a atuação de serinoproteases que levam à ativação de diversas proteínas, que incluem o sistema profenoloxidase (ProPO) induzindo a liberação da enzima fenoloxidase (PO), proteinase serínica peroxinectina (PX) e a enzima α 2-macroglobulina (α 2-M) (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998; LEE; SÖDERHÄLL, 2002).

No camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, a PX, modula a adesão celular e também está envolvida no fator de encapsulamento, apresentando ainda uma atividade de peroxidase na eliminação de H_2O_2 (JOHANSSON *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2004; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

A enzima inibidora de proteases α 2-M desempenha um papel importante em capturar as proteases produzidas pelos patógenos e ainda auxilia na ativação do sistema proPO (LEE; SÖDERHÄLL, 2002; LIN; VASEEHARAN; CHEN, 2008). Portanto, PX e α 2-M são proteínas importantes envolvidas na imunidade inata desses animais (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004).

A conversão de proPO inativa para fenoloxidase ativa (PO) é catalisada por uma proteinase serínica denominada tripsina, também conhecida como fator de ativação do sistema proPO (PPA) que, na presença de PAMPs, resulta na produção de melanina e encapsulamento (CERENIUS; LEE; SÖDERHÄLL, 2008). Células hialinas (HC) são fagocíticas, e vários tipos de espécies reativas de oxigênio (ROIs) são produzidas durante a fagocitose. O ânion superóxido e seus derivados, ambos bactericidas, são os primeiros produtos resultantes do *burst* respiratório (MUÑOZ *et al.*, 2000). Este mecanismo é regulado pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando oxigênio e peróxido de hidrogênio e este último é eliminado pela peroxidase e catalase na presença de um agente redutor (FRIDOVICH, 1995; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999).

Diante do exposto, a utilização da biomassa de microalga em uma dieta de camarões marinhos antes e após o processo de extração de óleo para a produção de biodiesel poderá otimizar os parâmetros zootécnicos e imunológicos desses animais, além de agregar

valor ao processo produtivo e, assim, contribuir para sua viabilidade econômica, cabendo apenas o destino do solvente residual durante o processo.

O objetivo desse último capítulo foi avaliar o desempenho zootécnico e o perfil imunológico do camarão marinho *L. vannamei* após o cultivo e inclusão da biomassa da microalga *C. vulgaris* em sua dieta antes e após o processo de extração de óleo para a produção de biocombustíveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo da microalga

2.1.1. Cultivo em ambiente interno

A cepa da microalga *Chlorella vulgaris* utilizada nesse estudo foi obtida no cepário do Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura - CEBIAQUA, pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, onde as mesmas são mantidas a 22 ± 2 °C, em tubos de ensaio, com iluminação artificial, fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro e o meio de cultivo usado para a manutenção dos inóculos e condução do experimento foi o Guillard f/2 (GUILLARD, 1975).

O cultivo partiu de um volume de 20 mL em um erlenmeyer de 250 mL, sendo acrescentado, a cada dois dias, aproximadamente o mesmo volume de meio de cultura autoclavado. Em seguida, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para outro, com capacidade para um litro e, finalmente, para um recipiente de vidro com dois litros de volume útil, quando a cultura passou a ser submetida a uma aeração constante através de bombas de diafragma com fluxo de ar de 2 L min^{-1} .

Durante o experimento, a temperatura da sala de cultivo ficou em torno de 22 ± 1 °C e a iluminação foi constantemente fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W com irradiância total de $60 \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os cultivos foram realizados com volume constante, ou seja, em batelada (LOURENÇO, 2006) e o meio de cultivo, bem como toda a vidraria utilizada foram previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

O acompanhamento do crescimento populacional das microalgas foi realizado, a cada dois dias, através da determinação da densidade óptica a 680 nm ($DO_{680\text{ nm}}$) utilizando um espectrofotômetro HACH modelo DR 2000.

2.1.2. Cultivo em ambiente externo e recuperação da biomassa de *C. vulgaris*

Antes de iniciar a cultura da microalga em ambiente externo, a mesma foi aclimatada a um novo meio de cultivo, contendo 120 g de uréia (solução estoque 1), 30 g de superfosfato triplo (solução estoque 2), ambos dissolvidos em um litro de água destilada, e vitaminas (duas ampolas de Citoneurim em 50 mL de água destilada) (solução estoque 3). Para cada litro de meio foram utilizados 1 mL das soluções 1 e 2 e 0,1 mL da solução 3. O cultivo foi iniciado a partir de dois litros da cultura obtida do ambiente interno, aos quais foram acrescentados 18 L do novo meio de cultura previamente preparado em água doce com pH 7,5. Em todo o cultivo a salinidade foi zero.

O volume total da cultura obtida no ambiente interno (20 L) foi inoculado em um tanque de fibra de vidro de 2000 L, limpo e esterilizado com álcool a 70%, e inoculado com 200 L do meio descrito anteriormente, iniciando assim o cultivo em ambiente externo com um volume útil de 220 L. A partir desse momento, a cultura foi submetida a uma aeração constante através de um mini compressor de ar com vazão de 2000 L hora⁻¹ e o tanque foi protegido com uma tela tipo mosquiteiro para evitar a entrada de insetos e detritos.

A cada quatro dias foram acrescentados 276 L de meio de cultivo até atingir um volume total de 1600 L, ao final de 23 dias de cultivo. A radiação solar total e a temperatura do ar durante esse período foram determinadas às 8; 11; 14 e 17 h em uma mini estação meteorológica montada a 20 m do tanque de cultivo da microalga.

A separação das microalgas do meio de cultivo foi realizada através da técnica de floculação química, com uma solução de NaOH 2N. Para isso, cerca de 400 L do cultivo foram drenados para uma caixa d'água de 500 L e misturados com 200 mL de NaOH 2N. O sobrenadante contendo o meio de cultivo foi sifonado e a biomassa algal úmida foi seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por um período de 24 horas. Após a secagem, foi triturada em um processador de alimentos e pesada em balança semi analítica para a determinação da recuperação da biomassa.

2.1.3. Determinação do teor de proteína bruta da microalga

A determinação de proteína bruta da microalga foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará e seguiu o método descrito pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1995).

A análise foi realizada através do método Kjeldhall, utilizando-se digestão com ácido sulfúrico (H₂SO₄), destilação alcalina com hidróxido de sódio (NaOH) e titulação com ácido sulfúrico 0,1 N, sendo 6,25 o fator de conversão de nitrogênio total para a proteína bruta. No final da titulação foi utilizada a fórmula abaixo para a determinação do percentual de proteína bruta:

$$\%PB = \frac{\text{mL de H}_2\text{SO}_4 \times \text{Normalidade do ácido} \times \text{Fator de conversão}}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

Onde:

%PB = Proteína bruta da amostra

H₂SO₄ = mililitros de ácido gasto na titulação

Normalidade do ácido = 0,1 N

Fator de conversão = 6,25

2.1.4. Determinação do teor de lipídios da microalga

A determinação do teor de lipídios da microalga foi realizada em triplicata e seguiu o método de Bligh e Dyer (1959) modificado, conforme descrito no capítulo anterior.

2.1.5. Caracterização dos lipídios presentes no óleo extraído de *C. vulgaris*

A caracterização dos lipídios presentes no óleo extraído da microalga *C. vulgaris* foi realizada no Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Processos do Departamento de

Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, através de uma cromatografia gasosa (CG), utilizando o método Ce 2-66 da AOCS (1997).

Para esse método, utiliza-se KOH 0,5 mol L⁻¹ em metanol anidro (reagente de saponificação), uma solução contendo 20 g de NH₄Cl + 600 mL de metanol anidro + 30 mL de H₂SO₄ concentrado (reagente de esterificação), uma solução aquosa saturada de NaCl (solução salina) e éter de petróleo.

Para a análise dos ésteres metílicos, foi utilizado o cromatógrafo a gás CGC Agilent-6850 série GC SYSTEM acoplado a um detector de ionização de chama, FID (*flame ionization detector*) e a um integrador, utilizando uma coluna capilar OV-1 (dimetilsilicone) com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme líquido. O fluxo da coluna foi ajustado para 1,0 mL min⁻¹, onde o volume injetado foi de 1,0 µL e o hélio (99,95%) utilizado como gás arrastante.

O procedimento partiu da pesagem de 50 mg do óleo extraído da biomassa seca da microalga *C. vulgaris* em um tubo de ensaio com tampa. Em seguida, adicionou-se 4,0 mL do reagente de saponificação, agitou-se vigorosamente o tubo, o qual foi aquecido em água fervente por um período de cinco minutos. Após o esfriamento do tubo, adicionou-se 5 mL do reagente de esterificação e agitou-se vigorosamente o tubo novamente em água fervente também por um período de cinco minutos. O tubo foi esfriado novamente e adicionou-se 4,0 mL da solução salina e 5 mL de éter de petróleo, agitando-se vigorosamente. O tubo foi deixado em repouso até a completa separação das fases e retirou-se uma alíquota da fase superior contendo os ésteres metílicos que foi injetada no cromatógrafo. O mesmo procedimento foi realizado para o óleo de mostarda (óleo de referência), cujo teor de ésteres já é conhecido.

Comparando-se o tempo de retenção (t_R) dos ésteres de cada óleo com o tempo de retenção dos ésteres do óleo de mostarda (analisado sob as mesmas condições operacionais), foi possível identificar a composição percentual de cada componente do óleo da microalga. Para a obtenção da massa molar média dos ésteres metílicos oriundos da transesterificação dos óleos vegetais, utilizou-se a equação abaixo, de acordo com Vargas (1996).

$$MMM(\text{ésteres metílicos}) = \frac{\sum [(A_i) \times (MM_i)]}{\sum (A_i)}$$

Onde:

A_i = teor em porcentagem do éster i;

MM_i = massa molar do éster i (g mol^{-1}).

A massa molar (MM) do óleo vegetal foi calculada através da equação:

$$MM(\text{óleo vegetal}) = [3xMMM \text{ dos ésteres metílicos} - 4]$$

2.2. Preparo da ração contendo a biomassa seca de *C. vulgaris*

A biomassa seca da microalga *C. vulgaris* foi incorporada na ração para camarões antes e depois de passar pelo processo de extração de lipídios. Para isso utilizou-se uma ração comercial peletizada com 32% de proteína bruta que foi triturada em um multiprocessador de alimentos e peneirada para a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, 20 g de gelatina comercial incolor sem sabor foram adicionados a 200 mL de água destilada e a mistura foi aquecida em uma placa aquecedora com agitação a 100 °C, durante 20 minutos.

Após a completa dissolução da gelatina, a biomassa seca da microalga, em diferentes concentrações (0,5; 1 e 2%), foi adicionada à solução que, após ser bem homogeneizada, foi misturada com 200 g da ração em pó previamente preparada para cada tratamento. A nova mistura foi homogeneizada manualmente com o auxílio de luvas e a pasta foi peletizada em um moedor de carnes modelo BMC-22 (Braesi), obtendo-se os *pellets* que foram secos em estufa com circulação de ar por um período de 24 horas a 60 °C.

A ração utilizada nos tratamentos controles sofreu o mesmo tipo de processamento, com exceção da adição de biomassa seca de *C. vulgaris*. Após a secagem, as rações foram armazenadas em sacos plásticos vedados, etiquetados e estocados em freezer a -20 °C. Dessa forma, para cada 200 g de ração foram utilizados 1; 2 e 4 g de biomassa natural ou delipidada da microalga, sendo utilizados 14 g de biomassa seca da microalga para todos os experimentos.

2.3. Experimento 1: Avaliação do desempenho zootécnico e imunológico dos camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* alimentados com ração contendo a biomassa da microalga que não passou pelo processo de extração de óleo

Para esse primeiro experimento, os camarões utilizados foram obtidos na carcinicultura BioShrimp, localizada no distrito de Canapum, município de Aracati, CE. Machos e fêmeas de *L. vannamei*, aparentemente saudáveis e em estágio de intermuda, foram transportados em uma caixa de 1000 L, contendo água do próprio viveiro de cultivo e com fornecimento de oxigênio. Como a despesca dos animais foi realizada no período chuvoso, a salinidade da água estava em 5.

Ao chegar ao Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura – CEBIAQUA, local onde foi realizado o experimento, os camarões foram aclimatados à temperatura local e estocados em uma caixa d'água com capacidade para 500 L. Antes da estocagem, durante um período de 48 horas, a água da caixa foi recirculada por um filtro ultravioleta e oxigenada abundantemente, utilizando um mini compressor de ar.

Após a estocagem dos camarões, a salinidade foi gradativamente elevada para 20 (salinidade em que foi realizado o experimento), ao longo de 48 horas, período em que os animais não foram alimentados. Após a aclimação, 20 indivíduos foram coletados, ao acaso, para a retirada da hemolinfa e realização das análises iniciais dos imunoparâmetros (dia 0).

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, o qual consistiu de quatro tratamentos com quatro repetições cada, sendo os camarões estocados, aleatoriamente, em monoblocos escuros com volume útil de 40 L, na densidade de 0,4 camarão L⁻¹ e a temperatura da sala ficou em torno de 28±2 °C. Na ocasião da estocagem, os camarões apresentaram pesos e comprimentos médios de 9,51±1,37 g e 11,48±0,81 cm, respectivamente.

Foram realizados três tratamentos com ração contendo a biomassa seca da microalga *C. vulgaris* nas concentrações de 0,5; 1 e 2% (T0,5%; T1% e T2%) e um tratamento controle com ração sem a adição da microalga (T0%). Os camarões foram alimentados na proporção de 1,5% do peso vivo diário e a ração foi oferecida em duas refeições diárias, em bandejas para observar possíveis sobras após cada trato alimentar.

Diariamente, foram realizadas duas renovações da água, totalizando 75% do volume dos monoblocos que também eram tampados, com uma pequena entrada de ar e providos de aeração constante oriunda de um mini compressor. Durante o experimento, que

teve duração de 14 dias, foram contabilizados os animais mortos e, no último dia, os camarões foram novamente pesados e medidos para as análises dos parâmetros de crescimento, bem como extraída a hemolinfa para os testes de imunoparâmetros.

2.4. Experimento 2: Avaliação do desempenho zootécnico e imunológico dos camarões alimentados com ração contendo a microalga após o processo de extração de óleo

Nesse segundo experimento, os camarões foram obtidos na carcinicultura CEAQUA, localizada no município de Beberibe, CE. Machos e fêmeas de *L. vannamei*, aparentemente saudáveis e em estágio de intermuda, foram transportados em uma caixa de 1000 L, contendo água do próprio viveiro de cultivo e suprimento de oxigênio. Como a despesca desses camarões já foi realizada no final do período chuvoso, a salinidade da água estava em 15.

Ao chegar ao laboratório, os camarões foram estocados em uma caixa d'água de 500 L, após a devida aclimação. Da mesma forma do experimento anterior, antes da estocagem dos animais, a água foi esterilizada por radiação ultravioleta e oxigenada abundantemente.

Após a estocagem dos camarões, a salinidade foi gradativamente elevada para 20 (salinidade em que foi realizado o experimento), ao longo de 48 horas e, durante esse período, os animais não foram alimentados. Após a aclimação, 20 indivíduos foram coletados, ao acaso, para a retirada da hemolinfa e realização das análises iniciais dos imunoparâmetros (dia 0).

No momento da estocagem, os camarões apresentaram pesos e comprimentos médios de $10,53 \pm 1,61$ g e $12,32 \pm 0,65$ cm, respectivamente. Diariamente, foram realizadas duas renovações de água, totalizando 100% do volume dos monoblocos, já que o peso médio dos animais foi maior do que o observado nos camarões do primeiro experimento. Finalmente, o delineamento experimental foi exatamente igual ao realizado no experimento 1 (item 2.3), exceto pelo uso de rações contendo as mesmas concentrações da biomassa delipidada da microalga (0,5; 1 e 2%).

2.5. Análise dos parâmetros de crescimento dos camarões

O desempenho zootécnico do camarão marinho *L. vannamei*, em ambos os experimentos, foi avaliado pelos parâmetros de crescimento: sobrevivência (S), biomassa final (B), peso (W) e comprimento (L) médios, ganho médio de peso diário (GMPD), eficiência alimentar (EA) e conversão alimentar aparente (CAA) de acordo com as seguintes expressões (MAINARDES-PINTO; VERANI; TABATA, 1986; CARNEIRO; CYRINO; CASTAGNOLLI, 1999):

(1) Sobrevivência (S):

$$S(\%) = 100 \times \frac{N_f}{N_i}$$

onde:

N_f = número de camarões no final do experimento

N_i = número de camarões no início do experimento

(2) Biomassa final (B):

$$B (\text{Kg m}^{-3}) = \frac{(N_f \times (W_f - W_i))}{1000}$$

onde:

W_f = peso médio (g) no final do experimento

W_i = peso médio (g) no início do experimento

(3) Ganho médio de peso diário (GMPD):

$$\text{GMPD} (\text{g dia}^{-3}) = \frac{(W_f - W_i)}{t}$$

onde:

t = tempo em dias do experimento

(4) Eficiência alimentar (EA):

$$EA (\%) = 100 \times \frac{(W_f - W_i)}{R_e}$$

onde:

Rc = ração consumida durante o experimento (kg);

(5) Ganho de peso final: (Wf - Wi)

(6) Fator de condição (K):

$$K = 100 \times \frac{W}{L}$$

onde:

W = peso médio (g) dos camarões;

(7) Conversão Alimentar Aparente (CAA):

onde:

$$CAA = \frac{RC}{B}$$

B = biomassa final (g).

2.6. Parâmetros físicos e químicos da água

A temperatura (°C) e a concentração de oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) da água foram mensurados utilizando um oxímetro HANNA, e para a leitura do pH, foi utilizado um pHmetro portátil Q-400HM da QUIMIS, sendo todos os parâmetros determinados diariamente.

A cada três dias, foi determinada a quantidade de amônia total na água, utilizando para isso um espectrofotômetro HACH modelo DR 2000. O teor de amônia livre na água foi estimado a partir da amônia total, de acordo com o método descrito por Emerson *et al.* (1975), de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{NH}_3 = \frac{100}{1 + 10^{(2755 / (273 + T) - \text{pH})}}$$

Onde:

T = temperatura da água;

pH = potencial hidrogeniônico da água.

Para a determinação dos teores de nitrato e nitrito na água, avaliados no início, após sete dias e no final dos experimentos, foi utilizado também o espectrofotômetro descrito acima.

2.7. Análise dos parâmetros imunológicos dos camarões

A coleta da hemolinfa dos camarões para a análise dos imunoparâmetros, conforme citado anteriormente, foi realizada no dia 0 (início dos experimentos) e após 14 dias ao final dos experimentos. A coleta foi realizada utilizando um *pool* de, pelo menos, 7 animais de cada tratamento em todos os procedimentos.

A hemolinfa foi coletada diretamente da região ventral dos animais, previamente higienizada com etanol absoluto, entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais, utilizando uma seringa de 1 mL (agulha de 13 x 0,45; 26 G1/2”) previamente resfriada a 4 °C à semelhança do que foi reportado por Yeh e Chen (2009). Imediatamente, uma parte do volume retirado foi separada em dois tubos *ependorfs* contendo soluções anticoagulantes (AC), na proporção de 1:2 (hemolinfa:AC). Um dos tubos continha a solução anticoagulante modificada de Alsever (MAS) - AC (27 mM citrato de sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 9 mM de EDTA, pH 7,4) e o outro a solução fixadora constituída de MAS com formol 4%.

A hemolinfa diluída na solução de MAS, denominada de hemolinfa total (plasma + hemócitos), foi utilizada para os testes de atividade da fenoloxidase e determinação da concentração de proteínas totais. Já a hemolinfa diluída na solução fixadora foi destinada às análises do hemograma para a contagem diferencial dos hemócitos (CDH). Além disso, outra parte da hemolinfa foi depositada em mais um tubo *ependorf* e deixada coagular por 24 h a 4 °C, para obtenção do soro e posterior análise de sua capacidade hemaglutinante. Para obter um maior rendimento do soro, a hemolinfa coagulada foi submetida a repetidas macerações, seguidas de centrifugações a 2.000 x g, durante 10 minutos a 4 °C.

2.7.1. Avaliação da capacidade hemaglutinante da hemolinfa

A titulação de hemaglutininas (lectinas) presentes na hemolinfa dos camarões foi realizada utilizando-se amostras de 50 μL de soro diluídas serialmente em TBS (50 mM Tris, 10 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , pH 7,4) em microplacas de 96 poços com fundo em “U” e incubadas com 50 μL de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2% em TBS por 2 h a 25 °C, em câmara úmida. No controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS e o título aglutinante do soro foi expresso como o recíproco de maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação. Todos os ensaios também foram realizados em triplicata.

2.7.2. Concentração de proteínas totais no soro dos camarões (CP)

A concentração de proteínas totais no soro dos camarões foi determinada, em triplicata, pelo método de Bradford (1976), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

2.7.3. Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da enzima PO foi avaliada depositando-se 50 μL de cada amostra de soro dos camarões diluída 1:14 (35 μL da amostra de soro com adição de 490 μL de TBS) em poços de uma microplaca de fundo chato na presença de 50 μL de tripsina (1 mg mL^{-1}) e 50 μL do substrato enzimático L-DOPA (3 mg mL^{-1}), ambos preparados em água ultrapura. Os hemócitos foram rompidos por choque hipotônico para a liberação de seu conteúdo intracelular e a formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo que foi quantificada em uma leitora de microplacas a 490 nm, após 10 minutos de incubação a 20 °C.

A atividade da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto por miligrama de proteína, onde uma unidade da atividade enzimática correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância por minuto e por miligrama a 20 °C. A atividade basal da PO já

existente no soro foi quantificada incubando-se a amostra com água no lugar de tripsina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.7.4. Contagem diferencial de hemócitos (CDH)

A contagem diferencial de hemócitos (CDH) foi realizada em microscopia de contraste de fase (MCF). Para isso, foi estimada a porcentagem relativa das populações de hemócitos granulares e hialinos contando-se aleatoriamente em câmara de Neubauer, em triplicata, um número mínimo de 100 células por *pool*.

2.8. Análises estatísticas

Para verificar se os diferentes tratamentos influenciaram no crescimento dos camarões em ambos os experimentos, os parâmetros de crescimento foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e, quando foi observada diferença significativa, utilizou-se o teste *t* para comparação de médias ao nível de 5%, utilizando a função estatística do programa Microcal Origin versão 6.0.

Os dados referentes à contagem diferencial de hemócitos (CDH), atividade da fenoloxidase (PO), avaliação da capacidade hemaglutinante da hemolinfa e concentração de proteínas totais no soro dos camarões (CP) também foram inicialmente submetidos a uma análise de variância (ANOVA), onde o fator principal foi o tratamento dentro de cada tempo (dia 0 e 14 dias do início do experimento), ao nível de 1%. Em seguida, foi utilizado o teste de comparação de médias de Duncan, utilizando o programa Biostat versão 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivo da microalga *C. vulgaris* em ambiente interno e externo

A cultura de *C. vulgaris* no ambiente interno apresentou uma DO_{680 nm} inicial de 0,098±0,002 nm e, após um período de quatro dias, a DO_{680 nm} final foi de 0,817±0,032 nm, enquanto no cultivo em ambiente externo a DO_{680 nm} inicial foi de 0,149 nm e, a cada quatro dias, a DO_{680 nm} chegava a 0,581 nm.

Durante os cultivos, as médias da intensidade da radiação solar total às 8; 11; 14 e 17 horas foram de 1,45; 3,23; 2,82 e 0,46 MJ, respectivamente. Como pode se observado, a maior intensidade de radiação solar total ocorreu no final da manhã, às 11 h (3,23 MJ) e a menor no final da tarde, às 17 h (0,46 MJ), ainda menor do que a observada as 8 h da manhã (1,45 MJ).

A temperatura média do ar nos mesmos horários de obtenção dos dados de radiação solar foi de 28,94; 30,85; 31,21 e 29,63 °C, respectivamente. Na primeira determinação diária (8 h), foi verificado o menor valor (28,94 °C) e, às 14 horas, foi registrada a maior temperatura média do ar (31,21 °C).

3.2. Recuperação da biomassa da microalga cultivada no ambiente externo

Em cada produção da microalga cultivada no ambiente externo (400 L), foram obtidos, após a floculação química e secagem, uma quantidade total de 95,41±8,52 g de biomassa seca, correspondendo a um rendimento de 0,02% igual ao obtido por Zheng *et al.* (2011) quando cultivou a mesma espécie em água marinha. Além disso, foi necessária apenas uma produção da microalga nesse ambiente para obter biomassa seca suficiente para a realização de todos os procedimentos experimentais.

3.3. Teor de proteína bruta e lipídios totais de *C. vulgaris*

Os teores de proteína bruta e lipídios totais da microalga *C. vulgaris* cultivada no ambiente externo foram de $25,85 \pm 0,24$ e $57,86 \pm 5,18\%$, respectivamente. Como podemos observar, com relação aos lipídios totais, os resultados foram mais de duas vezes superiores ao melhor rendimento obtido no ambiente interno (Capítulo 3; Tabela 6), provavelmente devido a utilização desse novo meio de cultivo que teve a uréia como fonte de nitrogênio. Além disso, a realização do cultivo em ambiente externo expôs as microalgas à iluminação natural, o que também pode ter contribuído para uma maior produção desse composto.

3.4. Identificação dos ácidos graxos presentes no óleo da microalga

A identificação dos ácidos graxos presentes no óleo da microalga *C. vulgaris* revelou algumas diferenças em sua composição (Tabela 1).

A caracterização do óleo de *C. vulgaris* revelou a presença dos ácidos palmítico, oléico e linoléico, dos quais quase 40% foi de palmítico, um ácido graxo sem nenhuma insaturação. A ausência ou pouca insaturação na cadeia carbônica resulta numa melhor qualidade do óleo para biodiesel, pois cadeias carbônicas com essas características sofrem menos oxidação do que cadeias mais insaturadas (CHISTI, 2007).

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos presentes no óleo obtido de *C. vulgaris* cultivada no ambiente externo.

Ácidos graxos	%
16:0 (palmítico)	38,6
18:1 (oléico)	22,7
18:2 (linoléico)	16,3
18:3 (linolênico)	3,0
Não identificados	19,4

Cerca de quase 20% dos ácidos graxos não foram identificados, dentro dos quais pode estar incluído a série dos insaturados de cadeia longa, que são muito importantes do ponto de vista nutricional, mas foram impossíveis de identificar com o método utilizado.

Mandal e Mallick (2009) cultivaram a microalga de água doce *Scenedesmus obliquus* em diferentes concentrações de nutrientes com o intuito de analisar o conteúdo lipídico e também verificaram que o palmitato e o oleato foram os principais constituintes lipídicos dessa microalga, tornando-a uma fonte adequada para a produção de biodiesel.

Zheng *et al.* (2011) cultivaram em água marinha a mesma espécie de microalga estudada nesse capítulo, e observaram que a composição do óleo foi de 71,76 e 28,24% de ácidos graxos insaturados e saturados, respectivamente. Do total de insaturados, 45 e 23% foram de ácido oléico (18:1) e palmitoléico (16:1), respectivamente. Com relação aos saturados, 23% foi de ácido palmítico (16:0). Essas diferenças com relação ao presente experimento provavelmente são devido às condições de cultivo, principalmente no tocante ao uso de água marinha no lugar de água doce, bem como a composição do meio de cultivo.

Dessa forma, as condições físicas e químicas das culturas influenciam diretamente na qualidade e quantidade dos ácidos graxos produzidos pelas microalgas, tornando-a extremamente importante a caracterização dos lipídios de uma mesma espécie toda vez que são alteradas as condições de cultivo.

3.5. Desempenho zootécnico dos camarões

A tabela 2 mostra os resultados referentes aos parâmetros zootécnicos dos camarões dos camarões marinhos *L. vannamei* após inclusão da biomassa natural ou delipidada de *C. vulgaris* na dieta antes (biomassa natural) e depois do processo de extração de lipídios (biomassa delipidada), relativos aos experimentos 1 e 2, respectivamente.

Não ocorreram diferenças significativas na sobrevivência, comprimento médio final, biomassa final, fator de condição e conversão alimentar aparente dos camarões alimentados com diferentes concentrações da biomassa natural ou delipidada de *C. vulgaris* na ração. Além disso, os valores de sobrevivência, fator de condição e conversão alimentar aparente foram bastante semelhantes para os animais que receberam a biomassa da microalga, independente de ter ou não passado pelo processo de extração de lipídios. No entanto, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos médios finais, ganhos de pesos finais, ganhos médios de peso diários e eficiências alimentares dos animais que receberam a biomassa da microalga na dieta, tanto na forma natural ou delipidada (Tabela 2), apesar dos animais serem obtidos em fazendas de cultivo diferentes.

Tabela 2 - Parâmetros zootécnicos dos camarões dos camarões marinhos *L. vannamei* após inclusão de *C. vulgaris* na dieta antes (biomassa natural) e depois do processo de extração de lipídios (biomassa delipidada). Letras iguais nas linhas indicam ausência de diferenças estatísticas ao nível de 5%.

Parâmetros de crescimento	Biomassa natural			
	TC	T0,5%	T1%	T2%
Sobrevivência (%)	68,75±10,21 ^a	76,56±5,98 ^a	65,63±3,61 ^a	78,13±10,83 ^a
Peso médio final (g)	10,350±0,15 ^a	10,869±0,16 ^b	10,954±0,18 ^b	10,999±0,16 ^b
Comprimento médio final (cm)	11,27±0,95 ^a	11,95±0,58 ^a	11,97±0,57 ^a	11,87±0,59 ^a
Biomassa final (g)	115,35±19,77 ^a	131,82±13,63 ^a	114,57±24,78 ^a	129,70±21,29 ^a
Ganho de peso final (g)	0,850±0,055 ^a	1,369±0,016 ^b	1,454±0,018 ^c	1,647±0,040 ^d
Ganho médio de peso diário (g dia ⁻¹)	0,06±0,01 ^a	0,10±0,01 ^b	0,10±0,01 ^b	0,10±0,02 ^b
Eficiência alimentar (%)	2,87±0,18 ^a	4,62±0,05 ^b	4,91±0,06 ^c	5,56±0,14 ^d
Fator de condição	0,60±0,01 ^a	0,63±0,03 ^a	0,64±0,02 ^a	0,64±0,03 ^a
Conversão Alimentar Aparente	0,26±0,05 ^a	0,23±0,03 ^a	0,27±0,06 ^a	0,23±0,04 ^a
Parâmetros de crescimento	Biomassa delipidada			
	TC	T0,5%	T1%	T2%
Sobrevivência (%)	66,37±8,81 ^a	70,31±10,67 ^a	64,06±9,38 ^a	73,44±5,98 ^a
Peso médio final (g)	11,164±0,17 ^a	11,699±0,22 ^b	11,053±0,18 ^c	11,291±0,15 ^d
Comprimento médio final (cm)	12,26±0,31 ^a	12,29±0,29 ^a	12,21±0,20 ^a	12,34±0,25 ^a
Biomassa final (g)	127,44±22,01 ^a	139,34±22,47 ^a	146,62±15,91 ^a	129,51±25,58 ^a
Ganho médio de peso diário (g dia ⁻¹)	0,05±0,01 ^a	0,08±0,01 ^b	0,04±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a
Eficiência alimentar (%)	1,87±0,09 ^a	3,59±0,26 ^b	1,62±0,07 ^c	2,35±0,11 ^d
Ganho de peso final (g)	0,645±0,029 ^a	1,179±0,085 ^b	0,533±0,022 ^c	0,772±0,036 ^d
Fator de condição	0,57±0,02 ^a	0,57±0,04 ^a	0,58±0,03 ^a	0,56±0,01 ^a
Conversão Alimentar Aparente	0,24±0,03 ^a	0,24±0,04 ^a	0,23±0,02 ^a	0,26±0,05 ^a

Com relação aos camarões do experimento 1, o menor peso médio final foi obtido no tratamento controle, sem a inclusão da biomassa natural de *C. vulgaris* na dieta. Já os animais que receberam a biomassa natural da microalga na dieta apresentaram pesos médios finais significativamente maiores ($p < 0,05$), independente da concentração da biomassa utilizada, mas não foram diferentes entre si. Por outro lado, no caso dos camarões que foram alimentados com a biomassa delipidada, a inclusão de 0,5% dessa biomassa na dieta resultou em um peso médio final significativamente superior ($p < 0,05$) ao dos animais nos demais tratamentos (Tabela 2).

O ganho médio de peso final dos camarões que receberam a biomassa natural da microalga na dieta apresentou valores crescentes com o aumento da concentração da biomassa na ração e estes valores foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos animais do tratamento controle. Por outro lado, no caso dos animais alimentados com a biomassa delipidada, esse comportamento não foi observado, sendo maior do que o controle na inclusão de 0,5%, mas foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) em 1% (T1%), voltando a aumentar ligeiramente com a adição de 2% dessa biomassa na dieta. Além disso, os ganhos de peso finais dos camarões que receberam a biomassa natural de *C. vulgaris* nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0% foram cerca de 1,2; 2,7 e 2,1 vezes superiores aos obtidos nos animais que receberam a biomassa delipidada nas mesmas concentrações, respectivamente.

Esse fato também foi observado para os ganhos médios de peso diário dos camarões alimentados com a biomassa natural nas três concentrações utilizadas, apresentando valores de aproximadamente 1,2; 2,5 e 1,7 vezes maiores do que os encontrados para os animais que receberam a biomassa delipidada nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0%, respectivamente (Tabela 2).

Finalmente, a eficiência alimentar dos animais alimentados com a biomassa natural da microalga também apresentou valores crescentes e significativamente superiores ($p < 0,05$) da obtida nos camarões do tratamento controle. A eficiência alimentar dos animais que receberam a biomassa delipidada aumentou significativamente com a adição de 0,5% dessa biomassa na dieta, porém não apresentou uma tendência crescente e foi reduzida com a adição de 1%, voltando a aumentar com a inclusão de 2% da biomassa delipidada na ração. No entanto, da mesma forma que os ganhos de pesos finais e ganhos médios de peso diário, as eficiências alimentares dos camarões alimentados com 0,5; 1,0 e 2% da biomassa natural da microalga foram superiores, sendo cerca de 1,3; 3,0 e 2,4 vezes maiores do que a eficiência alimentar dos animais alimentados com a biomassa delipidada da microalga (Tabela 2).

Dessa forma, provavelmente a presença de óleo na biomassa de *C. vulgaris* foi fundamental para aumentar o ganho de peso final e eficiência alimentar dos camarões, apresentando valores máximos em 2% da biomassa natural da microalga na ração. Este fato também foi observado para o peso médio final e ganho médio de peso diário, cujos valores foram significativamente diferentes do controle. No entanto, nesses dois casos, o aumento da concentração da biomassa natural na ração não resultou em um maior aumento desses valores.

González-Félix *et al.* (2002a) avaliaram durante 6 semanas o efeito da dieta fosfolípidios (PL) nas necessidades essenciais de ácido graxo de juvenis de *L. vannamei*, com pesos médios de $1,42 \pm 0,10$ g. A taxa de crescimento instantâneo (IGR) dos camarões foi

melhorada pela adição de DHA (docosahexaenóico) ou HUFA (mistura de ácidos graxos altamente insaturados) em 0,25% da dieta. Um maior nível de inclusão na dieta não melhorou o crescimento e resultou em um efeito negativo na sobrevivência dos animais. Além disso, uma inclusão de 3% de fosfolipídeos melhorou significativamente a IGR dos camarões.

Os mesmo autores estudaram os efeitos de uma dieta com fosfolipídios (PL) e diferentes lipídios neutros, sobre o crescimento e sobrevivência de camarões *L. vannamei* após oito semanas de alimentação. As dietas contendo PL apresentaram peso final e taxa de crescimento instantâneo (IGR) significativamente maior e melhor fator de conversão alimentar (FCR) do que aqueles alimentados com dietas sem PL. Estes tratos alimentares tiveram uma maior variedade de ácidos graxos, especialmente de longa cadeia e altamente insaturados (HUFA), e mostrou o maior percentual de araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico (GONZÁLEZ-FÉLIX *et al.*, 2002b).

Apesar do ganho de peso final, peso médio final, ganho médio de peso diário e eficiência alimentar terem sido mais baixos nos camarões alimentados com a biomassa delipidada da microalga, eles foram significativamente diferentes dos obtidos no controle na concentração de 0,5%. Assim, a biomassa delipidada pode ainda apresentar compostos importantes para o desempenho zootécnico dos animais. É interessante notar que o aumento da concentração dessa microalga na ração reduziu os valores desses parâmetros (Tabela 2).

Alguns polissacarídeos apresentam atividade imunoestimulante, como a quitina, um polissacarídeo neutro obtido de crustáceos, além dos polissacarídeos sulfatados extraídos de microalgas e macroalgas (SAKAI, 1999; CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2002). O LPS é um lipopolissacarídeo bacteriano que apresenta forte atividade imunoestimulante (SAKAI, 1999).

Alguns trabalhos reportam que o uso de imunoestimulantes promove um melhor ganho de peso dos animais cultivados. Rivera *et al.* (2002) relataram que o incremento de 10% do extrato da alga marinha parda *Macrocystis pyrifera* na dieta de camarões *L. vannamei* resultou em uma maior biomassa final após 25 dias de administração. Farias *et al.* (2004) reportaram que o uso dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* na ração de reversão de tilápias resultou em um melhor ganho de biomassa quando os animais receberam uma dose de 0,1 mg g⁻¹ de peso vivo dos peixes.

Sakai (1999) relata que o efeito de compostos imunoestimulantes é diretamente dependente de uma dose ideal, pois doses altas podem não melhorar e até mesmo serem inibidoras da resposta imunológica. Assim, a utilização de testes com diferentes concentrações é uma estratégia para a descoberta de doses ótimas que possam ser mais efetivas durante eventos que promovam estresse (BRICKNELL; DALMO, 2005).

A administração de imunostimulantes deve ser bem monitorada, já que alguns podem causar efeitos adversos nos animais. Hauton e Smith (2004) relataram que é muito importante utilizar uma dose ideal, seja ela administrada através de banhos de imersão ou por via oral, já que uma dose exagerada pode causar algum risco de toxicidade, principalmente, quando aplicados a longo prazo. Pesquisas relatam que a utilização de doses mais elevadas podem causar imunossupressão em peixes (SAKAI, 1999). Dessa forma, a administração de uma dose ótima desses compostos é extremamente importante para se obter uma resposta efetiva e vários relatos têm demonstrado que doses baixas surtem um melhor efeito do que doses mais elevadas (TINMAN *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2008).

É interessante notar que a administração da biomassa delipidada de *C. vulgaris* na concentração de 0,5% teve um efeito positivo que não aumentou com a elevação dessa concentração, sugerindo uma possível dose ideal. Assim, os polissacarídeos presentes nessa biomassa podem ter sido responsáveis por tal efeito benéfico nessa concentração específica.

3.6. Parâmetros físicos e químicos da água

Com relação aos parâmetros físicos e químicos da água em ambos os experimentos, a concentração de oxigênio dissolvido foi de $4,48 \pm 0,31$ mg L⁻¹, o pH de $7,95 \pm 0,08$, a temperatura de $26,95 \pm 1,31$ °C, os valores de nitrato de $0,25 \pm 0,006$ mg L⁻¹ e os de nitrito de $0,01 \pm 0,001$ mg L⁻¹. Os valores de amônia total e amônia livre foram de $1,76 \pm 0,34$ e $0,098 \pm 0,02$ mg L⁻¹, respectivamente.

As diferentes espécies de organismos aquáticos regulam seus parâmetros hematológicos de acordo com as condições ambientais, principalmente quando os animais sofrem algum tipo de estresse, tais como variações de temperatura ou pH (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), podendo afetar significativamente a saúde e o desempenho dos indivíduos (NOGA; FRANCIS-FLOYD, 1991).

Segundo Ono e Kubitzka (2003), a concentração de oxigênio e a temperatura da água em cultivos de organismos aquáticos devem ser superiores a 3 mg L⁻¹ e 28 °C, respectivamente, de forma a assegurar um melhor crescimento e conversão alimentar, enquanto o pH deve ficar na faixa entre 6,5 e 8,0.

Neste trabalho, os valores referentes a todos os parâmetros analisados ficaram dentro do esperado e não comprometeram o desempenho dos camarões durante os

experimentos. A renovação diária da água e a ausência de sobras de ração após a alimentação dos animais contribuiu para a boa qualidade da água nos diferentes tratamentos.

3.7. Parâmetros imunológicos dos camarões

A utilização de parâmetros hematológicos e bioquímicos para avaliar as condições de saúde de um indivíduo ou grupo de indivíduos, bem como auxiliar no diagnóstico de enfermidades, é uma prática comum tanto na medicina humana como na veterinária. Os parâmetros hemato-imunológicos mais empregados em crustáceos são as contagens total e diferencial de hemócitos (hemograma); a atividade da enzima fenoloxidase (PO); o índice de fagocitose dos hemócitos; a produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs); a atividade antimicrobiana, o título aglutinante e a concentração total de proteínas do plasma (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Fu *et al.* (2007) utilizaram diferentes vias (oral, imersão e injeção) para administrar os PS da alga marinha vermelha *Gelidium amansii* em camarões *L. vannamei* infectados com a bactéria *Vibrio alginolyticus*. De acordo com os autores, além da administração por via oral ser mais viável na prática, ainda resultou no melhor resultado contra a infecção pelo patógeno.

Yeh *et al.* (2010) cultivaram o camarão branco *L. vannamei* em água do mar (salinidade 35) contendo extrato aquoso da macroalga *Gracilaria tenuistipitata* nas concentrações 0 (controle); 200; 400 e 600 mg L⁻¹ durante três horas e, em seguida, avaliaram vários parâmetros imunológicos. Os resultados mostraram que a contagem diferencial de células hialinas (HCs) e células granulares (GCs), a contagem total de hemócitos (THC), a atividade da fenoloxidase (PO), o *burst* respiratório (RB), a atividade da superóxido dismutase (SOD), e a concentração de proteínas da hemolinfa dos camarões imersos em 600 mg L⁻¹ foram significativamente maiores quando comparados ao tratamento controle (sem extrato).

3.7.1. Avaliação da capacidade hemaglutinante da hemolinfa

A atividade hemaglutinante do soro dos camarões alimentados com ração contendo ou não (controle) a biomassa natural da microalga *C. vulgaris* em diferentes concentrações não apresentou diferenças significativas, exceto para o soro dos animais alimentados com a ração contendo 2% de biomassa, cujos títulos aglutinantes, em média, ficaram abaixo dos demais valores (Figura 1A).

Em relação aos animais alimentados com a ração contendo a biomassa delipídada, a atividade hemaglutinante do soro dos animais do tratamento com adição de 1% de biomassa foram similares à dos animais antes do início do experimento (dia 0), enquanto que os demais tratamentos (0; 0,5 e 2%) foram similares entre si e não diferiram do controle (Figura 1B).

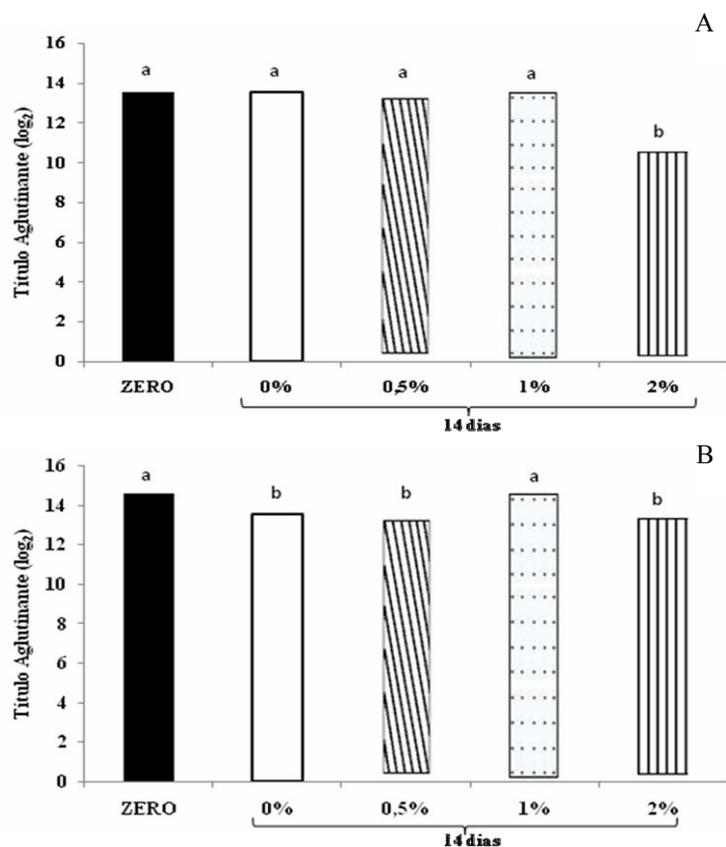


Figura 1 - Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho do soro de camarões *L. vannamei* alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,01$).

Segundo Barracco, Perazzolo e Rosa (2008), algumas infecções ou outras situações estressantes podem resultar em alterações dos títulos aglutinantes da hemolinfa de

crustáceos, no entanto, nem sempre os títulos de aglutinação irão variar significativamente entre si.

Um aumento do título aglutinante da hemolinfa dos camarões que receberam 1% da biomassa delipidada da microalga foi significativamente superior ao do controle e dos que receberam 0,5 e 2% dessa biomassa. Coincidentemente, os camarões que receberam 1% também apresentaram a menor eficiência alimentar e menor ganho de peso final quando comparados com o controle e demais tratamentos (Tabela 2). A redução significativa do título de aglutinação da hemolinfa dos camarões que receberam 2% da biomassa natural de *C. vulgaris* na dieta pode ser um indicativo de um menor nível de estresse.

Costa (2007) mostrou que o estresse provocado pelo elevado grau de infecção com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) em camarões *L. vannamei* resultou em um aumento na capacidade hemaglutinante da hemolinfa dos animais.

Maggioni *et al.* (2004), ao submeter fêmeas de *L. vannamei* ao processo de ablação, comumente realizado em reprodutores para maturação sexual, encontraram uma redução significativa do título aglutinante da hemolinfa em resposta a esta prática, enquanto camarões da espécie *Farfantepenaeus paulensis* não apresentaram alterações da atividade hemaglutinante da hemolinfa quando expostos a situações de estresse fisiológico e ambiental (PERAZZOLO *et al.*, 2002).

3.7.2. Concentração de proteínas totais no soro dos camarões (CP)

A concentração de proteínas no soro dos animais alimentados com a ração contendo a biomassa de *C. vulgaris* natural ou delipidada, de uma maneira geral, foi maior do que as observadas nos controles e semelhantes às detectadas no soro dos animais do dia zero. (Figuras 2A e 2B).

Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que a biomassa da microalga possui proteínas que foram assimiladas pelos animais alimentados com a biomassa natural ou delipidada na dieta. Dessa forma, o teor proteico das rações contendo a microalga foi superior, resultando em uma maior concentração desse composto no soro dos animais.

É interessante salientar que a concentração de proteínas no soro dos animais do dia zero também foi superior a do controle e geralmente semelhante às observadas no soro dos animais tratados com a biomassa da microalga natural ou delipidada, o que pode ser explicado

pelo fato desses primeiros terem acabado de chegar do viveiro de cultivo, onde além de se alimentarem da ração também consomem alimento natural e animais invertebrados, podendo aumentar assim os níveis de proteína assimilada. Dessa forma, o processo de extração de lipídios não afetou o teor de proteínas da biomassa da microalga, visto que as concentrações no soro dos animais tratados com a biomassa da microalga foi bastante semelhante, independente da mesma ter ou não passado pelo processo de extração desse composto.

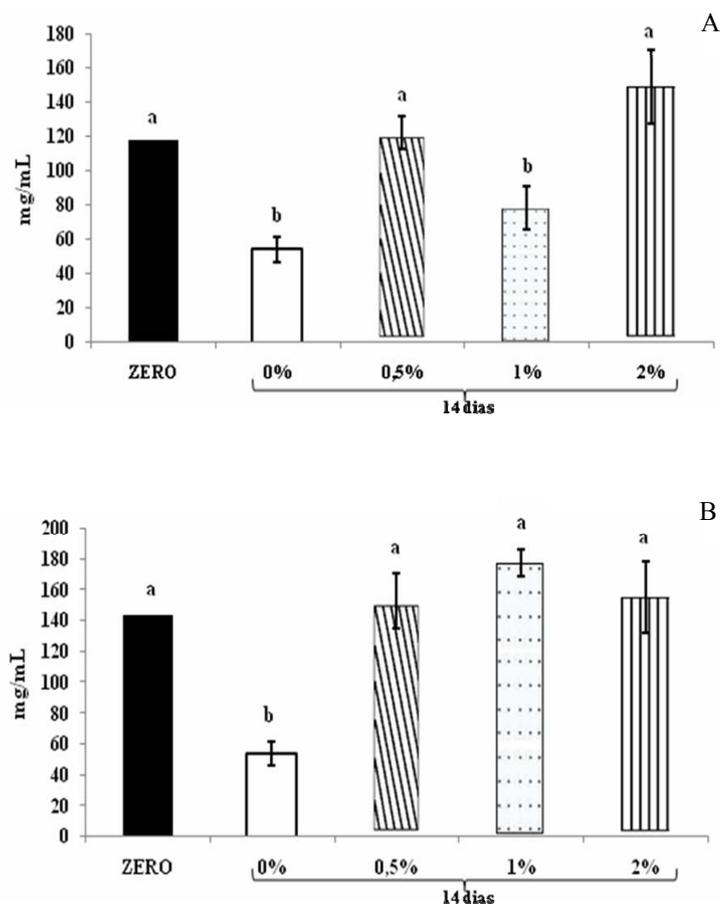


Figura 2 - Concentração de proteínas totais no soro (CP) dos camarões alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,01$).

De fato, a extração lipídica é bem específica e realmente pode manter as quantidades de outros compostos na biomassa, como os polissacarídeos por exemplo. Essas macromoléculas presentes na biomassa da mesma espécie de microalga utilizada no presente trabalho permanecem mesmo após a extração de lipídios (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Em juvenis saudáveis de *L. vannamei* mantidos em laboratório, a concentração de proteínas no plasma é em torno de 120 mg mL^{-1} , porém essa concentração pode variar de

acordo com o manejo, como por exemplo, a quantidade de proteínas ofertada na ração (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000). Como podemos observar, de uma maneira geral, as concentrações de proteínas no soro dos animais do dia zero e que receberam a microalga na ração ficaram até mesmo ligeiramente superiores do valor supracitado para camarões saudáveis, já que esses animais receberam mais proteína na dieta, seja do alimento presente no viveiro de cultivo ou através da inclusão da biomassa da microalga na ração.

Cantelli (2009) observou uma quantidade muito baixa de proteínas totais no soro de camarões infectados ou não com WSSV, que segundo a autora pode ser explicada pelo baixo consumo alimentar dos animais ao longo de todo o experimento.

A concentração total de proteínas na hemolinfa de camarões também é um parâmetro que muito relaciona com a condição dos animais cultivados e é muito utilizada para avaliar o estado de saúde destes organismos, sendo sensivelmente afetada por fatores ambientais e fisiológicos ou durante infecções e presença de lesões (VOGAN; ROWLEY, 2002).

Costa (2007) ao submeter camarões da espécie *L. vannamei* a desafio com IMNV, evidenciou valores de 105,5 a 141 mg mL⁻¹ na concentração de proteínas para animais assintomáticos e em estado avançado de infecção, respectivamente. Neste caso, os maiores valores encontrados para os animais infectados pode ser explicado pelo aumento da quantidade de proteínas responsáveis pela capacidade de hemaglutinação da hemolinfa, já que a expressão gênica dessas moléculas (lectinas) aumenta no caso de infecções virais severas em camarões *L. vannamei* (ZHAO *et al.*, 2007).

3.7.3. Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da PO no soro dos animais tratados com ração comercial contendo biomassa da microalga *C. vulgaris*, não diferiram entre si, independente da concentração utilizada e da biomassa ter ou não sofrido o processo de extração de lipídios, mas foram significativamente menores do que a observada no soro daqueles alimentados com a ração sem a biomassa da microalga (controles) e mais próximos daqueles do dia zero (Figura 3A e 3B).

Cantelli (2009) observou não haver alteração da atividade da PO em animais tratados ou não com polissacarídeos sulfatados, mas houve uma redução em animais

infectados com WSSV. Segundo a autora, quantidades baixas de hemócitos podem ser um dos fatores responsáveis pelas quantidades baixas da enzima PO, visto que estes estão diretamente relacionados com a liberação da mesma na hemolinfa de camarões.

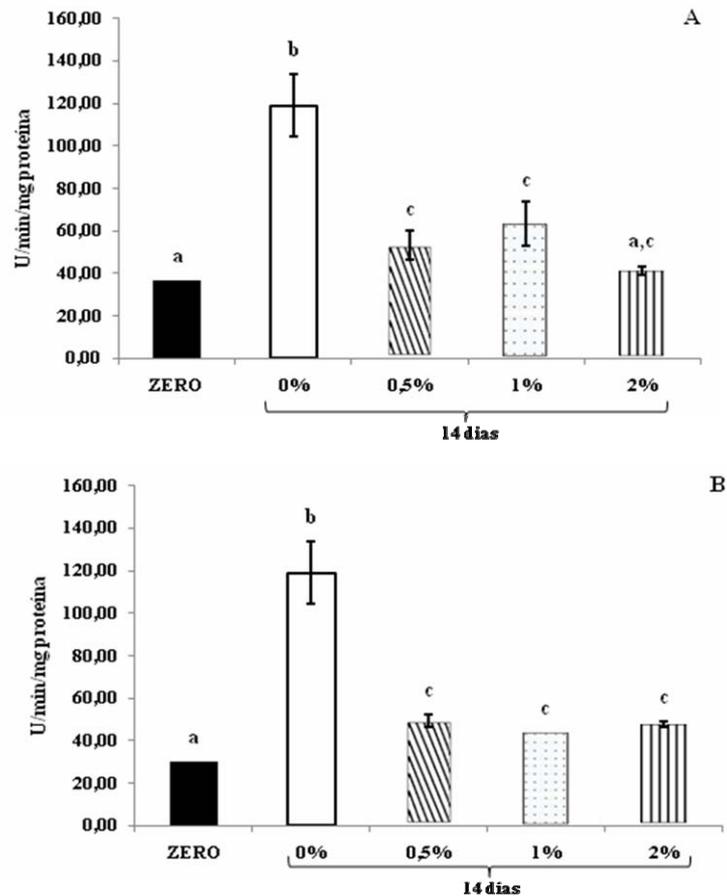


Figura 3 - Atividade da fenoloxidase (PO) no soro dos camarões alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,01$).

Os valores significativamente maiores da atividade da PO nos animais que não receberam a biomassa natural ou delipidada da microalga na ração pode indicar que esses animais estão mais susceptíveis aos efeitos do estresse, enquanto nos tratamentos em que os animais, de alguma forma, ingeriram alimento natural se mostraram mais resistentes ao estresse experimental.

Huang, Zhou e Zhang (2006) mostraram que a inclusão de um extrato de polissacarídeos da alga marinha parda *Sargassum fusiforme* em diferentes concentrações na dieta de camarões *Fenneropenaeus chinensis* resultou em uma redução da atividade dessa enzima no soro dos animais.

As macroalgas marinhas são grandes fontes de polissacarídeos sulfatados que exibem uma série de atividades biológicas (FARIAS, 2000), no entanto essas moléculas também podem ser extraídas de microalgas (CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2002). Dessa forma, a presença de compostos com possíveis atividades imunoestimulantes na biomassa de *C. vulgaris* antes e depois da extração de lipídios pode ter reduzido o estresse dos animais que dela se alimentaram ou que se consumiram alimento natural ou organismos invertebrados presentes nos viveiros de cultivo (dia zero).

A ativação do sistema profenoloxidase (proPO) é reconhecida como uma das principais respostas de reconhecimento nestes animais, podendo ser desencadeada por carboidratos de superfície de microrganismos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004), resultando na ativação desse sistema (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000).

A atividade desta enzima pode ser limitada ou não por fatores ambientais. Algumas espécies de camarões submetidos a condições de estresse por ablação não apresentaram alterações de atividade desta enzima (PERAZZOLO *et al.*, 2002; MAGGIONI *et al.*, 2004). Outras, porém, mostraram ter a atividade da enzima afetada pela presença de infecções ou lesões (VOGAN; ROWLEY, 2002; SARATHI *et al.*, 2007).

3.7.4. Contagem diferencial de hemócitos (CDH)

A contagem diferencial de hemócitos mostrou que os hemócitos granulares (HG), nos quais estão incluídos os semi granulares foram predominantes em todas as análises. No dia zero, no experimento onde os camarões foram alimentados com ração comercial enriquecida com a biomassa natural da microalga *C. vulgaris* (Figura 4A), a quantidade de HGs foi superior ($p < 0,01$) quando comparada aos demais tratamentos, com exceção do controle e daquele com inclusão de 2% da biomassa na dieta. Já as contagens de HGs dos animais que receberam 0,5 e 1% não diferiram entre si, mostrando uma maior proteção dos animais contra o estresse na maior inclusão da mesma.

No experimento em que os camarões foram alimentados com ração comercial enriquecida com a biomassa delipídada de *C. vulgaris* não foram encontradas diferenças significativas entre as contagens de HGs dos animais que receberam essa biomassa na dieta independente da concentração utilizada. No entanto, aqueles que não receberam a microalga

(controle) e os alimentados com 0,5% dessa biomassa apresentaram contagens de HGs superiores ($p < 0,01$) à obtida dos animais do dia zero (Figura 4B).

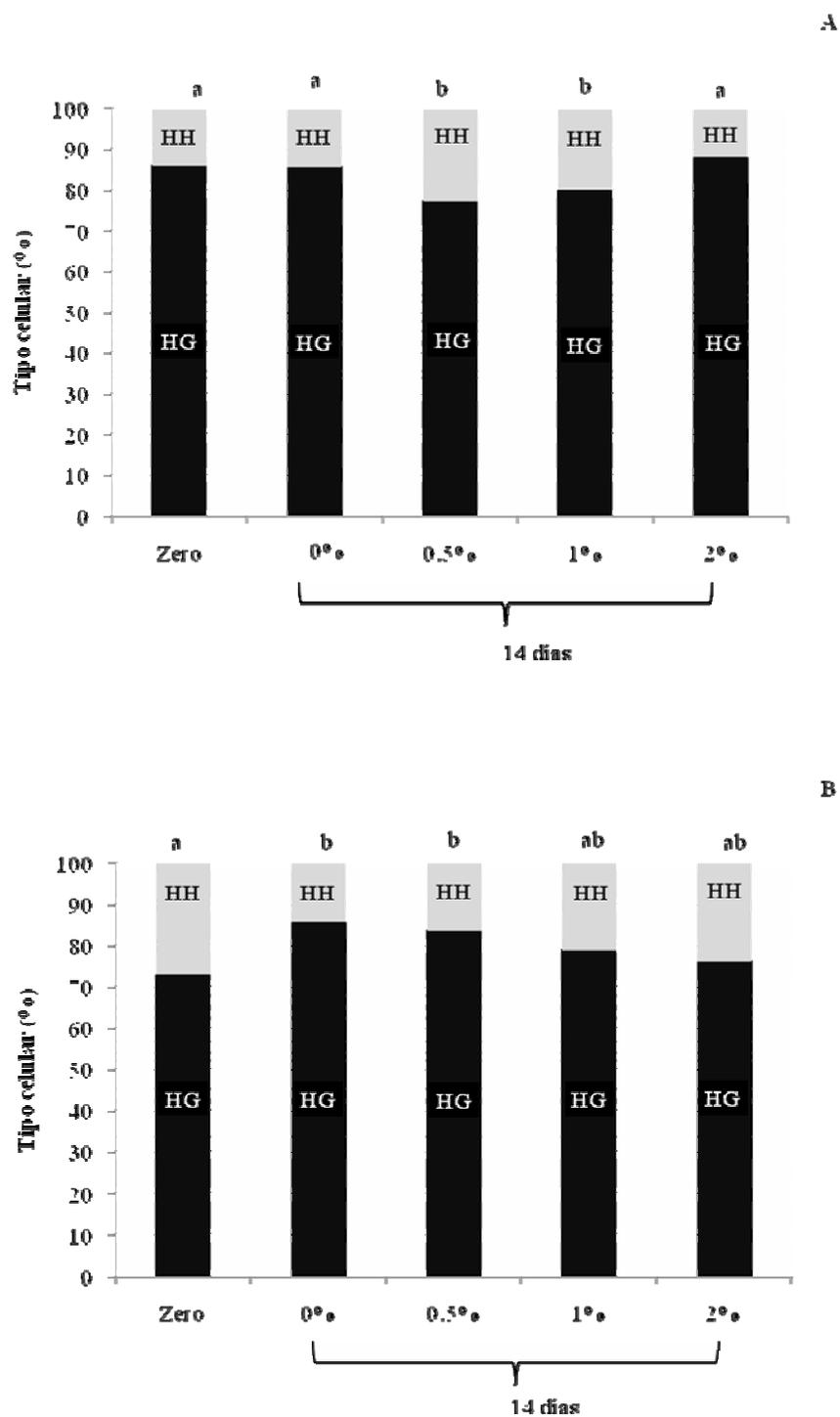


Figura 4 - Contagem diferencial de hemócitos (CDH) na hemolinfa dos camarões alimentados com ração comercial enriquecida com diferentes concentrações da biomassa da microalga *C. vulgaris*, antes (A) e após o processo de extração de lipídios (B). Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,01$).

Cantelli (2009) observou uma redução de 40% na quantidade de HGs na hemolinfa do camarão *L. vannamei* após uma infecção com vírus da mancha branca (WSSV). Em camarões peneídeos, este tipo celular é o preferido por este vírus, podendo essas células migrar para órgãos linfóides, bem como sofrer apoptose para evitar a propagação da infecção.

No presente trabalho, apesar de ter sido encontrada diferença significativa entre algumas contagens de HGs, a maior variação foi de apenas 10%, não sendo suficiente para explicar qualquer tipo de problema na saúde dos animais, já que apenas uma infecção fraca é suficiente para reduzir em quatro vezes esse valor (CANTELLI, 2009).

4. CONCLUSÃO

Com a realização desse experimento foi possível constatar que alguns parâmetros zootécnicos de crescimento dos camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* foram otimizados no experimento que utilizou inclusão da biomassa natural de *C. vulgaris* no lugar da biomassa delipidada. No entanto, a inclusão de 0,5% da biomassa delipidada da microalga na dieta dos animais também apresentou resultados satisfatórios.

Os lipídios extraídos da biomassa de *Chlorella vulgaris* apresentaram um rendimento bastante satisfatório e foram constituídos, principalmente, de ácido palmítico e oléico, muito interessantes na produção de biodiesel.

Com relação aos imunoparâmetros, a concentração de proteínas totais no soro dos camarões alimentados com a biomassa natural ou delipidada da microalga *C. vulgaris* aumentou significativamente em relação aos controles e a atividade da fenoloxidase foi significativamente reduzida, independente da concentração utilizada na ração.

5. REFERÊNCIAS

ALDAY-SANZ, V. Why shrimp cannot be vaccinated? **Global Aquaculture Advocate**, New Jersey, v. 10, n. 1, 2007. 84 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. Estatística da pesca, em 2004, produção estimada por modalidade, segundo as regiões e unidades da federação. Natal, 2004. Disponível em: <<http://www.mercadodapesca.com.br>>. Acesso em: 2 out. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Estatísticas do setor pesqueiro e da carcinicultura brasileira**. Natal, 2010. 6 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Method Ca 5a-40, Free fatty acids. In: Firestone, D. E. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign IL: AOCS Press, 1997.

ARAUJO, G. S. *et al.* Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 4, p. 548-554, 2008.

AZAD, I. S. *et al.* Routes of immunostimulation vis-a-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 248, n. 1-4, p. 227-234, 2005.

BARBIERE, R. C. Jr.; OSTRENSKY, A. **Camarões marinhos: engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 370 p.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunologia de crustáceos, com ênfase em camarões. In: VIELKA, M. Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.). **Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos**. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá:Rep. de Panamá, 2008. p. 169-224.

BARROSO, F. E. C. *et al.* Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 1, p. 58-63, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOONYARATPALIN, S. *et al.* Effects of peptidoglycan PG on growth, survival, immune responses, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: SHARIFF, M., SUBASIGHE, R. P., ARTHUR, J. R. (Eds.). **Diseases in Asian Aquaculture**. vol. 2. Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 1995. p. 469-477.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, Dordrecht, v. 72, p. 249-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado**. Brasília: MAPA, 2001. 276 p.

BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 19, n. 5, p. 457-472, 2005.

BUCHELI, P. *et al.* A necrose hepatopancreática (NHP) do *Litopenaeus vannamei* – Caracterização e diagnóstico preliminar pelo método de avaliação da deterioração de tecidos (ADT). **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 86, p. 31-37, 2004.

CAMPA-CÓRDOVA, A. I. *et al.* Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 12, n. 4, p. 353-366, 2002.

CANTELLI, L. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdie* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CARNEIRO, P. C. F.; CYRINO, J. E. P.; CASTAGNOLLI, N. Produção da tilápia vermelha da Flórida em tanques-rede. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 673-679, 1999.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, Malden, v. 198, n. 1, p.116-126, 2004.

CERENIUS, L.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, Cambridge, v. 29, p. 263-271, 2008.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

COOK, M. T. *et al.* Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 14, n. 4, p. 333-345, 2003.

COSTA, A. M. **Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da monecrose infecciosa (IMNV)**, 2007. 51f. Dissertação (Pós-Graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CUZON, G. *et al.* Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 235, p. 513-551, 2004.

EMERSON, K. *et al.* Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The definition of aquaculture and collection of statistics. **Aquaculture Minutes**, Rome, n. 7, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. In: _____. **Examen mundial de la pesca y la acuicultura**. Roma, 2007. cap. 1, p. 3-67.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010. 218 p.

FARIAS, W. R. L. **Purificação, caracterização estrutural e atividades anticoagulante e antitrombótica de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis***. 2000. 103 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 86, n. 6, p. 1540-1546, 2001.

FARIAS, W. R. L. *et al.* Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 35, número especial, p. 189-195, 2004.

FARIAS, W. R. L. *et al.* A Novel Antinociceptive Sulphated Polysaccharide of the Brown Marine Alga *Spatoglossum schroederi*. **Natural Product Communications (Online)**, v. 6, p. 863-866, 2011. Disponível em: <www.coleaquiolink>. Acesso em: 29 ago. 2011.

FU, Y. W. *et al.* The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 22, n. 6, p. 673-685, 2007.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 15, p. 17-26, 1995.

GESTEIRA, T. C. V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinocultura brasileira. In: SILVA-SOUZA, A. T. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá, PR: ABRAPOA, 2006. cap. 13, p. 137-158.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L. *et al.* Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 207, p. 151-167, 2002a.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L. *et al.* Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 205, p. 325-343, 2002b.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds.). **Culture of marine invertebrate animal**. New York: Plenum Publishing, 1975. p. 29-60.

HAUTON, C.; SMITH, V. J. In vitro cytotoxicity of crustacean immunostimulants for lobster (*Homarus gammarus*) granulocytes demonstrated using the neutral red uptake assay. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 17, n. 1, p. 65-73, 2004.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *In vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **Aids Research and Human Retroviruses**, Larchmont, v. 12, n. 15, p. 1463-1471, 1996.

HOLMBLAD, T.; SÖDERHÄLL, K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, p. 111-123, 1999.

HUANG, X.; ZHOU, H. Q.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 20, n. 5, p. 750-757, 2006.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213-236, 2006.

JOHANSSON, M. W. *et al.* Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, p. 1079-1087, 1995.

JURGENFELD, V. Suspeita de vírus em camarão de SC. Valor Econômico-SP. Disponível em: <<http://www.agribands.com.br>>. Acesso em: 21 fev. 2005.

LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 421-437, 2002.

LIN, Y. C.; VASEEHARAN, B.; CHEN, J. C. Molecular cloning and phylogenetic analysis on α 2-macroglobulin of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, p. 317-329, 2008.

LIU, C. H. *et al.* Molecular cloning and characterisation of a cell adhesion molecule, peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 17, p. 13-26, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.

MAGGIONI, D. S. *et al.* Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 241, p. 501-515, 2004.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; VERANI, J. R.; TABATA, Y. A. Estudo comparativo do crescimento de *Oreochromis* (Osteicties cichlidade) em cultivo de monosexo: crescimento em comprimento e peso, rendimento em biomassa. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, p. 85-93, 1986.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 281-291, 2009.

MARTINEZ-CORDOVA, L. R. *et al.* Evaluation of three feeding strategies on the culture of white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931 in low water exchange ponds. **Aquaculture Engineering**, Oxford, v. 17, p. 21-28, 1998.

MUÑOZ, M. *et al.* Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, p. 89-107, 2000.

NOGA, E. J.; FRANCIS-FLOYD, R. Medical management of channel catfish: the environment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 1, p. 160-166, 1991.

NUNES, A. J. P. **Manual Purina de alimentação para camarões marinhos**. Paulínia, SP: Agribands Purina do Brasil, 2000. 40 p.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, C.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 72, p. 23-33, 2002.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 83, p. 37-51, 2004.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanques-rede**. 3. ed. Jundiaí, 2003. 112 p.

PARK, H. H.; JEONG, H. D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 135-143, 1996.

PERAZZOLO, L. M. *et al.* Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 214, p. 19-33, 2002.

RIVERA, G. *et al.* Inclusion de harina de kelp (*Macrosystis pyrifera*) em alimentos balanceados para camarón. In: Congresso Iberoamericano Virtual de Aqüicultura, 1., 2002, Zaragoza, España. 2002. p. 244-252. Disponível em: <<http://www.civa2003.org>>. Acesso em: 19 maio 2002.

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J. A. Carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, Recife, ano 6, n. 1, p. 30-36, 2004.

RODRÍGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, p. 109-119, 2000.

RODRIGUES, R. S. *et al.* Rendimento e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados da microalga *Chlorella vulgaris* após extração lipídica. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 16., 2009, Natal. [**Anais...**]. Natal: [s.n.], 2009.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.

SAKAI, M. *et al.* The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Diseases in Asian. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 1, p. 413-417, 1992.

SAMPAIO, Y.; COSTA, E. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, Natal, ano 5, n. 1, p. 60-64, 2003.

SARATHI, M. *et al.* Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 271, p. 8-20, 2007.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 23-28, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144 p.

TINMAN, S. *et al.* Effect of long-term oral administration of peptidoglycan (PG- Ajinomoto product) on growth rate and immunostimulant response of hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. niloticus*). In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 9., 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: [s. n.], 2000. p. 524-532.

VADSTEIN, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, n. 1-4, p. 401-417, 1997.

VARGAS, R. M. **Transesterificação de óleos vegetais, catalisada por bases não-iônicas, em fases homogênea e heterogênea**. 1996. 135 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1996.

VOGAN, C. L.; ROWLEY, A. F. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 205, p. 237-252, 2002.

YEH, S.T; CHEN, J.C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hotwater extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 5, p. 724-730, 2009.

YEH, S. *et al.* White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 5-6, p. 887-894, 2010.

ZHAO, Z. Y. *et al.* Profiling of differentially expresses genes in hepatopancreas os white pot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 520-534, 2007.

ZHENG, H. *et al.* Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1215-1224, 2011.