



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

JOÃO HENRIQUE CAVALCANTE BEZERRA

**PRODUÇÃO DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* E SEU USO COMO
ADITIVO NA RAÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

FORTALEZA

2020

JOÃO HENRIQUE CAVALCANTE BEZERRA

PRODUÇÃO DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* E SEU USO COMO
ADITIVO NA RAÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B469p Bezerra, João Henrique Cavalcante.
PRODUÇÃO DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* E SEU USO COMO ADITIVO NA
RAÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* / João Henrique Cavalcante Bezerra. –
2020.

74 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto.

1. camarão. 2. microalga. 3. hemócitos. I. Título.

CDD 551.46

JOÃO HENRIQUE CAVALCANTE BEZERRA

PRODUÇÃO DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* E SEU USO COMO
ADITIVO NA RAÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Ernesto Arruda Bezerra (Presidente)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Kelma Maria do Santo Pires Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antonio Glaydson Lima Moreira
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Dr. Antonio Diogo Lustosa Neto
Associação dos Engenheiros de Pesca (AEP)

Dedico esse trabalho primeiramente a DEUS e todos da minha família, João Bezerra (Pai), Maria Eunice Cavalcante Bezerra (Mãe), Rosalívia C. Bezerra (Irmã), Roselânia C. Bezerra (Irmã), Roseane C. Bezerra (Irmã), Débora Jeimmy (Esposa) e filhos Nalu Sabino, Klara Morenna e John Bezerra.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores que partiram para a eternidade, Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias e Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto por suas dedicações na transmissão de conhecimentos.

Aos amigos Anderson Alan Coêlho, Leonardo Galvão, Giancarlo Lavor, Danilo Cavalcante, Daniel Vasconcelos e Ruan Lopes, pois sem eles a execução dessa tese seria mais dificultosa e por fim e não menos importante, agradecer ao funcionário do departamento de Engenharia de Pesca Sidcleyton.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta tese.

Aos membros da banca, os Professores Dr. Luis Ernesto Arruda Bezerra, Dr. Marcelo de Oliveira Soares, Dr^a. Kelma Maria do Santo Pires Cavalcante, Dr. Antonio Glaydson Lima Moreira, Dr. Antonio Diogo Lustosa Neto.

Vocês me chamam de Mestre e de Senhor e têm razão, pois sou mesmo. Se Eu, o Senhor e Mestre, lavaram os pés de vocês, então vocês devem lavar os pés uns dos outros. Pois eu dei o exemplo para que vocês façam o que eu fiz. (JESUS CRISTO, em João 13, 13-15).

RESUMO

A produção mundial de pescado para o ano de 2016 foi de 170,9 milhões de toneladas, com a estagnação da pesca a aquicultura tornou-se a principal fonte de pescado no mundo devido ao seu crescimento acelerado nas décadas. A carcinicultura é o ramo voltado para a criação de crustáceos, tendo como destaque o camarão *Litopenaeus vannamei* que deve uma queda na sua produção nos principais países, principalmente devido ao problema de doença, sendo necessário buscar alternativas para aumentar o sistema imunológico da espécie. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito imunoestimulante da microalga *Nannochloropsis oculata* no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, bem como avaliar e comparar o crescimento e o rendimento lipídico da microalga *N. oculata* em meio Guillard f/2 com diferentes concentrações de nitrato de sódio, avaliar o crescimento em meio de cultura alternativo a base de ureia e superfosfato triplo (SPT) e os parâmetros zootécnicos do camarão. Foram realizados três experimentos subsequentes. No primeiro, realizou-se o cultivo da microalga *N. oculata* em meio Guillard f/2 em volume de três litros, diferenciando as concentrações de nitrato de sódio (15, 30, 45, 60 e 75 mg L⁻¹) sob as condições de 60 µmol cm⁻² s⁻¹ de intensidade da luz, 28 ± 1°C de temperatura de 28 ± 1°C e 30 de salinidade. No segundo experimento, realizou-se o cultivo da mesma microalga, em três tratamentos, sendo dois em meio Guillard f/2 nas concentrações de nitrato de sódio (15 e 75 mg L⁻¹) e um com meio de cultura alternativo baseado em ureia e SPT, todos os três tratamentos foram em volume de 20L sob as mesmas condições do experimento anterior e finalmente foram testadas quatro dietas no cultivo do camarão. A primeira consistiu apenas em ração comercial com 35 % PB, tratamento controle, no tratamento 1 utilizou-se a biomassa algal obtida no meio Guillard f/2 com 75 mg L⁻¹. No tratamento 2, utilizou-se a biomassa algal obtida no meio Guillard f/2 com 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio e no tratamento 3, utilizou-se a biomassa algal obtida no cultivo realizado no meio alternativo. Em todos os tratamentos a biomassa algal como aditivo foi no teor de 5% da quantidade de ração ofertada. Os resultados demonstraram que quantidade de hemócitos foi reduzida drasticamente ao longo dos dias de cultivo. Porém, dentre os tratamentos observados, os camarões alimentados com a biomassa microalgal cultivada no meio Guillard contendo 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, continham maior quantidade de hemócitos. Quando a *N. oculata* foi submetida às diferentes concentrações de nitrato os melhores resultados de densidade celular máxima e taxa de crescimento específico ocorreram na concentração de 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio no meio Guillard f/2, porém, o rendimento lipídico foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de nitrato. O maior rendimento lipídico ocorreu com 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio presente no meio Guillard f/2 e os resultados no cultivo em meio alternativo obteve a maior densidade celular máxima, maior taxa de crescimento específico e, conseqüentemente, menor tempo de geração dos cultivos.

Palavras chave: camarão, microalga, hemócitos

ABSTRACT

With the stagnation of fishing activities, aquaculture has become the world's main source of fish, due to its accelerated growth in recent decades. Shrimp farming is the productive sector dedicated to the cultivation crustaceans, with emphasis on *Litopenaeus vannamei*, which had a reduction in production rates in several countries, mainly due to problems related to diseases, being necessary to seek alternatives to increase the immune system of this species. The objective of the present work was to evaluate the immunostimulating effect of the microalgae *Nannochloropsis oculata* in the cultivation of *Litopenaeus vannamei*, as well as to evaluate and compare the growth and the lipid yield of the microalgae *N. oculata* in Guillard f / 2 medium with different concentrations of sodium nitrate, evaluate the growth in alternative culture medium based on urea and triple superphosphate (SPT) and the zootechnical parameters of the shrimp. Three subsequent experiments were carried out. In the first, the cultivation of microalgae *N. oculata* was carried out in Guillard f / 2 medium in a volume of three liters, differentiating the concentrations of sodium nitrate (15, 30, 45, 60 and 75 mg L⁻¹) under the conditions of 60 $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ of light intensity, 28 ± 1 °C of temperature and salinity 30. In the second experiment, the same microalgae was cultivated in three treatments, two in Guillard f / 2 medium in the concentrations of sodium nitrate (15 and 75 mg L⁻¹) and one with an alternative culture medium based on urea and SPT. All three treatments were carried out in a volume of 20L under the same conditions of the previous experiment. Finally, four diets were tested in the shrimp culture. The first diet consisted only of commercial feed with 35% CP as a control treatment. In treatment 1, the algal biomass obtained in the Guillard f / 2 medium with 75 mg L⁻¹ was used. In treatment 2, the algal biomass obtained in the Guillard f / 2 medium with 15 mg L⁻¹ of sodium nitrate was used and in treatment 3, the algal biomass obtained in the cultivation carried out in the alternative medium was used. In all treatments, the algal biomass content as an additive was 5% of the amount of feed offered. The results showed that the amount of hemocytes was drastically reduced over the days of cultivation. However, among the treatments observed, shrimp fed with microalgal biomass grown in Guillard medium containing 15 mg L⁻¹ of sodium nitrate, contained a greater amount of hemocytes. When *N. oculata* was submitted to different concentrations of nitrate, the best results of maximum cell density and specific growth rate occurred in the concentration of 75 mg L⁻¹ of sodium nitrate in Guillard f / 2, however, the lipid yield was inversely proportional to the increase in nitrate concentration. The highest lipid yield occurred with 15 mg L⁻¹ of sodium nitrate present in the Guillard f / 2 medium, and the results in cultivation in an alternative medium showed a higher maximum cell density, higher specific growth rate and, consequently, shorter time of crops generation

Keywords: shrimp, microalgae, hemocytes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática das diversas classificações da aquicultura.	18
Figura 2. Ilustração de sistemas abertos de cultivo externos: (A) tanques abertos não agitados; (B) Tanques raceway pista única; (C) Tanques raceway pistas conectadas (D) Tanques circulares.	19
Figura 3. Ilustração de sistemas fechados de cultivo: (A) fotobiorreator tubular horizontal; (B) fotobiorreator tubular espiral; (C) fotobiorreator Airlift; (D) fotobiorreator de sacos plásticos e (E) fotobiorreator placa vertical.	20
Figura 4. (A) Esquema ilustrativo de um fotobiorreator de biofilme; (B) fotobiorreatores de biofilme “Twin layer” cultivando espécies diferentes e (C) fotografia de um biofilme parcialmente colhido.	22
Figura 5. Esquema representativo das principais condições de cultivo de microalgas.	23
Figura 6. Curva de crescimento de uma cultura microalgal em relação à disponibilidade de nutrientes.	25
Figura 7. Fluxograma mostrando aplicações de microalgas em diferentes áreas.	28
Figura 8. Percentual de trabalhos publicados com <i>N. oculata</i> cultivada em diferentes meios de cultura nos últimos cinco anos pesquisados base Web of Science.	29
Figura 9. Ração comercial com biomassa da microalga <i>N. oculata</i> usada como aditivo.	43
Figura 10. Cultivo experimental com camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com ração comercial aditivadas com biomassa microalgal da <i>N. oculata</i>	44
Figura 11. A) Procedimento da retirada da hemolinfa do camarão <i>P. vannamei</i> ; B) Hemolinfa junto anticoagulante em enpefoff	45
Figura 12. Curvas de crescimento da <i>N. oculata</i> cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75 mg L ⁻¹ de nitrato de sódio.	47
Figura 13. Curvas de crescimento da <i>N. oculata</i> cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio de 15 e 75 mg L ⁻¹ e meio alternativo.	51
Figura 14. Médias e desvios-padrão da contagem total de hemócitos nos diferentes tratamentos.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas de coleta de microalgas e suas respectivas vantagens e desvantagens.....	26
Tabela 2. Exemplos de cultivos de <i>N. oculata</i> realizados em diferentes meios, sistemas, volumes, regimes e condições de cultivo.	31
Tabela 3. Dados Comparativos da Carcinicultura no Ceará, nos anos de 2004, 2011, 2015 e 2016.....	35
Tabela 4. Tamanhos das Unidades de Produção por Categoria em 2016 no Ceará	35
Tabela 5. Composição do meio de cultivo Guillard f/2.	39
Tabela 6. Composição do meio de cultivo alternativo.	41
Tabela 7. Solução isotônica anticoagulante para camarão (pH 7,2) (SIC- EDTA)	46
Tabela 8. Concentrações iniciais, finais e a taxa de remoção do nitrato ao final dos cultivos da <i>N. oculata</i> cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75 m L ⁻¹ de nitrato de sódio.	48
Tabela 9. Densidade celular final e rendimento lipídico da <i>N. oculata</i> cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75 m L ⁻¹ de nitrato de sódio.....	49
Tabela 10. Densidade celular final da <i>N. oculata</i> cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio de 15 e 75 mg L ⁻¹ e meio alternativo....	51
Tabela 11. Parâmetros zootécnicos do <i>P. vannamei</i> alimentado com ração adicionada de 5% de biomassa de <i>N. oculata</i> cultivada em diferentes meios de cultura.	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO GERAL	17
2.1	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Algicultura	18
3.1.1	Condições, perfil de crescimento.	23
3.1.2	Técnicas coleta e secagem da biomassa.	26
3.2	<i>Nannochloropsis oculata</i>	27
3.3	<i>Litopenaeus vannamei</i>	32
3.4	Doenças na Carcinicultura	35
3.5	Parâmetros hematológicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Cultivo em meio Guillard f/2 com diferentes concentrações de nitrato de sódio (15, 30, 45, 60 e 75 mg L⁻¹).	39
4.1.1	Concentração e remoção de nitrato	40
4.1.2	Concentração de lipídios totais na biomassa	40
4.2	Cultivo em no meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio de 15 e 75 mg L⁻¹ e em meio alternativo	41
4.3	Uso da biomassa algal como aditivo na ração do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	42
4.3.1	Formulação da ração	42
4.3.2	Delineamento experimental do cultivo do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
4.3.3	Parâmetros de qualidade da água	44
4.3.4	Parâmetros de crescimento zootécnico	44
4.3.5	Análise dos parâmetros imunológicos dos camarões <i>P. vannamei</i> cultivados	45
4.4	Análises estatísticas	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Avaliação dos cultivos de <i>N. oculata</i> em meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio	47
5.2	Avaliação dos cultivos de <i>N. oculata</i> em meio Guillard f/2 com concentrações de 15 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio e em meio alternativo	

5.3	Avaliação uso da biomassa algal como aditivo na ração do camarão	
	<i>Litopenaeus vannamei</i>	52
6.	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado para o ano de 2016 alcançou marca de 170,9 milhões de toneladas (FAO, 2018), onde 90,9 milhões de toneladas (53,2%) foi oriunda da pesca extrativista, na qual se mantém constante desde os anos 2000 e 80,0 milhões de toneladas (46,8%) da aquicultura. Segundo Jiang, (2010) a estagnação da pesca é um problema relacionado à sobreexploração que afeta a segurança alimentar e ao bem-estar social mundial, haja vista que o pescado representa uma das proteínas animal de melhor qualidade, por ser fonte de aminoácidos essenciais, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, minerais e oligoelementos (KLOAS et al., 2015).

Com isso a aquicultura, que envolve o cultivo de organismos que possuem pelo menos uma parte do seu ciclo de vida na água (BRASIL, 2009), tornou-se o setor de alimentos de maior crescimento em todo o mundo devido justamente ser o pescado fonte de proteína e micronutrientes essenciais à saúde humana. Apesar da atividade aquícola não esteja mais em um ritmo de crescimento acelerado como nas décadas de 1980 e 1990 (11,3% e 10,0%, respectivamente, excluindo plantas aquáticas), ainda sim é um dos setores na produção de alimento de maior crescimento, haja vista que no período compreendido entre 2000 e 2016 o crescimento anual médio foi de 5,8% (VIDHYA HINDU et al., 2019).

No Brasil, a Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostrou que em 2017 a aquicultura brasileira produziu 547 mil toneladas de pescado, um volume 5,7% inferior ao ano anterior. Contudo, segundo o próprio órgão, os resultados da PPM podem não revelar uma queda real da produção, e sim, uma atualização dos números da produção, que até então eram contabilizados de forma inadequada (IBGE, 2017).

A carcinicultura é o ramo específico da aquicultura voltada para a criação de crustáceos, tendo como destaque, principalmente o camarão *Litopenaeus vannamei*, haja vista que para o ano de 2016 representou 53% de toda produção de crustáceos cultivados, alcançando 4,2 milhões de toneladas (FAO, 2018). A espécie *Litopenaeus vannamei*, conhecida como camarão branco do pacífico ou camarão cinza é nativa da costa do oceano Pacífico, tendo sua distribuição da Província de Sonora, no México até o Sul de Tumbes, no Peru (YUAN et al., 2016). É um animal que apresenta um rápido crescimento, elevado índice de sobrevivência e tolerância a alta densidade e estocagem (XU; PAN, 2012). Contudo, a produção de camarão nos

principais países produtores declinou, principalmente devido ao problema de doença (SUBASINGHE, 2017). Em 2017, a produção brasileira de camarões foi de 40,9 mil toneladas (IBGE, 2017), representando 45% da maior produção brasileira que foi no ano de 2003, ou seja, antes do surgimento de doenças em território nacional. As pesquisas nos cultivos do camarão tem se direcionado para estudar modos de melhorar o ambiente de cultivo (DE SCHRUYVER; DEFOIRDT; SORGELOOS, 2014) e aumentar o sistema imunológico da espécie cultivada (STENTIFORD et al., 2017), ou seja, buscado implementar medidas de biossegurança, de modo evitar perdas e assim aumentar a produção.

Essas medidas constituem em três linhas de defesa. A primeira linha é uma barreira que consiste em reduzir e/ou prevenir a entrada de patógenos no ambiente de cultivo. A segunda linha visa aumentar resistência ou tolerância do animal ao agente patogênico através de produtos imunoestimulantes e a terceira objetiva reduzir a ação dos indutores de estresse que tornam os camarões mais susceptíveis.

Os imunoestimulantes tem efeito direto nas celulares do camarão que são hemócitos (granulares, semigranulares e hialinos), esses se combinam com o sistema humoral para combater patógenos, curar feridas e responder a estressores bióticos e abióticos (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). O uso de imunoestimulantes pode aumentar a sobrevivência e ou melhorar o crescimento dos animais cultivados (TALPUR; IKHWANUDDIN; AMBOK BOLONG, 2013), apresentando mínimos efeitos colaterais e um melhor custo benefício em relação aos produtos comerciais (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015).

As origens das substâncias imunoestimulantes podem ser naturais ou sintéticas, contudo destacam-se compostos componentes da parede celular de diferentes bactérias, fungos, micro e macroalgas.

As microalgas são microrganismos que possuem clorofila e outros pigmentos fotossintéticos (RAVEN et al., 2001), podendo ser encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, são utilizadas principalmente como alimento natural para pós-larvas de organismos aquáticos em decorrência da facilidade de cultivo, pequeno tamanho, acentuada velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos polinsaturados (KLOAS et al., 2015).

Para o crescimento das microalgas são necessários nutrientes inorgânicos, principalmente nitrogênio e o fósforo, pois são utilizados na síntese de matéria orgânica através da fotossíntese. A deficiência desses nutrientes pode comprometer

o desenvolvimento do cultivo (LOURENÇO, 2006). A concentração de nutrientes no meio de cultura pode influenciar diretamente no desenvolvimento das microalgas, na absorção de nutrientes e no acúmulo de lipídios. (ASLAN; KAPDAN, 2006; FERNANDES et al., 2016; XIN et al., 2010). Em cultivos em que apresenta baixas concentrações de nitrogênio no meio de cultura, há uma tendência de acúmulo de lipídeo, em várias espécies de algas (HU et al., 2008), podendo gerar mudanças na coloração das culturas, que podem apresentar aspecto amarelado (LOURENÇO, 2006).

Nannochloropsis oculata é uma microalga verde unicelular pertencente às *Eutigmatophyceae*. Possui alto teor lipídico, sendo uma espécie promissora para a produção de biodiesel e também é usado como alimento vivo na aquicultura, devido ao seu cultivo fácil e rápido e de pequeno tamanho compatível com o mecanismo de alimentação das larvas (WEI et al., 2013a). A maioria das pesquisas sobre *N. oculata* se concentrou nas condições de cultivo de lipídios produção e sua aplicação como biodiesel, contudo estudos preliminares mostram que o extrato de acetato de etila extraído da *N. oculata* mostrou atividade antimicrobiana (OANH et al., 2019), possuindo assim biomoléculas com poder imunoestimulante.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunoestimulante da microalga *N. oculata* no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o crescimento e o rendimento lipídico da microalga *Nannochloropsis oculata* em meio Guillard f/2 com diferentes concentrações de nitrato de sódio.

Comparar taxas de crescimento meio Guillard f/2 com um cultivo realizado em meio alternativo a base de Úreia e Superfosfato triplo (SPT).

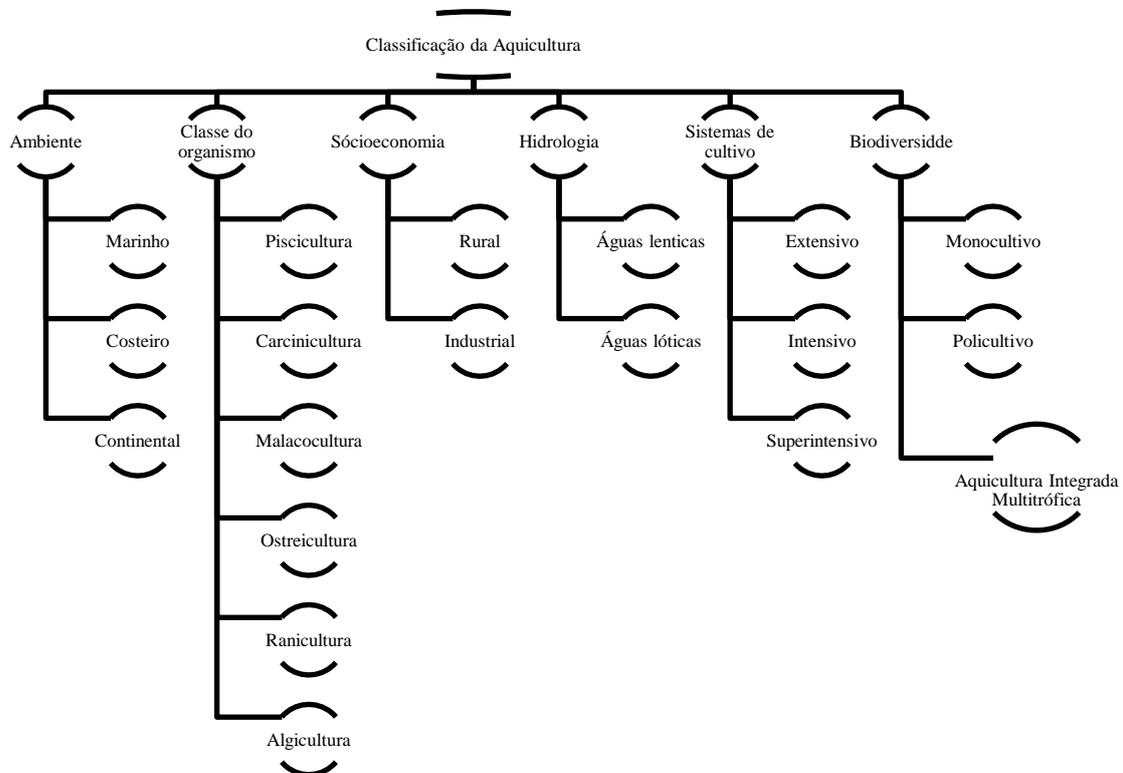
Verificar os parâmetros zootécnicos do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentados com ração aditivados com biomassa de *N. oculata*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Algicultura

A atividade aquícola pode ser classificada por categorias como representada na figura 1. Esta classificação leva em consideração seis aspectos distintos, tais como o ambiente de cultivo, a classe do organismo aquático cultivado, o aspecto socioeconômico, a hidrologia, os sistemas de produção e a biodiversidade do cultivo (VINATEA, 2004).

Figura 1. Ilustração esquemática das diversas classificações da aquíicultura.

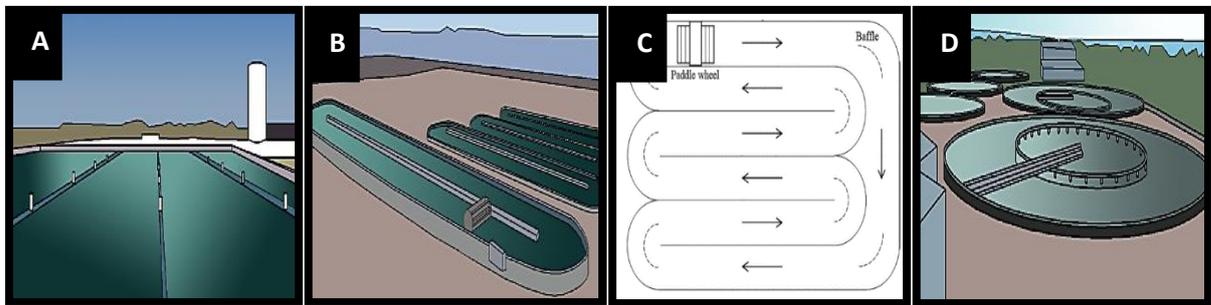


Fonte: modificado de Vinatea (2004).

Em 1960 o cultivo de algas teve seu início em grande escala a cultura de *Chlorella sp.* no Japão (SPOLAORE et al., 2006) a partir de então foram desenvolvidas muitas técnicas para o cultivo e produção de microalgas. De forma geral, a produção microalgal se classifica em sistemas abertos, fechados e híbridos. Mas recentemente vem surgindo um novo modo de produção em biofilmes (CHEW et al., 2018; JOHN et al., 2018; KLINTHONG et al., 2015).

Os sistemas abertos podem ser internos ou externos. Externamente, geralmente são cultivos em larga escala, geralmente em tanques abertos não agitados, pistas raceways e tanques circulares. Em ambientes internos, os cultivos podem ser realizados em tanques de menor porte como em aquários. A utilização de um destes reatores depende principalmente da aplicação requerida. A figura 2 ilustra vários reatores já citados na literatura (CHEW et al., 2018; KLINTHONG et al., 2015; RAZZAK et al., 2013; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Figura 2. Ilustração de sistemas abertos de cultivo externos: (A) tanques abertos não agitados; (B) Tanques raceway pista única; (C) Tanques raceway pistas conectadas (D) Tanques circulares.



Fonte: modificado de (RAZZAK et al., 2013).

Os tanques não agitados são os mais econômicos devido à arquitetura simplificada e fácil manejo. Geralmente são abastecidos com águas naturais e possuem aproximadamente meio metro de profundidade. No entanto, estes reatores possuem desvantagens devidas suas próprias características, pois a dissolução do dióxido de carbono do ar na água de cultivo e a difusão dos nutrientes presentes são mínima e lenta, limitando a taxa de crescimento microalgal, resultando em um baixo rendimento e produtividade. Outro problema decorrente neste tipo de reator é a inibição da penetração da luz solar em função do auto sombreamento causado pela flutuação de algas mortas e vivas, por não haver mecanismo para movimentação do cultivo (CHEW et al., 2018; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Os tanques raceways ou pista de corrida são os reatores abertos mais utilizados atualmente em produções de larga escala. Possuem geralmente profundidade entre 15 e 25 cm para facilitar a penetração da luz em toda a coluna d'água. Podem ser construídos com uma única pista ou um grupo de pistas conectadas. Diferente dos tanques não agitados ocorre agitação do cultivo por rodas de pás, o que mantém a densidade microalgal uniforme e reduz a probabilidade da existência de zonas escuras, além de aumentar a dissolução do dióxido de carbono

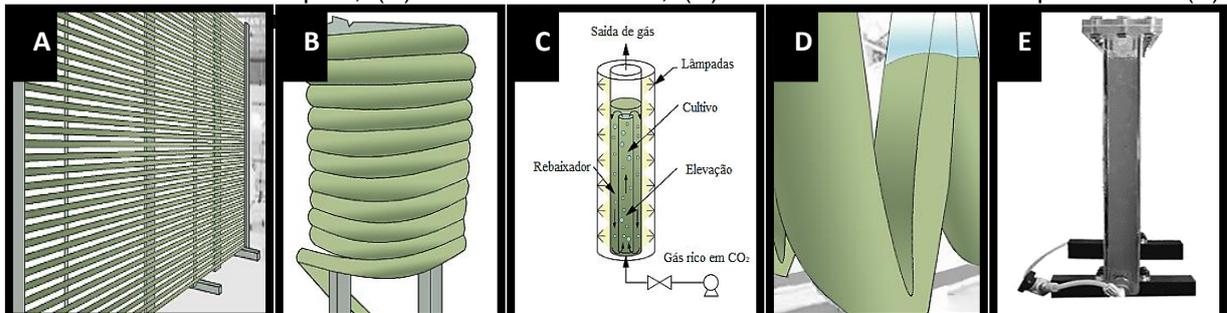
do ar na água e a difusão dos nutrientes (CHEW et al., 2018; KLINTHONG et al., 2015).

Os tanques circulares, por sua vez, derivam de reatores de tratamento de águas residuais. Possuem geralmente um braço rotativo localizado no centro para a movimentação e agitação do cultivo. A profundidade nestes reatores fica na faixa de 20 a 30 cm e o diâmetro geralmente não passam de 50 cm (RAZZAK et al., 2013; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Embora haja muitas vantagens de cultivos em sistemas abertos, existem relevantes limitações. Devido as suas características, possuem baixo consumo de luz pelas células, alta taxa de evaporação, grande exigência de área para produção e fácil contaminação por algas indesejadas e bactérias. Essas limitações poderiam ser superadas usando, por exemplo, capas plásticas translúcidas ou estufas sobre os reatores, porém, os custos com investimento, manutenção e o superaquecimento tornam estas alternativas inviáveis, principalmente em reatores maiores usados em produções comerciais (KLINTHONG et al., 2015; RAZZAK et al., 2013).

Os sistemas fechados de produção de microalgas são chamados de fotobiorreatores. Por serem ideologicamente fechados, reduzem a taxa de evaporação e o crescimento de algas competitivas, predadores e organismos patógenos (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). Os fotobiorreatores, assim como qualquer outro tipo, podem ser expostos a fontes luminosas artificiais, geralmente em escala laboratorial, ou pode ser exposto à luz solar, para produção em escala comercial. Estes fotobiorreatores são desenvolvidos para otimizar a produção microalgal em menor área de cultivo (KLINTHONG et al., 2015; RAZZAK et al., 2013).

Figura 3. Ilustração de sistemas fechados de cultivo: (A) fotobiorreator tubular horizontal; (B) fotobiorreator tubular espiral; (C) fotobiorreator Airlift; (D) fotobiorreator de sacos plásticos e (E)



Fonte: modificado de (RAZZAK et al., 2013).

Um fotobiorreator tubular consiste num conjunto de tubos transparentes feitos de vidro com diâmetros inferiores a 0,1 metro e comprimento de até 80 metros. A microalga passa pelos tubos onde entra em contato com a luz e vai para um reservatório, onde retorna para aos tubos, assim mantendo um fluxo contínuo. A iluminação pode ser operada por luz artificial ou luz solar, para maximizar o contato com a luz nessa última os tubos estão sempre voltados na direção norte-sul. Para evitar a sedimentação o fluxo é turbulento, gerado através de bombas. O sistema pode ser montado na vertical ou na horizontal (CHISTI, 2007).

O fotobiorreator do tipo airlift, diferente dos demais, possui duas zonas interconectadas por um defletor ou um tubo. A movimentação ou agitação do cultivo é ocasionado por fluxos de correntes circulatorias e por conta destas características, além de possuírem a vantagem de realizar o processo de mistura do cultivo com baixa tensão de cisalhamento e proporcionar menor fotoinibição e fotoxidação do cultivo, são relativamente fáceis de operar sob condições estéreis. Porém, este sistema requer maior custo de fabricação e manutenção por utilizar materiais mais complexos (CHEW et al., 2018; RAZZAK et al., 2013).

Os fotobiorreatores de sacos plásticos, por sua vez, são os mais baratos. São geralmente constituídos de polietileno, poliestireno ou polipropileno. Por conta de sua maleabilidade, podem ser pendurados ou colocados em uma estrutura vazada sob a irradiação da luz que pode ser artificial ou solar, dependendo a aplicação. A movimentação do cultivo é geralmente realizada por borbulhamento (RAZZAK et al., 2013).

Os fotobiorreatores de placa vertical realizam a mistura também por borbulhamento e, apesar de semelhante ao airlift, possui maior área irradiada por conta de sua forma achatada, o que resulta em maior rendimento e produtividade algal. São relativamente baratos, fáceis de limpar e são unidades de fácil escalonamento. As principais limitações incluem a dificuldade de controle de temperatura, a possibilidade de exposição dos organismos a altas tensões hidrodinâmicas. (SINGH; SHARMA, 2012)

Fotobiorreatores híbridos são combinações de sistemas abertos e fechados. Surgiram como forma de explorar as vantagens e suprir as desvantagens de cada. Várias combinações podem ser realizadas, por exemplo, em um sistema tubular colocado horizontalmente em uma lagoa de água termostática, a malha externa atua como coletora de luz, amplia a relação entre área superficial e volume e

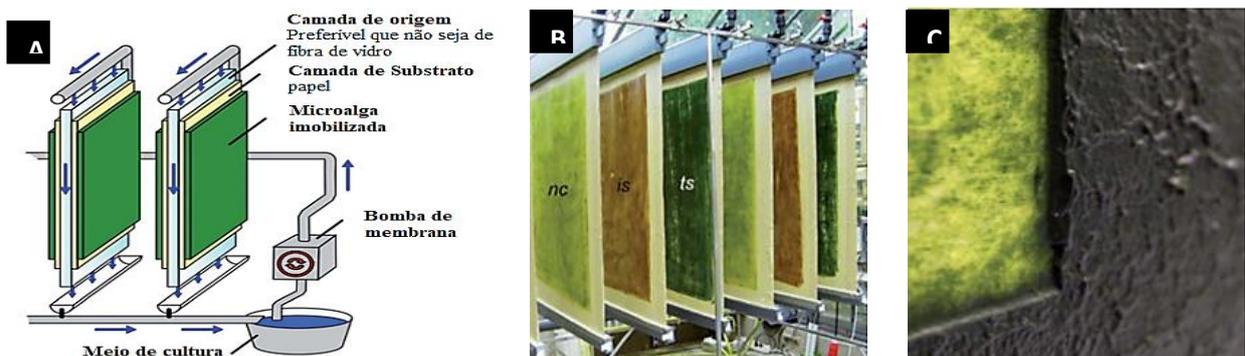
controla a temperatura do cultivo. O sistema de transporte aéreo funciona como degaseificador. Esse sistema híbrido possui melhor controle sobre as variáveis de cultivo, permitindo maiores produtividades e reduzindo o consumo de energia (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017)

Outro exemplo de produção híbrida é o uso de sacos flutuantes em tanques abertos. Os sacos atingem uma exposição ótima à luz, resultando em bons resultados de produtividade, enquanto flutuam na água. Em comparação com outros sistemas, esta tecnologia possui vantagem de selecionar locais mais adequados, ser menos custosa, facilidade de escalabilidade e baixo consumo de energia (MATONDO et al., 2016).

Algumas microalgas, além de crescerem em suspensão na água, também possuem a capacidade de crescerem como biofilmes produtivos sobre substratos. Esta estratégia requer que as células das microalgas possam aderir e crescer em uma determinada superfície. Assim, o custo com coleta pode ser potencialmente reduzido, já que a biomassa pode ser facilmente removida da superfície (ROLIN et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

Uma variedade de sistemas de biofilmes de algas foi desenvolvida para estudar o crescimento de algas imobilizadas. Porém, as performances produtivas em diferentes sistemas de biofilmes não dependem somente das condições de cultura ou da escala de processo. São significativamente afetadas pelas características dos materiais que suportam o crescimento. Os materiais selecionados para fixação das células microalgais precisam ser duráveis, de baixo custo, fáceis de serem obtido e não tóxicos para as células (ZHANG et al., 2017).

Figura 4. (A) Esquema ilustrativo de um fotobioreator de biofilme; (B) fotobioreatores de biofilme “Twin layer” cultivando espécies diferentes e (C) fotografia de um biofilme parcialmente colhido.



Fonte: (JOHN et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

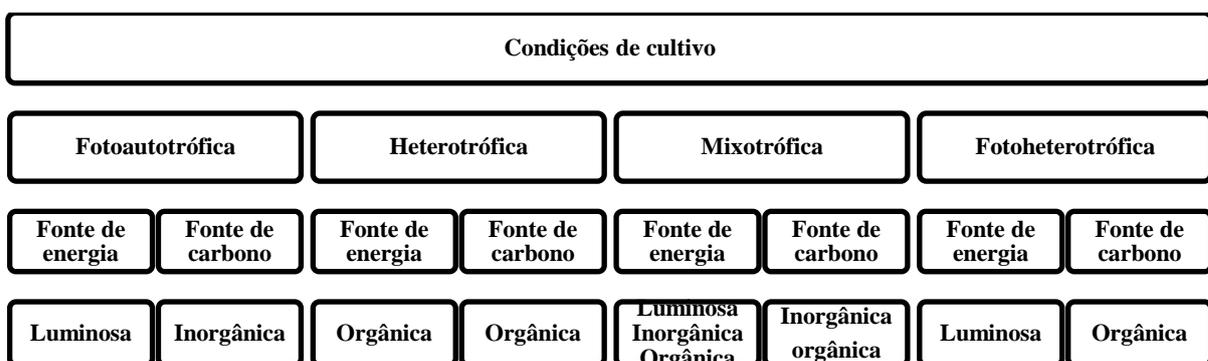
Estes sistemas possuem vantagens comprovadas em escala laboratorial, mas seu potencial para a produção econômica em larga escala ainda não foi avaliado. De acordo com alguns estudos de avaliação, essas novas tecnologias podem ser economicamente viáveis somente para geração de produtos de alto valor. (GRAHAM et al., 2017; JOHN et al., 2018).

A principal vantagem destes sistemas é a grande capacidade de facilitar simultaneamente o crescimento e a desidratação das algas quando em alta concentração microalgal. Além disso, podem reduzir as necessidades de grandes volumes de água e energia para a produção de biomassa em comparação com a cultura tradicional em suspensão em água. Assim, a coleta é facilitada, contudo, melhores práticas de coleta de biomassa precisam ser determinadas, como a densidade ideal de coleta, área e espessura do biofilme no que se refere a zonas de produção fotográfica e fotossíntese. Além disso, a maioria dos materiais utilizados atualmente é caros, descartáveis e não duráveis. São, portanto, inadequados para cultivo em larga escala (BERNSTEIN et al., 2014).

3.1.1 Condições, perfil de crescimento.

As condições de cultivo influenciam diretamente no crescimento, composição celular e no metabolismo das microalgas. De forma geral, existem quatro principais condições de cultivo. A Fotoautotrófica, a heterotrófica, a mixotrófica e a fotoheterotrófica. Todas diferenciadas quanto às fontes de nutrientes e de energia para o metabolismo dos organismos produzidos (CHEW et al., 2018; KLINTHONG et al., 2015; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Figura 5. Esquema representativo das principais condições de cultivo de microalgas.



Fonte: produzida pelo autor.

A condição fotoautotrófica é a mais antiga e mais comumente utilizada para a produção de microalgas. Os organismos cultivados neste sistema utilizam a luz como fonte de energia e o carbono inorgânico, na forma de dióxido de carbono para formar energia química por meio da fotossíntese (CHEW et al., 2018; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). A segunda condição utilizada em cultivos é a heterotrófica, nesta os organismos usam, como fonte de energia e de carbono para seu metabolismo, apenas compostos orgânicos como sacarose, glicose, glucose, lactose, galactose, glicerol e frutose, tornando-os alternativo para realização de cultivos na ausência de luz ou em ambientes com fonte de luz insuficientes (CHEW et al., 2018; CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004).

A condição de cultivo mixotrófica, por sua vez, mescla as condições fotoautotrófica e heterotrófica. Os organismos realizam a fotossíntese utilizando luz como a principal fonte de energia, porém, na ausência desta, podem também usar compostos inorgânicos ou orgânicos como fontes de energia. Em condições mixotróficas de produção, a presença de um substrato orgânico significa que o crescimento celular não é estritamente dependente da fotossíntese, tornando fonte de luz dispensável. (ANDRADE; COSTA, 2007; LIN et al., 2016; REZENDE DOS SANTOS et al., 2016).

Finalmente, na condição de cultivo fotoheterotrófica as microalgas requerem luz, enquanto usam compostos orgânicos como fonte de carbono. A principal diferença entre o cultivo fotoheterotrófico e mixotrófico é que a luz deve estar presente durante o crescimento fotoheterotrófico para fins energéticos. Assim, o cultivo fotoheterotrófico precisa necessariamente de uma fonte de orgânica de carbono e de uma fonte de luz simultaneamente (CHEW et al., 2018; CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

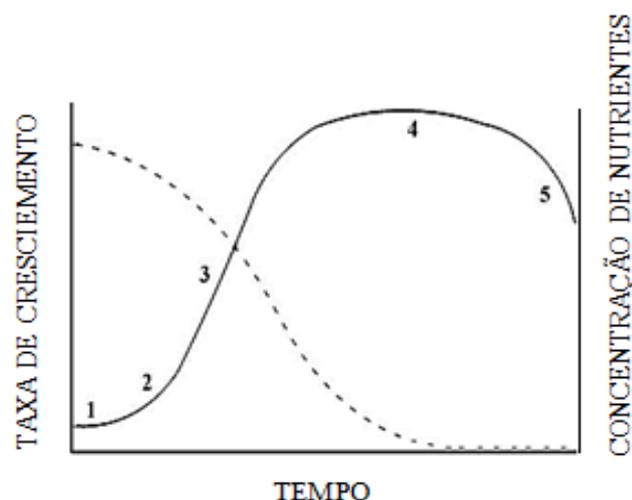
As condições de crescimento são essencialmente as exigências metabólicas necessárias para o crescimento microalgal. Porém, em meio a estas condições, existem fatores físicos, químicos, biológicos, estruturais e operacionais que podem influenciar positivamente ou negativamente no crescimento microalgal. Dentre os fatores físicos, químicos e biológicos, têm-se a luz, em termos de fonte, fotoperíodo, intensidade e irradiação, a temperatura, a concentração de nutrientes, as concentrações de O₂ e CO₂, pH, a salinidade, a regulação e biodisponibilidade mineral do carbono, a fragilidade celular, a densidade celular, a presença de patógenos (bactérias, fungos, vírus) e a competição com outras algas. Dos fatores estruturais e

operacionais, destacam-se o tipo de reator ou fotobiorreator, a forma de mistura ou movimentação do cultivo, a dinâmica dos fluidos e estresse hidrodinâmico, a profundidade do cultivo, a dimensão e distribuição das bolhas de gás, a troca gasosa, a transferência de massa, a taxa de diluição, os produtos químicos e a frequência de coleta (BOROWITZKA, 1992; KLINTHONG et al., 2015; ROSENBERG et al., 2008).

Independente do metabolismo, para que o microrganismo cresça, o cultivo deve estar em condições adequadas às suas exigências nutricionais. Esse crescimento poder ser representado por uma curva de crescimento, a qual é inversamente proporcional à concentração de nutrientes presentes.

Na primeira fase, praticamente não ocorre aumento populacional devido à adaptação das células ao novo ambiente de cultivo. Na segunda fase, as células já estão adaptadas ao novo meio e, com isso, ocorre um incremento exponencial da população algal. A terceira fase é a de desaceleração de crescimento, na qual a depleção dos nutrientes diminui a taxa de crescimento específica. Em seguida, com uma maior redução de nutrientes e aumento de metabólicos no meio, a taxa de crescimento se iguala à taxa de mortalidade, mantendo a população constante por um determinado período, caracterizada como a fase estacionária do cultivo. Finalmente, com o completo esgotamento dos nutrientes, grande quantidade de metabólicos e autólise celular, o cultivo entra na fase de morte, resultando em uma significativa redução da população algal.

Figura 6. Curva de crescimento de uma cultura microalgal em relação à disponibilidade de nutrientes.



3.1.2 Técnicas coleta e secagem da biomassa.

Atualmente, uma das tarefas mais desafiadora para a produção e aplicação de biomassa microalgal é a coleta. Seu tamanho microscópico e o fato de estarem suspensas em meio aquático acarreta em um alto consumo de energia no processo de coleta. Além disso, o custo com equipamentos de coleta e desaguamento ou recirculação da água após a coleta pode alcançar 90% do custo total de produção da biomassa microalgal em larga escala (SINGH; PATIDAR, 2018).

O método de coleta depende intensamente das fisionomias das microalgas escolhidas, densidade, tamanho da célula de microalga cultivada, especificações do produto final e da possibilidade de reutilização do meio de cultura (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; RAWAT et al., 2011). Na Tabela 1 estão listadas as cinco principais técnicas de coletas de microalgas e suas respectivas vantagens e desvantagens.

Tabela 1. Técnicas de coleta de microalgas e suas respectivas vantagens e desvantagens.

Técnica de coleta	Vantagens	Desvantagens
Floculação	Técnica rápida e fácil Usado para grande escala Causa pouco dano celular Aplicado a vasta gama de espécies	Os produtos químicos podem ser caros A eficiência depende do coagulante usado Difícil separar o coagulante da biomassa colhida Altamente dependente do pH A reciclagem do meio de cultura é limitada Possibilidade de contaminação mineral ou microbiana
Flotação	Adequado em grande escala Baixo custo e baixo requerimento de espaço Tempo de operação curto	Precisa de surfactantes Flotação por ozônio é um processo caro
Processos baseados em eletricidade	Aplicável a todas as espécies de microalgal Não requer químicos	Eletrodos de metal necessários Alto custo de energia e com equipamentos Contaminação de metal
Centrifugação	Técnica rápida e eficaz Alta eficiência de recuperação (> 90) Preferido para pequena escala e laboratório Aplicável a todas as microalgas	Técnica cara com alta exigência de energia Alto custo de operação e manutenção Apropriado para a recuperação de produtos de alto valor Demorado e muito caro em grande escala Risco de destruição celular
Filtração	Alta eficiência de recuperação Economicamente viável Baixo consumo de energia (filtro natural e de pressão) Nenhum produto químico é necessário Baixa tensão de cisalhamento Reciclagem de água	Técnica lenta e requer pressão ou vácuo Não é adequado para microalgas menores A obstrução e entupimento Substituição da membrana aumenta os custos operacionais e de manutenção Alto consumo de energia (se filtrado a vácuo)

Fonte: (SINGH; PATIDAR, 2018).

Após o processo de desaguamento ou coleta das microalgas, a pasta de biomassa ainda úmida, dependendo da aplicação do produto, deve ser submetida a um processo de secagem. Existem diversos processos, dos quais se destacam a

secagem solar, secagem por convecção, secagem por pulverização e liofilização (CHEN; CHANG; LEE, 2015).

A secagem solar é o método mais barato, mas requer longo tempo de secagem e uma grande superfície. Além disso, a qualidade do produto é comprometida e a baixa taxa de secagem devido a uma possível baixa na temperatura pode causar degradação da biomassa. Assim, alguns modelos de secagem solar fechados surgiram para solucionar este entrave, podendo elevar a temperatura ambiente de 35 ° C a 60 ° C, e a umidade no produto final ficar menor que 10% dentro de 3 a 5 horas de secagem (BRENNAN et al., 2010; PRAKASH et al., 1997).

A secagem por convecção também é um processo muito utilizado para a desidratação de microalgas. É caracterizado por um tipo de convecção a ar quente, como a secagem em estufa por exemplo. A eficiência de secagem por convecção é substancialmente melhor do que a secagem solar (DESMORIEUX; DECAEN, 2005; GULDHE et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2008, 2010).

Outro método também muito usado é o de secagem por pulverização. É o método preferido para secagem de microalgas para obtenção de produtos de alto valor. Comparado com a secagem por convecção, os produtos secos por pulverização retêm mais os nutrientes, ocorrendo perda entre 10 a 20% em proteínas. Em comparação com a liofilização, a biomassa de microalgas é menos suscetível à lipólise durante o armazenamento, porém os carotenoides oxidam mais rapidamente do que aqueles em microalgas liofilizadas (CHEN; CHANG; LEE, 2015).

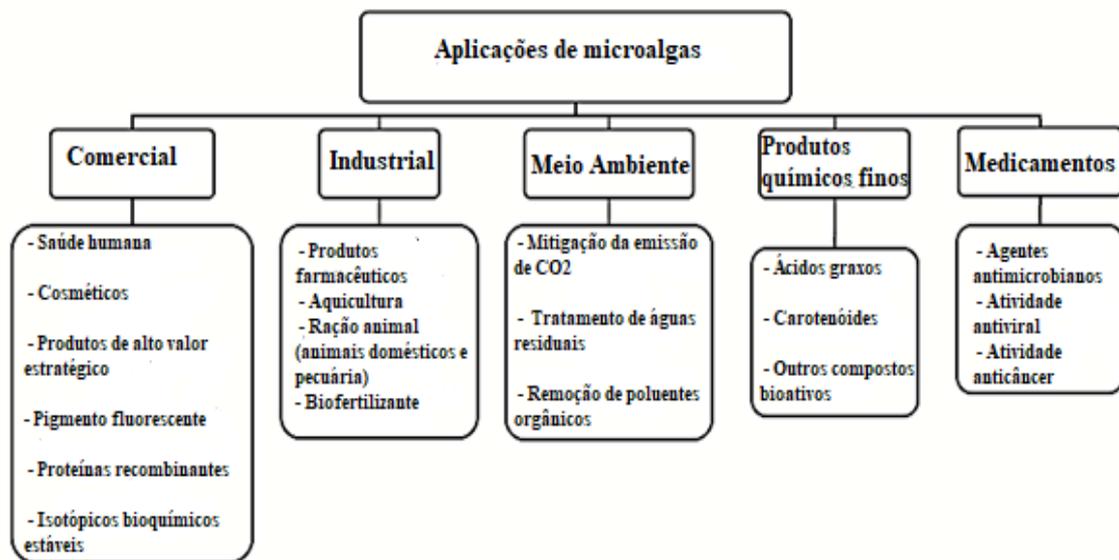
A liofilização, por sua vez, é amplamente utilizada na indústria alimentícia, bem como em muitas pesquisas. Neste método, praticamente todos os constituintes celulares são preservados sem romper a parede celular, mantendo a maior quantidade de proteínas na biomassa seca de microalgas, com a perda de proteína abaixo de 10%. (GULDHE et al., 2014; MILLEDGE; HEAVEN, 2013).

3.2 *Nannochloropsis oculata*

As microalgas são capazes de produzir uma grande variedade de compostos bioquímicos, que são amplamente utilizados em pesquisas médicas e de alimentos. Possuem grande potencial de aplicações em diferentes áreas (OLIVEIRA et al., 2013; RIZWAN et al., 2018).

A microalga *Nannochloropsis oculata* é importante na aquicultura devido ao seu valor nutricional. Pertence à classe Eustigmatophyceae, que agrupa espécies que contêm uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA), que são de grande importância na nutrição de animais marinhos, particularmente no crescimento e desenvolvimento de larvas de peixes, moluscos e crustáceos (CARVAJAL-OSÉS; CHACÓN-GUZMÁN; HERRERA-ULLOA, 2018; LOW; TOLEDO, 2015; MALAKOOTIAN et al., 2015)

Figura 7. Fluxograma mostrando aplicações de microalgas em diferentes áreas.



Fonte: (RIZWAN et al., 2018).

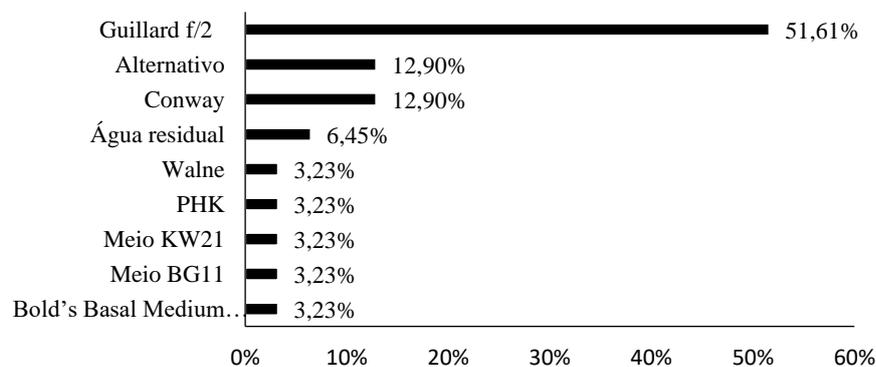
A *N. oculata* apresenta uma ampla gama de pigmentos de interesse comercial, como zeaxantina, beta-caroteno e outros carotenóides, com potencial para diversas aplicações industriais (FAÉ NETO; BORGES MENDES; ABREU, 2018). No entanto, o conhecimento das propriedades bioativas das espécies de *Nannochloropsis* é limitado e muito baixo (SANJEEWA et al., 2016).

Para a produção dos biocompostos é necessário inicialmente o crescimento algal, e pelo que já foi visto depende do meio de cultura, onde esses podem ser inorgânicos sintéticos ou orgânicos e possuem diferentes formulações e nutrientes em suas composições. Independentemente da composição de cada meio, para que ocorra o crescimento satisfatório das microalgas, todos devem fornecer aos

microrganismos, macronutrientes (C, N, O e P), micronutrientes (metais e quelantes) e vitaminas como fatores de crescimento (CHEW et al., 2018).

Dentre os meios sintéticos, têm-se os tradicionais e alternativos. Os tradicionais possuem em suas formulações reagentes de alto grau de pureza e confiabilidade Para Análise (PA). Estes reagentes possuem alto custo, inviabilizando a produção em larga escala, pois aumentam os custos de produção. Dentre os meios tradicionais, existem os meios Walne, PHK, KW21, BG11, BBM e os mais utilizados Guillard f /2 e Conway em cultivos utilizando a *N. oculata*, (FAÉ NETO; BORGES MENDES; ABREU, 2018).

Figura 8. Percentual de trabalhos publicados com *N. oculata* cultivada em diferentes meios de cultura nos últimos cinco anos pesquisados base Web of Science.



Observa-se na figura 8 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** que 80,65% dos trabalhos realizados nos cinco anos com a microalga *N. oculata* são realizados com meios tradicionais de alto custo. Os trabalhos realizados em meios sintéticos alternativos somam 12,9% e apenas 6,45% dos trabalhos utilizaram águas residuais. Porém, quando se trata de cultivos em ambientes naturais externos, que necessitam de maiores volumes de produção, os meios alternativos foram utilizados em 50% dos trabalhos.

Para redução deste entrave na produção de microalgas, tem sido observada a substituição de reagentes PA por fertilizantes agrícolas, são os denominados meios alternativos. Os fertilizantes possuem valores de mercado bem mais em conta que reagentes PA e podem ser encontrados mais facilmente e em maiores quantidades, viabilizando cultivos em grande escala (BRITO et al., 2018; CARVAJAL-OSES; CHACÓN-GUZMÁN; HERRERA-ULLOA, 2018).

Outra alternativa que vem sendo também observada em cultivos de *N. oculata*, é o uso de meios orgânicos ou águas residuais como meio de cultura (AMMAR; KHADIM; MOHAMED, 2018). Cultivos em águas residuais possuem pelo menos duas vantagens em relação aos meios inorgânicos. Promovem o crescimento microalgal sem a necessidade de adição de nutrientes e água potável e, ao mesmo tempo, ocorre a remoção dos nutrientes presentes em água residuais através da biorremediação. Por outro lado, águas residuais, por poderem ser de originadas de diferentes processos, possuem desvantagens, além de outras, de conter diferentes concentrações dos nutrientes presentes e conterem, em alguns casos, a presença de outros organismos indesejados.

Nos trabalhos observados com *N. oculata* em meios orgânicos, foram observadas águas residuais oriundas de cultivo de camarão, de ETE municipal e de indústria de produção de óleo. A *N. oculata* se adaptou aos meios e apresentaram potencial significativo para o cultivo águas residual, pois a microalga demonstrou resistência à presença de diferentes concentrações de compostos presentes (AMMAR; KHADIM; MOHAMED, 2018; CARVAJAL-OSES; CHACÓN-GUZMÁN; HERRERA-ULLOA, 2018; REZASOLTANI et al., 2019).

O sumário abaixo mostra uma coleção de cultivos realizados em diversos meios de cultura, as condições de cultivo (tabela 2). A grande maioria dos trabalhos foi realizada em sistemas aberto, em reatores ou recipientes transparentes, em regime de cultivo estacionário, em condições fotoautotróficas e com volumes relativamente pequenos, o que justifica a grande utilização de meios tradicionais.

Tabela 2. Exemplos de cultivos de *N. oculata* realizados em diferentes meios, sistemas, volumes, regimes e condições de cultivo.

Meio	Sistema de cultivo	Reator de cultivo	Volume de cultivo (L)	Regime de cultivo	Condição de cultivo	Referências
Tradicionais <i>Guillard f/2</i>	Abertos e fechados	Fotobiorreatores, raceways, reatores tubulares verticais, mangueiras e taques de fibra de vidro	0,1 a 100	Estacionário e semicontínuo	Fotoautotrófico	(BAHARUDDIN et al., 2016; CARVAJAL-OSES; CHACÓN-GUZMÁN; HERRERA-ULLOA, 2018; DURMAZ; ERBIL, 2017; FAÉ NETO; BORGES MENDES; ABREU, 2018; MANISALI; SUNOL; PHILIPPIDIS, 2019; MARTÍNEZ MACIAS et al., 2017; MILLÁN-OROPEZA; FERNÁNDEZ-LINARES, 2017; PAVÓN-SURIANO et al., 2018; SHENE et al., 2016; SUN et al., 2018; WEI et al., 2016)
<i>Conwey</i>	Fechado	Recipientes de plástico e de vidro	10 a 60	Estacionário	Fotoautotrófico	(AMOUZAD KHALILI et al., 2019; SALES et al., 2016; WEI et al., 2016)
<i>Walne</i>	Fechado	Tanque	150	Estacionário	Fotoautotrófico	(LIN; TSENG, 2018)
<i>PHK</i>	Fechado	Erlenmeyers	0,25	Estacionário	Fotoautotrófico	(PALACIOS; VONSHAK; BEARDALL, 2018)
<i>KW21</i>	Fechado	Erlenmeyers	0,9	Estacionário	Fotoautotrófico	(MATSUI; ANRAKU; KOTANI, 2019)
<i>BG11</i>	Fechado	Garrafas	0,3	Estacionário	Mixotrófico	(REZASOLTANI et al., 2019)
<i>BBM</i>	Fechado	Garrafas de vidro	1	Estacionário	Fotoautotrófico	(MOHA-LEÓN et al., 2019)
Alternativos	Aberto e fechado	Erlenmeyers, mangueira e tanque de fibra de vidro	2 a 2.000		Fotoautotrófico	(CARVAJAL-OSES; CHACÓN-GUZMÁN; HERRERA-ULLOA, 2018; FAÉ NETO; BORGES MENDES; ABREU, 2018; MARTÍNEZ-MACIAS et al., 2019)
Águas residuais	Fechados		0,25 a 0,4		Mixotrófico	(CARVAJAL-OSES; CHACÓN-GUZMÁN; HERRERA-ULLOA, 2018; FAÉ NETO; BORGES MENDES; ABREU, 2018; REYIMU; ÖZÇIMEN, 2017)

3.3 *Litopenaeus vannamei*

Sua classificação taxonômica segue o esquema abaixo.

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea - Brünnich, 1772

Classe Malacostraca - Latreille, 1802

Subclasse Eumalacostraca - Grobben, 1892

Superordem Eucarida - Calman, 1904

Ordem Decapoda - Latreille, 1802

Subordem Dendrobranchiata - Bate, 1888

Superfamília Penaeoidea - Rafinesque, 1815

Família Penaeidae - Rafinesque, 1815

Gênero *Litopenaeus* - Pérez Farfante, 1969

Espécie *Litopenaeus vannamei* - Boone, 1931

Figura 9. Camarão *Litopenaeus vannamei*



Fonte: Google Imagens

Sua anatomia é caracterizada, por um cefalotórax e abdômen segmentado em seis partes. No primeiro apresenta os órgãos, como brânquias, estômago, hepatopâncreas e coração, como também os apêndices (antenas, antênulas, mandíbulas, maxilípedes e pereiópodes), enquanto no abdômen tem-se o intestino e pleópodes, finalizando seu corpo com o télson e urópodes. A composição centesimal

foi determinada por Noletto et al. (2017) onde mensurou em seu filé 66,9% de matéria seca, 5,9% cinzas, 46,5% proteína, 3,0% lipídeo.

O sistema circulatório é do tipo aberto, onde seu líquido corpóreo e suas células que são denominadas hemolinfa e hemócitos, respectivamente. A hemolinfa é bombeada pelo coração e transportada pelos vasos espalhados por todo o corpo, após as trocas de substâncias segue para as brânquias e retorna para o coração. Um dos vasos passa pelo órgão linfóide, onde a hemolinfa é filtrada (RUSAINI; OWENS, 2010).

Para a domesticação do camarão e criação de uma indústria da carcinicultura foi necessário um conhecimento profundo da biologia, especialmente à reprodução, nutrição, e saúde (VOEGELEY et al., 2012). O desenvolvimento embrionário do *L. vannamei* se encerra com a eclosão do náuplio, a partir deste momento se inicia o período larval, com duração de aproximadamente três semanas, passando por três estágios (náuplio, protozoa e misis) antes de atingir o estágio de pós-larva (DALL et al., 1990).

O náuplio apresenta cinco subestágios, nessa etapa a larva é planctônica, mede cerca de 3-4µm e possui fototropismos positivo, ou seja, atraídos pela luminosidade, utiliza suas antenas como forma de movimentação e nutrindo-se exclusivamente de suas reservas vitelínicas (BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

No estágio de Protozoa o animal passa por três subestágios, qual passa por uma alteração radical em sua forma e comportamento, ou seja, uma nítida diferenciação entre o cefalotórax e o abdômen, uma movimentação de natação contínua, e com o esgotamento das reservas energéticas a larva precisa capturar seu próprio alimento, dessa forma os apêndices cefalotorácicos passam a desempenhar importante função alimentar (BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001). A alimentação fundamentalmente a base de fitoplâncton. Após o estágio de protozoéia, vem o estágio de misis que também possui três subestágios, porém o zooplâncton passa a ser o principal alimento e o fitoplâncton consumido em menor quantidade. Nessa fase, a larva já se assemelha a um minúsculo camarão, mas uma observação mais atenta indicará que os apêndices abdominais ainda não estão formados. Por isso nadam através da contração do abdômen e para trás. É justamente a observação e a análise dos pleópodos que permite uma identificação segura dos subestágios de desenvolvimento das misis (BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

O domínio da reprodução e produção de pós-larvas na década de 1990 pelos laboratórios brasileiros, foi fundamental para o início das fazendas comerciais (LIMA, 2007). Nesse mesmo período houve uma crise no mercado do sal, o que levou o desligamento de várias salinas, diante disso o governo do Rio Grande do Norte criou o Projeto Camarão a fim de reaproveitar as salinas desativadas para o cultivo de camarão (MIYOKO et al. 2011). A partir desse ponto a carcinicultura brasileira se desenvolveu, impulsionada pelo uso de tecnologia, como o uso de aeradores e máquinas de despesca, manejo no fundo do viveiro, uso de bandejas de alimentação e o sistema de beneficiamento como controle de qualidade (CAVALCANTI, 2003).

Atualmente o camarão *Litopenaeus vannamei* é uma importante espécie econômica que tem sido amplamente cultivada em todo o mundo (ZENGER et al., 2019), destaque-se devido à sua típica coloração e ampla aceitação nos mercados internacionais (SANTOS et al., 2009). Dentre as 64 espécies de crustáceos cultivadas em todo o mundo o *Litopenaeus vannamei* totaliza 53% de toda a produção 7.862 milhões de toneladas (FAO, 2018). Isso se deve as suas características zootécnicas, e também ser uma espécie eurihalina, ou seja, apesar de ser uma espécie marinha pode ser cultivada em águas oligohalinas, crescendo em ambientes com salinidade variando de 1 a 50 (LI et al., 2007)

Segundo o Censo da Carcinicultura do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes (ABCC/MAPA, 2017) no ano de 2003 a Carcinicultura brasileira alçou sua máxima produção 90.190 toneladas, o estado do Ceará obteve a 2ª colocação como maior produtor do país. Ocupando uma área de 3.376 hectares de viveiros, o estado produziu 25.915 toneladas. Contudo no ano seguinte o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), instalou-se nas áreas produtivas, de modo a reduzir a produção em 25%. Apesar disso a atividade da carcinicultura continuou em expansão nos anos seguintes

A tabela 3 demonstra um significativo aumento do número de produtores e área produtiva no estado do Ceará, conseqüentemente a produção, isso devido também às medidas operacionais que proporcionaram uma convivência com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), porém houve um decréscimo acentuado do ano 2015 para 2016, devido à chegada do vírus da Mancha Branca (WSSV).

Tabela 3. Dados Comparativos da Carcinicultura no Ceará, nos anos de 2004, 2011, 2015 e 2016.

Produtores Ativos	2004	2011	2015	2016
Nº de Produtores	191	325	630	700
Área (ha)	3.804	6.580	9.744	10.407
Produção (ton)	19.405	31.982	41.414	27.614

Fonte: Censo da Carcinicultura do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes

Diante de mais um desafio, os produtores adotaram novos métodos de cultivo para conviver com a nova epidemia, ou seja, instalação de berçários intensivos, utilização de probióticos, assim como a diminuição da densidade de estocagem.

O perfil do produtor de camarão no Ceará em sua maioria é micro ($\leq 5,0$ hectares), conforme a tabela 4, onde 66,43% estão nessa categoria, 11,43% pequenos produtores ($>5,0 \leq 10,0$ hectares), 17,43% são médios ($>10 \leq 50,0$ hectares) e 4,71% grandes (> 50 hectares) produtores, que no seu conjunto geraram um total de 3.930 empregos diretos.

Tabela 4. Tamanhos das Unidades de Produção por Categoria em 2016 no Ceará.

Categoria	Nº de Produtores	% de Produtores Por Categorias
Micro $\leq 5ha$	465	66,43
Pequeno $> 5 \leq 10ha$	80	11,43
Médio $> 10 \leq 50ha$	122	17,43
Grande $> 50ha$	33	4,71
TOTAL	700	100

Fonte: Censo da Carcinicultura do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes

3.4 Doenças na Carcinicultura

Há diversos microrganismos existentes que prejudicam a saúde dos camarões. Contudo, as enfermidades que causam maiores perdas econômicas pela diminuição na produção, são aquelas causadas por vírus (LIGHTNER et al., 2012), e segundo o mesmo autor as principais enfermidades virais que afetam produção do *L. vannamei* são Síndrome da Mancha Branca (WSS), Síndrome de Taura (TS), Doença da Cabeça Amarela (YH), Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHHN) e Mionecrose Infecciosa (IMN), todas de notificação obrigatória ao Escritório Internacional de Epizootias (OIE).

No Brasil os principais vírus que atingem cultivos de camarão são o IHHNV, IMNV e WSSV (LIGHTNER, 2011; LIGHTNER et al., 2012). Sendo, os dois últimos os principais causadores perdas na produtividade na região Nordeste. A IMNV no Brasil se estabeleceu primeiramente no Estado do Piauí, e se alastrou por toda região Nordeste, o maior polo produtor do Brasil, Causando perdas econômicas de 440 milhões de dólares no ano de 2005 (ANDRADE et al., 2007).

O camarão é suscetível a IMNV em todas as fases do seu ciclo de vida, ou seja, pós-larvas, juvenis, e adulto, contudo a maior incidência de mortalidade observada nos juvenis e adultos (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). A propagação da doença ocorre em condições de estresse, isto é, quando não há boas práticas de manejo, aumento da densidade de estocagem, tanto em sistemas intensivo e semi-intensivos resultando em uma redução na qualidade da água do cultivo, comprometimento do sistema imunológico (CUNHA, 2008).

O sinal clínico do camarão infectado com IMNV é necrose muscular, geralmente na região abdominal e urópode (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Apesar de em alguns casos a IMNV causar grandes mortalidades, no entanto não é tão alto quanto observado em outros vírus, como o WSSV e vírus da cabeça amarela (YHV) (ARANGUREN; TANG; LIGHTNER, 2012); LU et al., 1995; TANG et al., 2005) e já foram encontrados camarões co-infectados com IMNV e WSSV (FEIJÓ et al., 2013).

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) pode infectar várias espécies de crustáceos (LI; WENG; HE, 2019), no camarão ela é considerada devastadora (JOSEPH et al., 2015), haja vista que causa mortalidade massiva dentro de 3 a 10 dias após a infecção. Foi relatado pela primeira vez em Taiwan em 1992, deste então causou infecções no Japão, Coreia, Sudeste Asiático, Sul da Ásia, Mediterrâneo, Oriente Médio, Américas e Austrália (DIGGLES, 2017; LIGHTNER, 2011; TANG ET AL., 2012). Seus sinais clínicos são cor de telha colonial, repentina redução do consumo alimentar, natação lenta na superfície e próximo aos taludes do viveiro, carapaça mole e pode ou não conter depósitos de cálcio visível.

Embora os vírus sejam responsáveis por grandes perdas nos cultivos, as bactérias se destacam também por estarem naturalmente na água e sendo assim potenciais causadores de doenças (LAVORANTE et al., 2009). No Brasil, as enfermidades de maior importância são de origem viral e bacteriana ou a associação delas. O surto do WSSV pode contribuir para a infecção secundária por outros

patógenos como *Vibrio*, (PHUOC et al., 2009; SELVIN; LIPTON, 2003). Os ambientes de cultivo há invasão por bactérias oportunistas do gênero *Vibrio* e *Aeromonas* (MORALLES-COVARRUBIAS et al., 2010).

Vibrio são bactérias gram-negativas, móveis (com 1-2 flagelos), mesofílicas e quimioorganotróficas, com metabolismo fermentativo facultativo heterotrófico. Eles são positivos à oxidase e podem crescer em meio seletivo (TCBS) (THOMPSON et al., 2004). Várias espécies são patogênicas ao camarão, as quais incluem *Vibrio harveyi* (MIRBAKHSH et al., 2014; SOTO-RODRIGUEZ et al., 2012), *Vibrio alginolyticus* (VANDENBERGHE et al., 1999), *Vibrio parahaemolyticus* (TRAN et al., 2013), *Vibrio campbellii* (SOTO-RODRÍGUEZ et al., 2006), *Vibrio nigripulchritudo* (GOARANT et al., 2006) e *Vibrio penaeicida* (GOARANT; MERIEN, 2006)

3.5 Parâmetros hematológicos

Por conta do sistema imune inato do camarão, que não possui capacidade de memória, existe crescente interesse na prevenção de doenças com o uso de imunostimulantes, pois esses compostos alertam o sistema imune contra invasões patogênicas, aumentando a resposta às infecções e conseqüentemente deixando os animais mais resistentes (DASH et al., 2017).

A adição de imunostimulantes na dieta dos camarões tem efeito positivo comprovado em vários estudos onde são utilizados óleos essenciais, lipopolissacarídeos, peptídeos, betaglucanos e microalgas (HE et al., 2017). A utilização de probióticos e imunostimulantes na alimentação de crustáceos tem sido observada como medida profilática e terapêutica contra condições de estresse e doenças. Os hemócitos compõem um grupo heterogêneo de células que demonstram os efeitos das adversidades no sistema imune.

O monitoramento de parâmetros imunológicos pode indicar o estado sanitário dos camarões, pois são rapidamente afetados pela resposta do sistema imune diante de condições adversas de cultivo, como por exemplo, má qualidade de água e manejo alimentar ineficiente. Sem esse monitoramento, o diagnóstico pode ser constatado de maneira tardia, após o comprometimento das taxas de crescimento ou até mesmo com a constatação de mortalidades nos viveiros (COSTA et al., 2009)

A contagem de hemócitos é um dos parâmetros mais afetados em condições estressantes de cultivo ou em casos de infecções, o que faz dessa técnica

um excelente indicativo do estado de saúde dos animais. Além desse parâmetro, devido ao sistema de circulação aberta dos camarões, o processo de coagulação também ganha importância, pois impede a perda excessiva de hemolinfa e a disseminação patogênica (COSTA et al., 2009)

A defesa celular dos camarões depende dos hemócitos, que apresentam várias funções como produção de componentes antimicrobiais, apoptose, formação de nódulos, bioencapsulação de patógenos, adesão celular, cicatrização, coagulação e fagocitose, sendo a fagocitose e a apoptose, os dois principais processos de combate à infecções virais. A hemocianina é uma importante proteína respiratória e tem a capacidade de combinar e transportar oxigênio e gás carbônico, além de que fragmentos da hemocianina apresentam atividade bactericida e imunestimulante (ZHOU et al., 2014).

Os hemócitos são uma das principais células de defesa dos camarões, e podem executar tanto a resposta imune celular como humoral, quando é necessário o combate do organismo perante o ataque de patógenos, e por essa razão, os hemócitos são os principais alvos das infecções. Através do processo de apoptose (morte celular geneticamente programada), os camarões podem eliminar células doentes ou danificadas, o que se constitui num mecanismo de defesa que é de fundamental importância em fatores estressantes internos e externos (MELO; CARLOS; MARTINS, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Na presente pesquisa foram realizados três experimentos subsequentes. No primeiro, realizou-se o cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* em meio Guillard f/2 em volume de três litros, diferenciando as concentrações de nitrato de sódio (15, 30, 45, 60 e 75 mg L⁻¹). No segundo experimento, realizou-se o cultivo da mesma microalga, em três tratamentos, sendo dois em meio Guillard f/2 nas concentrações de nitrato de sódio (15 e 75 mg L⁻¹) e um com meio de cultivo alternativo baseado em ureia e superfosfato triplo (SPT), todos os três tratamentos foram em volume de 20L. Finalmente, no terceiro experimento, as biomassas algais secas do segundo experimento foram utilizadas como aditivo na ração do camarão *Litopenaeus vannamei* para a observação da atividade imunoestimulante.

4.1 Cultivo em meio Guillard f/2 com diferentes concentrações de nitrato de sódio (15, 30, 45, 60 e 75 mg L⁻¹).

A cepa de *Nannochloropsis oculata* utilizada neste estudo foi obtida no cepário do Laboratório de Planctologia do Centro de Pesquisa aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA) do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e mantida a 22 ± 2 °C em tubos de ensaio, com luz artificial e fotoperíodo de 8/16 h claro-escuro. O meio utilizado para manutenção do inóculo foi o Guillard f/2 (GUILLARD, 1975), observado na tabela 5.

Tabela 5. Composição do meio de cultivo Guillard f/2.

Soluções	Reagentes	Solução estoque (mg L ⁻¹)	Volume para 1 L de meio de cultura (mL)
1	Nitrato de sódio	75,0	1,0
2	Fosfato de sódio	5,0	1,0
	Silicato de sódio	12,0	
3	Sulfato cúprico	9,8	1,0
	Sulfato de zinco	22,0	
	Cloreto de magnésio	10,0	
4	Molibdato de sódio	6,3	1,0
	Cloreto de ferro	3,0	
	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	4,6	
5	Vitaminas*	-	0,5

* A solução estoque de vitaminas foi preparada em 50 mL de água destilada.
Fonte: Dados do experimento.

Foram realizadas repicagens a partir do inoculo até a obtenção de 300 mL de cultura. Este volume foi adicionado em um frasco de 5 L de volume útil e completado com meio Guillard f/2. Após o desenvolvimento, foram retiradas alíquotas de 300 mL e transferidas para 15 frascos de três litros utilizados nos tratamentos. Todo material utilizado, foi esterilizado em autoclave vertical a uma temperatura de 120 °C, a uma pressão de 1 kgf cm⁻² durante 15 minutos, com o intuito de eliminar a carga microbiana e prevenir possíveis contaminações.

Os tratamentos foram realizados em triplicata e diferenciados quanto às concentrações de nitrato de sódio (15, 30, 45, 60 e 75 mg L⁻¹) no meio Guillard f/2, sendo a concentração de 75 mg L⁻¹ o tratamento controle. Os cultivos foram submetidos à aeração constante por meio de bombas de diafragma para garantir o movimento da cultura. A intensidade da luz foi de 60 µmol cm⁻² s⁻¹, determinada por um medidor de luz digital e temperatura de 28 ± 1°C, medida por um termômetro e 30 de salinidade. Diariamente, foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer (SILVA et al., 2015) e obtida a Densidade Celular em número de células por mililitro (DC cel. mL⁻¹).

Após cinco dias de cultivo, usou-se uma solução flocculante de NaOH 2N para separar as microalgas do meio de cultura (ARAUJO et al., 2011). Posteriormente a biomassa úmida foi retirada e seca em estufa de circulação de ar forçada a 60 °C por 24 h (RODRIGUES et al., 2009).

4.1.1 Concentração e remoção de nitrato

A concentração de nitrato-N no meio de cultura foi determinada no início e no final do experimento por espectrofotometria. Para isso, amostras de 100 mL de cada repetição foram coletadas e centrifugadas a 3.000 x g por 5 min. Em seguida, adicionou-se o reagente NitraVer 5 Nitrate em 25 mL de cada amostra e após cinco minutos, as amostras foram lidas no espectrofotômetro a 500 nm. Este procedimento garantiu a avaliação de nitrato (KUMAR et al., 2016).

4.1.2 Concentração de lipídios totais na biomassa

Em todos os tratamentos foi realizada a extração lipídica pelo método tradicional (BLIGH; DYER, 1959), no qual foi adicionado ao peso seco das microalgas

(5 g), em triplicata, em balão volumétrico de 250 mL, 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. O balão foi fechado e sonicado por 40 min em banho ultrassônico com frequência de 40 kHz e potência de 80 W. Em seguida, adicionou-se 12,5 mL de clorofórmio e 12,5 mL de solução de sulfato de sódio a 1,5% e passou-se novamente pelo processo de sonicação por 20 min. O sólido foi filtrado a vácuo e seco em estufa a 105 °C por 24 horas.

O rendimento de lipídios foi determinado de acordo com as equações 01, descrita por Converti (2009):

$$Y = (W_L / W_{DA}) \times 100 \quad (01)$$

Onde:

Y – Rendimento em g 100 g de alga seca⁻¹,

W_L - Peso de lipídeo extraído em g,

W_{DA} - Peso da biomassa seca no fim das culturas (g).

4.2 Cultivo em no meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio de 15 e 75 mg L⁻¹ e em meio alternativo

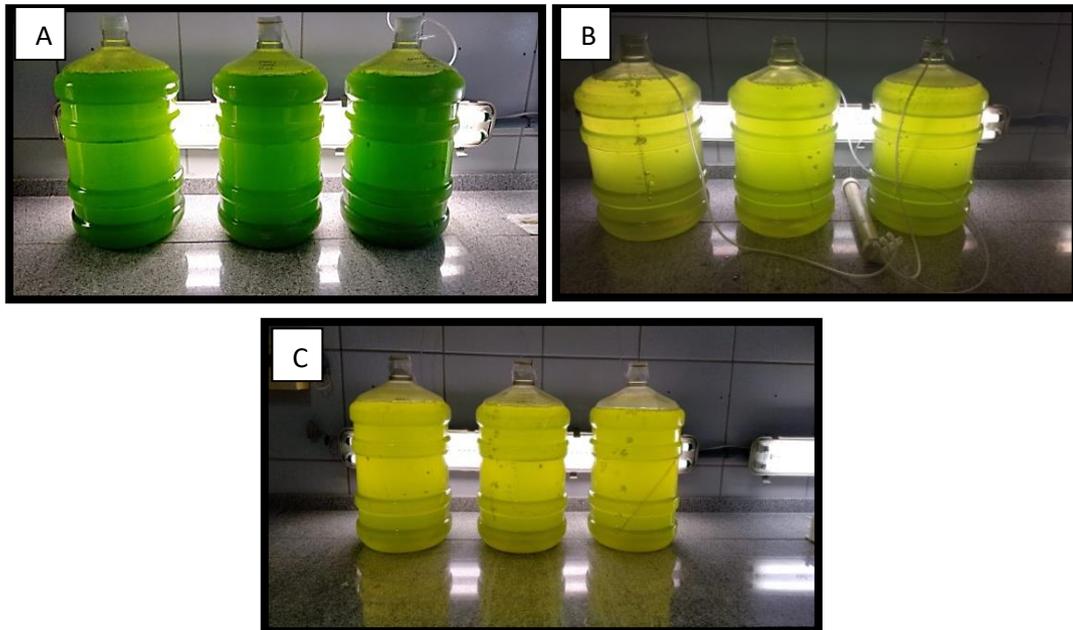
Nesta segunda etapa, foram realizados cultivos em meio Guillard f/2 nas concentrações de nitrato de sódio de 15 e 75 mg L⁻¹, tendo em vista que a primeira concentração foi a qual obteve melhor rendimento lipídico no experimento anterior e a segunda segue sendo o tratamento controle. O outro tratamento foi em meio de cultivo alternativo. Os tratamentos foram realizados também em triplicata, submetidos à aeração constante por meio de bombas de diafragma e as condições foram semelhantes aos cultivos realizados no item 3.1. Diariamente, também foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer (SILVA et al., 2015), e obtida a Densidade Celular em número células por mililitro (DC cel. mL⁻¹).

Tabela 6. Composição do meio de cultivo alternativo.

Reagente	Quantidade no meio de cultivo (g L ⁻¹)
Ureia	1,0
Super Fosfato Triplo (SPT)	0,3

Fonte: Dados do experimento.

Figura 10. A) Cultivo *N. oculata* em meio padrão Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio 75 mg L⁻¹; B) Cultivo em meio Guillard f/2 em concentrações de nitrato de sódio de 15 mg L⁻¹; C) Cultivo em meio alternativo (Ureia e SPT)



Fonte: Fotografado pelo autor.

4.3 Uso da biomassa algal como aditivo na ração do camarão *Litopenaeus vannamei*

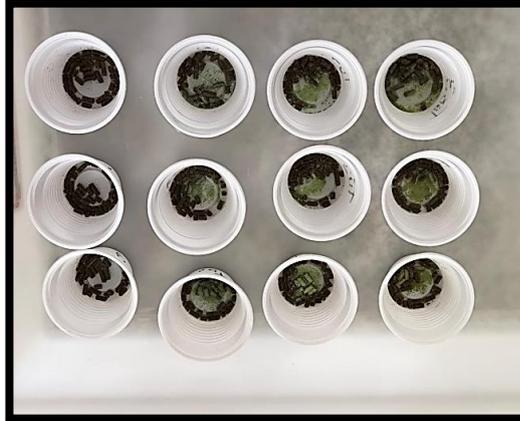
4.3.1 Formulação da ração

Foram testadas quatro dietas. A primeira consistiu apenas em ração comercial com 35 % PB, usada como tratamento controle. Nas demais foram adicionadas biomassa algal de *N. oculata* como aditivo no teor de 5% da quantidade de ração ofertada (Figura 9). Essa concentração foi escolhida baseada em outros aditivos comerciais. Assim, no tratamento 1 utilizou-se a biomassa algal obtida no meio Guillard f/2 com 75 mg L⁻¹. No tratamento 2, utilizou-se a biomassa algal obtida no meio Guillard f/2 com 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio e, por fim, no tratamento 3, utilizou-se a biomassa algal obtida no cultivo realizado no meio alternativo.

Para a fixação da biomassa algal na ração, utilizou-se um produto comercial aglutinante (veículo universal). No processo, para formação da solução aglutinante, utilizaram-se três gramas do veículo em um litro de água destilada,

deixando-a em repouso por 24 h. Desta solução, utilizou-se 0,025 mL para fixação da biomassa algal em para cada grama de ração utilizada nos tratamentos.

Figura 9. Ração comercial com biomassa da microalga *N. oculata* usada como aditivo.



Fonte: Fotografado pelo autor.

4.3.2 Delineamento experimental do cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*

Foram utilizados camarões juvenis da espécie *P. vannamei* obtidos em uma fazenda comercial que realiza cultivo superintensivo, uma vez que, essa tecnologia se faz uso de viveiros lonados e estufados, assim mantendo a temperatura da água constante e aproximadamente em 31°C, o que não deixa o vírus da macha branca se instalar, garantia essa importante para o experimento. Os indivíduos foram transportados em sacos plásticos com suprimento de oxigênio e alojados em um sistema de cultivo composto por 12 caixas de 150 L, assim totalizando quatro tratamentos diferenciados conforme às composições das rações formuladas, com três repetições cada. A densidade de estocagem utilizada foi proporcionalmente de 30 indivíduos m⁻², ou seja, nove indivíduos por tanque e as rações foram fornecidas aos camarões duas vezes ao dia, às 09h00min e 16h00min durante 14 dias (Figura 10).

Todos os tanques foram submetidos à aeração constante fornecida por soprador de 0,5 CV difundidas por mangueiras e pedras porosas, enquanto a salinidade foi mantida em 30. Foram realizadas trocas parciais de água para manutenção da qualidade da água e retirada das excretas e sobras de ração através de sifonamento.

Figura 10. Cultivo experimental com camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com ração comercial aditivadas com biomassa microalgal da *N. oculata*.



Fonte: Fotografado pelo autor.

4.3.3 Parâmetros de qualidade da água

Foram realizadas análises diárias para a determinação de pH com um medidor portátil, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) nos horários de alimentação. As concentrações de amônia (mg L^{-1}) e nitrito (mg L^{-1}) foram determinadas em espectrofotômetro a cada dois dias.

4.3.4 Parâmetros de crescimento zootécnico

No início e no final dos cultivos 100% dos camarões de cada tanque foram pesados em balança digital com precisão de 0,1g e com a obtenção dos dados foram determinados os seguintes parâmetros zootécnicos; Taxa de Sobrevivência (S%), Ganho de Biomassa (GB), Ganho de Peso Médio Diário (GPD) e Taxa de Crescimento Específico (TCE) (HAMIDOGHLI et al., 2019).

$$S\% = (N_f / N_i) / 100 \quad (02)$$

Onde,

S - taxa de sobrevivência (%);

Nf e Ni - número final e inicial de camarões, respectivamente.

$$GB = B_f - B_i \quad (03)$$

Onde,

GB – ganho de biomassa,

Bf e Bi – biomassa final e inicial respectivamente.

$$\text{GPD} = \text{PMf} - \text{PMi} / \text{T} \quad (04)$$

Onde,

GPD - ganho de peso médio diário (mg dia^{-1}),

PMf e PMi - peso médio final e inicial (mg),

T – tempo de cultivo (dias).

$$\text{TCE} = \ln \text{Pf} - \ln \text{Pi} / \text{T} \times 100 \quad (05)$$

Onde:

ln – logaritmo neperiano e;

Pf e Pi – peso médio inicial e final (mg);

T – tempo de experimento (d).

4.3.5 Análise dos parâmetros imunológicos dos camarões *P. vannamei* cultivados

Foi realizada a coleta da hemolinfa para a contagem diferencial dos hemócitos (CDH) dos camarões no início e ao final dos experimentos (Figura 11). 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 (YEH; CHEN, 2009).

Figura 11. Procedimento da retirada da hemolinfa do camarão *P. vannamei* (A) e Hemolinfa junto anticoagulante em enpefoff (B).



Fonte: Fotografado pelo autor.

A coleta inicial foi realizada na fazenda, utilizou um pool de três indivíduos, o volume retirado foi transferido para um tubo eppendorf contendo soluções anticoagulantes (AC), na proporção de 1:4 (hemolinfa:AC), enquanto na coleta final foi utilizado um individuo de cada tratamento, na qual contabiliza três camarões para o pool de cada tratamento. O volume retirado foi transferido para um tubo eppendorf contendo soluções anticoagulantes (AC), na proporção de 1:2 (hemolinfa:AC) (TABELA 7).

Tabela 7. Solução isotônica anticoagulante para camarão (pH 7,2) (SIC- EDTA).

Composição	Peso molecular	Concentração	g/ 200ml
NaCl	58,45	450 mM	5,26
KCl	74,56	10 mM	0,15
HEPES	238,3	10 mM	0,48
EDTA	372,24	10mM	0,74

Fonte: Dados do experimento.

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.

4.4 Análises estatísticas

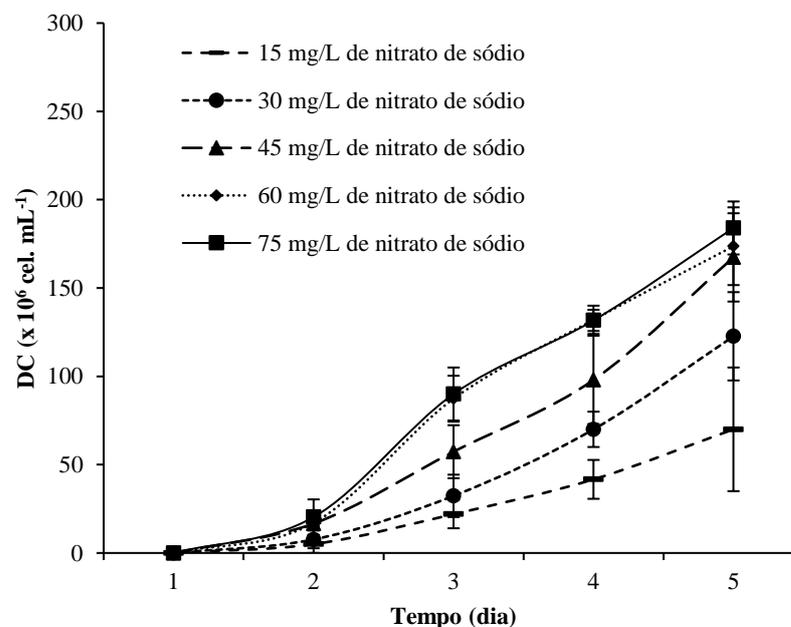
Os valores obtidos em cada um dos três experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) simples ($P < 0,05$) e, quando houve diferença significativa, as médias dos parâmetros foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos cultivos de *N. oculata* em meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio

A curva de crescimento em densidade celular da *N. oculata* cultivada em diferentes concentrações de nitrato de sódio (Figura 124) mostra que todos os tratamentos passaram pela fase de adaptação até o segundo dia cultivo. Posteriormente, os tratamentos com concentrações de 60 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio atingiram a fase de crescimento exponencial de forma mais evidente, e permaneceram assim até o quinto dia de cultivo, onde obtiveram a densidade celular máxima de 173,36 e 202,17 x 10⁶ cel. mL⁻¹, respectivamente. Desta forma, o crescimento da *N. oculata* foi diretamente proporcional a quantidade de nitrato de sódio nos cultivos, já o tratamento com apenas 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio resultou na concentração celular máxima de 80,96 x 10⁶ cel. mL⁻¹, a menor dentre todos os tratamentos.

Figura 12. Curvas de crescimento da *N. oculata* cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75 m L⁻¹ de nitrato de sódio.



Fonte: Dados do experimento.

WEI; HUANG (2017) cultivando *N. oculata* em fotobiorreatores de 60 L com aeração contínua e sob estresse multifatorial, isto é, uma intensidade luminosa seis vezes maior que no presente trabalho ($360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), uma deficiência de nitrogênio (2 mg N mL^{-1}) e suplementação de $6,72 \text{ mg de Fe L}^{-1}$, condição essa descrita pelo mesmo autor como regulador eficaz do metabolismo lipídico em *N. oculata* (WEI et al., 2013b). Desse modo, obteve uma densidade celular máxima de $8,351 \times 10^7 \text{ cel. mL}^{-1}$, condição semelhante ao tratamento com apenas 15 mg L^{-1} de nitrato de sódio. Apesar de uma intensidade luminosa muito maior, outros fatores, dentre eles o volume foi determinante para que o crescimento se equiparasse. No trabalho de JIA et al., (2014) realizou-se a modificação da quantidade de nitrogênio no meio de cultura na espécie *Nannochloropsis oceanica*, cultivada em colunas de 1 L a 22°C sob iluminação 24 h ($55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a microalga foi exposta a um meio de cultura f/2 com nível de $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ e um outro meio com ausência desse mesmo composto. Ambas as culturas iniciaram com uma densidade celular $2 \times 10^8 \text{ cel. mL}^{-1}$, ou seja, um valor já próximo a densidade máxima do tratamento 75 mg L^{-1} de nitrato de sódio do presente trabalho e obtiveram aproximadamente densidades máximas de 9 e $4,5 \times 10^8 \text{ cel. mL}^{-1}$ respectivamente.

As taxas de remoção de nitrato em todos os tratamentos foram acima de 80%. Porém, foi evidenciado que a partir da quantidade de nitrato de sódio de 45 mg L^{-1} , as taxas de remoção de nitrato nos cultivos ultrapassaram 90%, demonstrando também, que quanto mais nitrato presente no meio, maior a assimilação deste composto pelas microalgas.

Tabela 8. Concentrações iniciais, finais e a taxa de remoção do nitrato ao final dos cultivos da *N. oculata* cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75 mg L^{-1} de nitrato de sódio.

Concentração de Nitrato de sódio (mg L^{-1})	Concentração inicial de nitrato (mg L^{-1})	Concentração final de nitrato (mg L^{-1})	Taxa de remoção de nitrato (%)
15	$2,42 \pm 0,22^a$	$0,38 \pm 0,02^a$	84,29 ^a
30	$3,25 \pm 0,68^{ab}$	$0,40 \pm 0,03^{ab}$	87,69 ^b
45	$4,50 \pm 0,72^b$	$0,45 \pm 0,02^b$	90,00 ^c
60	$6,34 \pm 0,53^c$	$0,52 \pm 0,01^{cd}$	91,84 ^c
75	$7,41 \pm 0,60^c$	$0,53 \pm 0,01^d$	92,80 ^c

*Os valores representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Dados do experimento.

No trabalho de (SIRAKOV; VELICHKOVA, 2014) a remoção de nitrogênio total (Amônia, Nitrito e Nitrato) de uma água residual da aquicultura foi de 78,4% com *N. oculata*, sendo a concentração inicial de nitrato próximo a 30mg L⁻¹ e a final foi de 2 mg L⁻¹, dessa maneira a remoção apenas de nitrato gira em torno dos 90%, valor semelhante a maioria dos tratamentos testados neste trabalho. Já SEPÚLVEDA et al., (2015) com a espécie *Nannochloropsis gaditana* relataram remoção apenas 40% para o nitrogênio total, contudo segundo os autores isso foi consequência do elevado nível (338 mg L⁻¹) presente na água residual testada.

Para simular águas residuais da aquicultura (SAIU et al., 2016) adicionou meio Guillard f / 2 à água do mar e adicionou também e diferentes níveis de sais de nitrato e ureia no cultivo da *N. oculata*, desta forma os autores observaram que a degradação total do nitrato ocorreu 3-5 dias, enquanto a ureia o consumo atingiu taxas de remoção variando de 44,7 a 72,6%.

Antagonicamente as concentrações de nitrato, o rendimento lipídico foi inversamente proporcional à quantidade de nitrato de sódio no meio de cultivo. O tratamento com quantidade de apenas 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio resultou em um rendimento médio de lipídios totais de 49,41%, ao passo que o tratamento com 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio obteve o menor rendimento lipídico, apenas 23,36% (TABELA 9). Corroborando com o trabalho de LACOUR et al., (2012) onde o autor afirma que a deficiência de nutrientes no meio de cultura das microalgas, pode desencadear uma mudança no metabolismo de lipídios, principalmente os neutros.

Tabela 9. Densidade celular final e rendimento lipídico da *N. oculata* cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75 m L⁻¹ de nitrato de sódio.

Concentração de Nitrato de sódio (mg L ⁻¹)	X _{max} (x 10 ⁶ cel. mL ⁻¹)	Rendimento lipídico (%)
15	80,96±12,54 ^a	49,41±0,14 ^a
30	130,96±9,95 ^b	35,68±0,12 ^b
45	169,56±9,67 ^c	31,21±0,58 ^c
60	173,36±11,57 ^c	26,77±0,36 ^d
75	202,17±8,44 ^d	23,36±0,15 ^e

*Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística (p<0,05).

Fonte: Dados do experimento.

Os resultados de rendimento lipídico do presente trabalho foram semelhantes aos trabalhos realizados também em meio Guillard f/2 e BG11 e superior

ao cultivo realizado em meio alternativo. Em meio Guillard f/2, foi avaliado o efeito do cultivo em regime estacionário e semicontínuo. Foi encontrado 53,13% de lipídios no regime estacionário (MARTÍNEZ-MACÍAS et al., 2018). Já no meio BG11, em que foi avaliado o efeito do uso de extrato da cianobactéria *A. vaginicola* como fonte de nutriente, o percentual lipídico encontrado foi de 40%. (REZASOLTANI et al., 2019). No cultivo utilizando meio alternativo, por sua vez, em que foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de cobre, em ambiente interno em erlenmeyers de 2L, o percentual lipídico foi de 23,35% (MARTÍNEZ-MACIAS et al., 2019), próximo ao controle do presente trabalho.

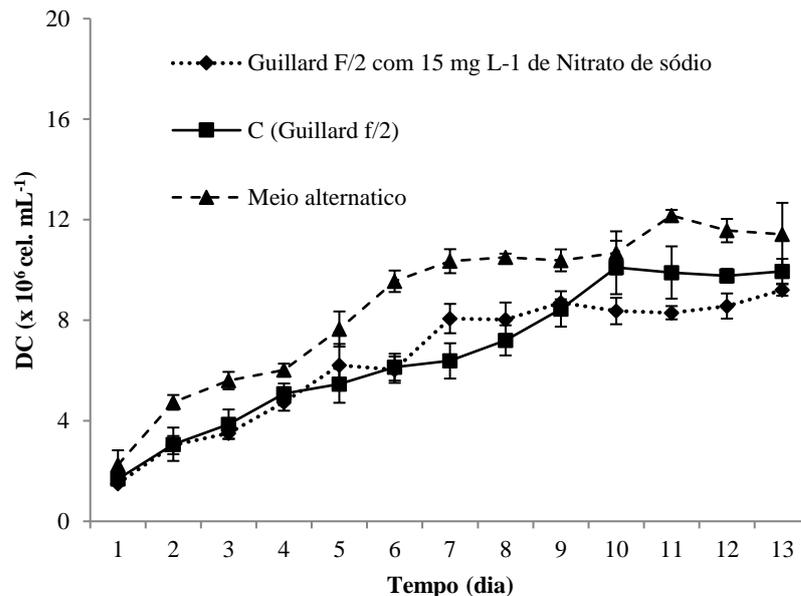
Uma vez que o maior teor lipídico foi 49,41% no tratamento contendo 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio, o segundo experimento foi realizado utilizando este tratamento, haja vista que em resposta a estresses, *Nannochloropsis sp.* tende a aumentar a produção de ácidos graxos, pois muitos são responsáveis pela proteção da célula. (RECHT; ZARKA; BOUSSIBA, 2012) e no trabalho de (RONQUILLO; FRASER; MCCONKEY, 2012) essa microalga apresentou altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (Pufa) (C18:3n-6, C18:3, C20:3n-6, C20:3n-3, C20:5 (ω-3) e C22:6n-3), o que indica potencial para utilização da biomassa algal para melhoria na qualidade nutricional de ração animal. Pois o foco do segundo experimento é a produção de biomassa e em seguida utiliza-la como aditivo na ração.

5.2 Avaliação dos cultivos de *N. oculata* em meio Guillard f/2 com concentrações de 15 e 75 mg L⁻¹ de nitrato de sódio e em meio alternativo

A curva de crescimento em densidade celular da *N. oculata* cultivada em meio Guillard f/2, meio Guillard f/2 com 15 mg L⁻¹ de nitrato de sódio e em meio alternativo (Figura 135) mostra que todos os tratamentos passaram, a partir da inoculação, para a fase de crescimento exponencial e atingiram a fase estacionária após 10 dias de cultivo. Observou-se que o cultivo em meio alternativo apresentou, durante todo o experimento densidade celular superior aos demais tratamentos, atingindo o máximo de 11,42 x 10⁶ cel. mL⁻¹, taxa de crescimento de 0,17 dia⁻¹ e conseqüentemente o menor tempo de duplicação, o qual foi de 4,11 dias (TABELA 10). Os demais tratamentos com meio Guillard f/2 obtiveram resultados semelhantes, contudo menores que no meio alternativo. Quando comparados com os resultados do primeiro experimento, os valores foram muito abaixo, isso se deve principalmente ao volume de cultivo, uma vez que o experimento um foi realizado com 3 L e o atual em

recipientes de 20 L e todas as outras condições laboratoriais foram às mesmas. Quanto menor o recipiente de cultivo, maior a probabilidade das células captarem uma maior incidência luminosa, assim aumentando assim sua duplicação.

Figura 13. Curvas de crescimento da *N. oculata* cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio de 15 e 75 mg L⁻¹ e meio alternativo.



Fonte: Dados do experimento.

Tabela 10. Densidade celular final da *N. oculata* cultivada em meio Guillard f/2 com concentrações de nitrato de sódio de 15 e 75 mg L⁻¹ e meio alternativo.

Tratamento	X _{max} (x10 ⁶ cel. mL ⁻¹)	μ _{max} (dia ⁻¹)	G (dia)
C (Guillard f/2)	9,95±0,49 ^a	0,16±0,01 ^a	4,40±0,08 ^a
Guillard F/2 (15 mg L ⁻¹ NS)	9,20±0,23 ^b	0,15±0,01 ^a	4,58±0,08 ^b
Meio alternativo	11,42±1,26 ^{ac}	0,17±0,01 ^a	4,11±0,18 ^c

*Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística (p<0,05).

Fonte: Dados do experimento.

No presente projeto, o tratamento em meio alternativo obteve a melhor densidade celular máxima, porém, quando comparados com outros trabalhos à densidade celular máxima foi bem inferior. Um trabalho utilizando também o meio de cultura Guillard f/2 avaliou o efeito do ambiente interno e externo em mangueira semitransparente de 55 L e tanques de fibra de vidro com volume de 2.000 L, a melhor densidade celular máxima foi de 134 x 10⁶ cel mL⁻¹ em ambiente interno (CARVAJAL-

OSSES; CHACÓN-GUZMÁN; HERRERA-ULLOA, 2018). Em outro trabalho utilizando também o meio Guillard f/2 em avaliando os efeitos de diferentes luminosidades em recipientes transparentes de 1L, a densidade celular máxima foi 175×10^6 cel mL⁻¹ em luminosidade de $650 \mu\text{mol E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, também bem superior aos resultados do presente trabalho, possivelmente devido maior incidência luminosa (MARTÍNEZ MACIAS et al., 2017). Já em outro estudo em que foi avaliado o efeito da água residual municipal em diferentes concentrações em erlenmeyers de 0,25 L, a densidade celular máxima foi $12,7 \times 10^6$ cel mL⁻¹ com 75% de água residual, resultado semelhante ao do presente trabalho (REYIMU; ÖZÇIMEN, 2017).

5.3 Avaliação uso da biomassa algal como aditivo na ração do camarão *Litopenaeus vannamei*

O experimento ocorreu em ambiente indoor controlado, o qual favoreceu para que os parâmetros físicos e químicos da água fossem constantes os 14 dias de cultivos e semelhantes em todos os tratamentos, com valores de temperatura 27 °C, oxigênio dissolvido > 5,0 mg L⁻¹ pH $7,90 \pm 0,10$ e compostos nitrogenados como amônia e nitrito próximos a zero mg L⁻¹.

A temperatura influencia diretamente na velocidade do metabolismo dos animais ectodérmicos ou mais conhecidos como animais de "sangue frio", ou seja, a temperatura de seu corpo varia conforme a temperatura do ambiente. Por isso é considerada um parâmetro de fundamental importância em cultivos. O *Litopenaeus vannamei* é considerada uma espécie tropical ou subtropical e se desenvolve satisfatoriamente a temperaturas entre 25 e 28 °C, embora também cresçam aceitável entre 20 e 30 °C. (PIÑA-VALDEZ et al., 2015), o fato de não haver variações é um importante, tendo em vista que uma variação térmica diária elevada (> 4 °C) é um fator mais comum associado à Mancha Branca nos cultivos (NUNES; FEIJÓ, 2017)

Segundo Sá (2011), a quantidade de oxigênio dissolvido para um bom desenvolvimento dos animais aquáticos é um nível acima de 50% da saturação, o que na região onde o trabalho foi desenvolvido gira em torno de 4 mg L⁻¹, logo todos os tratamentos respeitaram a condição de boas práticas de manejo, haja vista os valores oxigênio dissolvido permaneceram constantes e sempre acima de 5 mg L⁻¹. O mesmo autor afirma que valores entre 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ causa uma conversão alimentar baixa, crescimento lento e resistência a enfermidades reduzida, valores entre 1,0 e 1,5 mg

L⁻¹ podem ser letal quando a exposição for prolongada e letal quando abaixo de 1,0 mg L⁻¹. Como também o excesso pode causar problemas, concentrações acima de 15,0 mg L⁻¹ os animais podem sofrer com o aparecimento de bolhas de gás. Desta maneira, concentrações de oxigênio dissolvido entre 4 e 15 mg L⁻¹ são consideradas ideais, promovendo boas taxas de crescimento e integralidade biológica.

O pH se manteve levemente alcalino em todos os tratamentos testados, não variando ao longo do período de cultivo. Além disso, não apresentou variação diária, se mantendo em $7,9 \pm 0,1$ às 9h00min e às 17h00min. Isso ocorreu, porque o cultivo foi realizado em águas claras, logo não havendo a presença de fitoplâncton que é o principalmente responsável pela variação diária de pH nos ambientes de cultivo, pois no processo de fotossíntese há um consumo de CO₂ e com isso tendendo um aumento do pH, da mesma forma no período noturno a qual acontece apenas o processo da respiração incremento de CO₂ na água tendendo o pH baixar.

Segundo Boyd (2000), valores de pH entre 6,5 e 9 são considerados ideais para o cultivo de animais aquáticos. Logo em todos os tratamentos estavam dentro da faixa ideal de cultivo. Caso os valores estivessem abaixo de 6,5 causariam estresse ácido, menores de 4 morte por acidose, por outro lado valores acima de 9 até 11 causam estresse alcalino, e acima disso morte por alcalose.

O composto nitrogenado amônia adentra no ambiente de cultivo aquático por fertilização nitrogenada, excreção dos animais aquáticos (branquiais e fecais) e a transformação microbiana anaeróbica (SÁ, 2011). É um composto tóxico que ameaça a qualidade de água e o crescimento dos camarões (CHEN; LIN, 1992), uma vez que o excesso de amônia causa alterações no metabolismo oxidativo do ácido tricarbóxico, resultando na diminuição das concentrações celulares de ATP e inibição do transporte ativo dos íons sódio, podendo afetar o transporte dos íons cloreto, bicarbonato e a reabsorção de água em epitélios transportadores (OSTRENSKY, 1991).

Pelo processo da nitrificação, ou seja, na presença de oxigênio e bactérias nitrificantes a amônia é convertida a nitrato, tendo nitrito como produto intermediário. Assim como a amônia pode vir a ser bastante tóxico, causando mortalidade em larviculturas e sistemas de cultivo (BARBIERI, 2010). A toxicidade do nitrito atua sobre o transporte de oxigênio, o mesmo se liga à hemocianina, ocupando o lugar do oxigênio, transformando-a em metahemocianina, a qual é incapaz de transferir oxigênio para os tecidos. (MELO et al., 2016).

Concentrações padrões de amônia é de valores inferiores a 20 µg/L VINATEA (2004) e recomendado níveis inferiores a 1 mg/L de nitrito (NUNES, et. al, 2005), assim os parâmetros encontrados no trabalho ficaram dentro do aceitável, uma vez que para tal condição foram realizadas trocas parciais de água para manutenção de sua qualidade.

Os parâmetros zootécnicos (Tabela 112) demonstraram que não houve mortalidade e que a adição de biomassa microalgal não influenciou estatisticamente ($p < 0,05$) no crescimento dos camarões. Os dados obtidos de peso médio final, ganho de biomassa, ganho de peso médio diário e a taxa de crescimento específico, foram semelhantes dentre todos os tratamentos e controle.

Tabela 11. Parâmetros zootécnicos do *P. vannamei* alimentado com ração adicionada de 5% de biomassa de *N. oculata* cultivada em diferentes meios de cultura.

Tratamento	PMI (g)	PMF (g)	GB (g)	GPD (mg dia ⁻¹)	TCE (%)
C (Ração)	4,20±0,20 ^a	4,67±0,66 ^a	0,47±0,46 ^a	0,05±0,02 ^a	1,08±0,39 ^a
T1 (Alternativo)	4,00±0,53 ^a	4,86±0,45 ^a	0,86±0,14 ^a	0,06±0,01 ^a	1,41±0,34 ^a
T2 (G15)	3,67±0,38 ^a	4,50±0,65 ^a	0,83±0,46 ^a	0,06±0,03 ^a	1,44±0,77 ^a
T3 (G75)	4,27±0,38 ^a	4,65±0,08 ^a	0,43±0,37 ^a	0,05±0,01 ^a	1,05±0,10 ^a

*Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Dados do experimento.

Independentemente de não haver diferenças estatísticas ($p < 0,05$) de nenhum parâmetro entre os tratamentos, o Alternativo e G15 destacaram-se com os maiores ganhos de biomassa 0,86±0,14g e 0,83±0,46g respectivamente, conseqüentemente as maiores taxas de crescimento específico, sendo, portanto o valor G15 1,44±0,77% e do Alternativo 1,41±0,34%. É de conhecimento do autor do trabalho que cultivos comerciais, sejam em viveiros heterotróficos ou convencionais um bom ganho de biomassa semanal para os camarões gira em torno de 1g na fase juvenil, assim sendo que apesar das boas práticas de manejo, o camarão do trabalho não atendeu as expectativas de crescimento do mercado, contudo é importante resaltar que o trabalho foi realizado em águas claras, ou seja, ausência de alimento natural o qual está presente nas outras modalidades de cultivo e tem sua parcela de contribuição no crescimento do camarão.

Parâmetros zootécnicos no camarão *L. vannamei* foram observados no trabalho de (RAHMAN et al., 2017) o qual realizou testes com a substituição parcial e

total da ração comercial pela microalga *Tetraselmis chuii* liofilizada (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Os camarões em fase de pós-larvas (PL) foram estocados em uma densidade de 50 PL L⁻¹ em água com salinidade 30 e alimentados quatro vezes ao dia em intervalos de 6 h com a dieta formulada e artêmia ad libitum por 12 dias. Como resultado obteve uma maior sobrevivência nos camarões alimentados com T50 (97,6 ± 1,4%), seguido por T75 (85,6 ± 3,5%). Os autores sugerem efeito positivo da inclusão de *T. chuii* na dieta PL até 75% de substituição, tendo em vista que camarões alimentados com essa dieta apresentaram menor nível de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), logo a *T. chuii* apresentou um efeito protetor contra o estresse oxidativo.

No atual trabalho, não foi possível avaliar relação direta com a sobrevivência dos camarões com o uso da *N. ocullata* como aditivo de 5% na ração comercial, haja vista que não houve mortalidade no período experimental, contudo ficou comprovada relação com a contagem final de hemócitos, basta ver (FIGURA 16) a diferença estatística (p<0,05) entre os tratamentos, com destaque para o melhor desempenho do tratamento G15 e pior para o Alternativo.

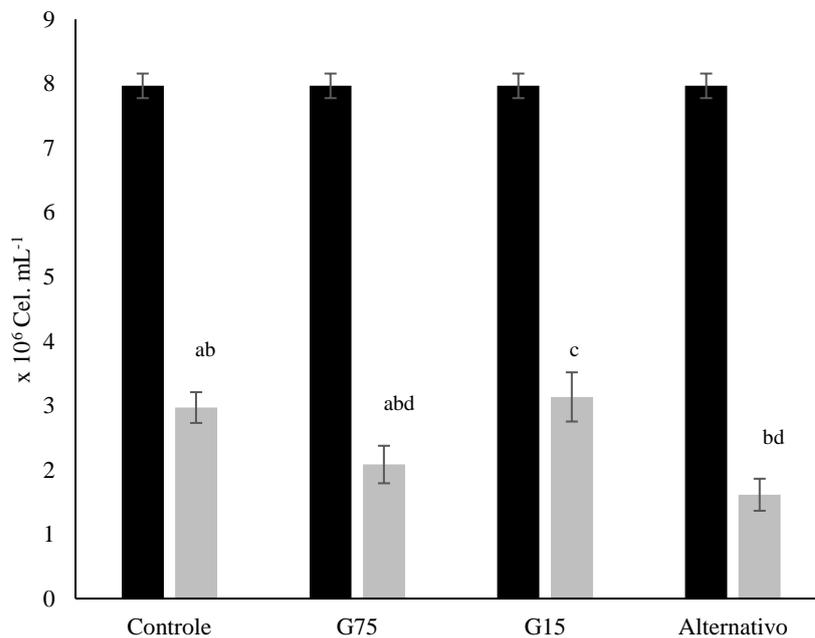
Apesar de que em todos os tratamentos testados o número de hemócitos final foi inferior ao número de hemócitos controle, ou seja, quando o camarão estava em águas de cultivo heterotrófico, sendo, portanto esse o motivo, pela razão do meio rico em bioflocos é composta de biomassa particulada, colonizada por bactérias, com efeito probiótico (AGUILERA-RIVERA et al., 2014), assim contribuindo para a melhora do sistema imunológico do camarão (AGUILERA-RIVERA et al., 2019).

O delineamento experimental utilizou camarões oriundos de ambientes heterotróficos, porque o vírus da mancha branca presente em todo território cearense destes 2016, não se desenvolve em ambientes com controle térmico de 31°C a 32°C (SOUSA et al., 2019), assim não sendo um fator influenciador no resultado.

(LI et al., 2016) testou sete tipos de dietas no cultivo do camarão *Penaeus monodon*, utilizou 5% de aditivo, o mesmo valor do atual trabalho de seis tipos de microalgas isoladas em diferentes corpos d'água australianas (*Entomoneis sp.*, *Melosira sp.*, *Stauroneis sp.*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.*, *Nannochloropsis sp.*) e uma policultura de Clorofíceas (*Schroederiella apiculata*, *Scenedesmus sp.*, *Tetraedrom minimum*, *Mesotaenium sp.* and *Desmodesmus sp.*). Após 28 dias, não houve diferença significativa no peso corporal dos camarões alimentos. O melhor resultado em valor nominal de ganho de biomassa 2,03 ± 0,04 g foi para a microalga *Melosira sp.* E sendo essa também essa a de melhor sobrevivência 84,44%, contudo esse

parâmetro sendo diferente estatisticamente dos demais tratamentos. O teste com a *Nannochloropsis sp.* obteve $1,41 \pm 0,29$ g de ganho de biomassa e 62,22% de sobrevivência. Em ambos os tratamentos o autor conseguiu ganhos de biomassa maiores do que no presente trabalho que de valor nominal o melhor foi de $0,86 \pm 0,14$ g para o tratamento Alternativo, seguido de $0,83 \pm 0,46$ g para o tratamento G15, entretanto as espécies testadas de camarões são diferentes.

Figura 14. Médias e desvios-padrão da contagem total de hemócitos nos diferentes tratamentos.



Fonte: Dados do experimento.

No trabalho de (LI et al., 2016) os parâmetros de resposta imune foi os de fagocitose e superoxidato dismutase (SOD) na hemolinfa, parâmetros diferentes do trabalho, contudo um dado interessante que foi observado é que apesar de não tenha havido diferença estatística de taxa de fagocitose e/ou atividade da SOD as espécies de microalgas marinhas apresentaram melhor eficácia do que os de água doce.

Felix *et al.*, 2019, realizaram um estudo com diferentes inclusões de *Dunaliella sp.*, encontrando maiores contagens de hemócitos no tratamento onde houve a inclusão de 3% da microalga na dieta, o que corrobora com os resultados aqui apresentados, com a diferença da espécie de microalga utilizada. O aumento na contagem de hemócitos tem sido reportado como um mecanismo de incremento da

resposta imune dos crustáceos durante períodos de estresse, tornando-os mais resistentes (GRANADA et al., 2018).

(MACIAS-SANCHO et al., 2014), substituíram nas proporções 0%, 25%, 50%, 75% e 100% a farinha de peixe da ração por farinha de *Arthrospira platensis*, encontrou diferenças estatísticas para hemócitos granular mais alto e hemócitos hialinos mais baixo quando o nível de substituição excedeu 25%. O mesmo autor usando agora a *A. platensis* como suplemento obteve resultado semelhante, pois os hemócitos granulares foram mais abundantes nos organismos que receberam *A. platensis*, enquanto os hemócitos hialinos foram mais abundantes nos camarões que não receberam (MACIAS-SANCHO et al., 2017). PILOTTO et al., (2019), também obteve incremento da contagem de hemócitos utilizando a microalga do gênero *Arthrospira*.

6. CONCLUSÕES

O número de hemócitos nos camarões ao final do experimento foi menor em todos os tratamentos, isso indica que os camarões quando estava sendo cultivados na fazenda em tecnologia heterotrófica apresentavam uma imunidade melhor em comparação ao final do experimento que foi realizado em águas claras, contudo o tratamento que foi alimentado com biomassa da microalga *N. oculata* cultivada em meio de cultura Guillard contendo 15 mg.L^{-1} de nitrato de sódio obteve o melhor resultado em comparação aos demais, haja vista, foi o tratamento com o número maior de hemócitos, indicando a possibilidade de um efeito imunoestimulante quando há uma maior presença de lipídeo na biomassa algal.

Os resultados indicaram que a *N. oculata* obteve crescimento diretamente proporcional ao aumento da concentração de nitrato de sódio no meio de cultura. Os melhores resultados de densidade celular máxima e taxa de crescimento específico ocorreram na concentração de 75 mg L^{-1} de nitrato de sódio no meio Guillard f/2. Em contrapartida o aumento da concentração de nitrato foi inversamente proporcional ao rendimento lipídico, pois o maior resultado foi obtido no cultivo com concentração de 15 mg L^{-1} de nitrato de sódio presente no meio Guillard f/2.

Quando foram comparados o meio Guillard f/2, meio Guillard f/2 com 15 mg L^{-1} de nitrato de sódio e meio alternativo a base de Úreia e SPT, os resultados demonstraram que o cultivo em meio alternativo obteve a maior densidade celular máxima, maior taxa de crescimento específico e, conseqüentemente, menor tempo de geração dos cultivos, sendo, portanto, além de mais viável economicamente por ter um menor número de reagentes, possui potencial na produção de biomassa para posterior aplicação, porém o uso como aditivo na alimentação do camarão demonstrou o pior desempenho entre os demais tratamentos testados.

Os parâmetros zootécnicos demonstraram que não houve mortalidade e que a adição de biomassa microalgal não influenciou no crescimento dos camarões. Os dados obtidos de peso médio final, ganho de biomassa, ganho de peso médio diário e a taxa de conversão alimentar foram semelhantes dentre todos os tratamentos e controle.

REFERÊNCIAS

- ABCC/ MAPA. **Censo da Carcinicultura do Litoral Sul do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes**. 2017. Disponível em <http://abccam.com.br/wpcontent/uploads/2017/12/CENSO-DA-CARCINICULTURA-LITORAL-NORTE.pdf>. Acesso em: 06 de março de 2018.
- AGUILERA-RIVERA, D. et al. Probiotic effect of FLOC on Vibrios in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 424–425, p. 215–219, 2014.
- AGUILERA-RIVERA, D. et al. Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 1, p. 119–136, 2019.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402–3410, 2011.
- AMMAR, S. H.; KHADIM, H. J.; MOHAMED, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. **Environmental Technology and Innovation**, v. 10, p. 132–142, 2018.
- AMOUZAD KHALILI, M. et al. Antioxidant and Antibacterial Effects of Vitamins C and E Alone or a Combination on Microalgae (*Nannochloropsis oculata*) Paste Quality during Cold Storage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2019.
- ANDRADE, T., 2007. New hybrid assay can detect IMNV in resource-poor settings, global aquacult. *Advocate* 68–69.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007.
- ARANGUREN, L. F.; TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Protection from yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus vannamei* pre-infected with Taura syndrome virus (TSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, n. 3, p. 185–192, 2012.
- ARAUJO, G. S. et al. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5248–5250, 2011.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, n. 1, p. 64–70, 2006.

BAHARUDDIN, N. N. D. E. et al. Marine microalgae flocculation using plant: The case of *Nannochloropsis oculata* and *Moringa oleifera*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 2, p. 831–840, 2016.

BARBIERI, E. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. 2010.

BARBIERI-JÚNIOR, R.C.; OSTRENSKY-NETO, A. **Camarões Marinhos - Reprodução, Maturação e Larvicultura**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 243 p, 2001.

BERNSTEIN, H. C. et al. Direct measurement and characterization of active photosynthesis zones inside wastewater remediating and biofuel producing microalgal biofilms. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 206–215, 2014.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology Issued by THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION** Canadian **Journal of Biochemical Physiology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nrcresearchpress.com>. Acesso em: 2 jan. 2020.

BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and processes - matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, n. 3, p. 267–279, 1992.

BOYD, C. E. 2000. **Manejo da Qualidade de Água na Aqüicultura e no cultivo do Camarão Marinho**. Tradução: Josemar Rodrigues. 157p.

BRASIL. Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009. Dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, revoga a Lei no 7.679, de 23 de novembro de 1988, e dispositivos do Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, e dá outras providências. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 30 jun. Seção 1, p. 1. 2009

BRENNAN, L. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 36, n. 1, p. 2941–2948, 2010.

BRITO, L. O. et al. Effects of two commercial feeds with high and low crude protein content on the performance of white shrimp *litopenaeus vannamei* raised in an integrated biofloc system with the seaweed *gracilaria birdiae*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2018.

CARLOS HENRIQUE DOS ANJOS DOS SANTOS et al. Crescimento e sobrevivência do camarão-branco do Pacífico *Litopennaeus vannamei* (BOONE, 1931) em diferentes salinidades. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 783–789, 2009.

CARVAJAL-OSES, M. D. M.; CHACÓN-GUZMÁN, J.; HERRERA-ULLOA, Á. Optimización en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en

un fotobiorreator tubular helicoidal. **Revista Tecnología en Marcha**, v. 31, n. 2, p. 117, 2018.

CAVALCANTI, L. B. Variação das Condições Hidrológicas e da Clorofila a Associadas ao Cultivo do Camarão Marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), na Região Estuarina do Rio Paraíba do Norte (Paraíba – Brasil). Recife, 2003. 148 p. Tese (Doutorado em Oceanografia) Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

CUNHA, E. de A. P. Metodologia para gestão do risco da Síndrome de Taura no Brasil devido à importação de pós-larvas de camarão. 2008. 179f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CHEN, C. L.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Dewatering and Drying Methods for Microalgae. **Drying Technology**, v. 33, n. 4, p. 443–454, 2015.

CHEN, J. C.; LIN, C. Y. Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles at different salinity levels. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 156, n. 1, p. 139–148, 1992.

CHEW, K. W. et al. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 9, n. 8, p. 1–13, 2018.

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

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 461–465, 2004.

COSTA, A. M. et al. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. **Aquaculture**, v. 291, n. 3–4, p. 141–146, 2009.

DALL, W., HILL, B.J., ROTHLSBERG, P.C., STAPLES, D.J., 1990. **The Biology of the Penaeidae**. Adv. Mar. Biol. 27, 489.

DASH, P. et al. Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review of Current Approaches and Future Perspectives. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 25, n. 3, p. 245–255, 2017.

DE SCHRYVER, P.; DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 10–11, 2014.

DESMORIEUX, H.; DECAEN, N. Convective drying of spirulina in thin layer. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 4, p. 497–503, 2005.

DIGGLES, B. K. (2017). Field observations and assessment of the response to an outbreak of White Spot Disease (WSD) in Black Tiger Prawns (*Penaeus monodon*) farmed on the Logan River in November 2016. Retrieved from, https://www.researchgate.net/publication/320601628_Field_observations_and_assessment_of_the_response_to_an_outbreak_of_White_Spot_Disease_WSD_in_Black_Tiger_Prawns_Penaeus_monodon_farmed_on_the_Logan_River_in_November_2016

DURMAZ, Y.; ERBIL, G. C. Effect of light path length of tubes on growth rate of *nannochloropsis oculata* using industrial scale tubular photobioreactor in the marine hatchery. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 4783–4789, 2017.

FAÉ NETO, W. A.; BORGES MENDES, C. R.; ABREU, P. C. Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 7, p. 2527–2535, 2018.

FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. The state of world fisheries and aquaculture 2018. Roma: FAO. 2018

FEIJÓ, R. G. et al. Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 380–383, n. February 2007, p. 1–5, 2013.

FERNANDES, T. et al. Changes in fatty acid biosynthesis in marine microalgae as a response to medium nutrient availability. **Algal Research**, v. 18, p. 314–320, 2016.

GOARANT, C. et al. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. **Aquaculture**, v. 253, n. 1–4, p. 105–113, 2006.

GOARANT, C.; MERIEN, F. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 1, p. 27–35, 2006.

GRAHAM, P. J. et al. Emerging microalgae technology: A review. **Sustainable Energy Fuels**, p. 13–38, 2017.

GRANADA, L. et al. **Modelling integrated multi-trophic aquaculture: Optimizing a three trophic level system** *Aquaculture*, 2018.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of marine invertebrate animal**, p. 26–60, 1975.

GULDHE, A. et al. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **FUEL**, v. 128, p. 46–52, 2014.

HAMIDOGHLI, A. et al. Dietary lipid requirement of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles cultured in biofloc system. **Aquaculture Nutrition**, n. June, p. 1–10, 2019.

HE, W. et al. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 164–173, 2017.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

IBGE. Censo Agropecuário de 2017. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminares.pdf . Acesso em: 22 mar. 2019.

JIA, J. et al. Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. 2014.

JIANG, S. Aquaculture, capture fisheries, and wild fish stocks. **Resource and Energy Economics**, v. 32, n. 1, p. 65–77, 2010.

JOHN, P. et al. Accounting , Organizations and Society The influence of a good relationship between the internal audit and information security functions on information security outcomes. **Accounting, Organizations and Society**, 2018.

JOSEPH, T. C. et al. Occurrence of viral pathogens in *Penaeus monodon* post-larvae from aquaculture hatcheries. **Data in Brief**, v. 4, p. 170–176, 2015.

KLINTHONG, W. et al. A Review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 15, n. 2, p. 712–742, 2015.

KLOAS, W. et al. A new concept for aquaponic systems to improve sustainability, increase productivity, and reduce environmental impacts. **AQUACULTURE ENVIRONMENT INTERACTIONS**, v. 7, n. 2, p. 179–192, 2015.

KUMAR, S. D. et al. Development and application of a novel immobilized marine microalgae biofilter system for the treatment of shrimp culture effluent. **Journal of Water Process Engineering**, v. 13, p. 137–142, 2016.

LACOUR, T. et al. DIEL VARIATIONS OF CARBOHYDRATES AND NEUTRAL LIPIDS IN NITROGEN-SUFFICIENT AND NITROGEN-STARVED CYCLOSTAT CULTURES OF *ISOCHRYSIS SP.1*. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 4, p. 966–975, ago. 2012.

LAVORANTE, B. R. B. DE O. et al. Método de determinação e avaliação da depleção de oxitetraciclina em camarão marinho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 7, p. 738–745, 2009.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster* . **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 697–743, 2007.

- LI, E. C., CHEN, L. Q.; ZENG, C., et al. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. **Aquaculture**, v. 265, 385-390, 2007.
- LI, C.; WENG, S.; HE, J. WSSV–host interaction: Host response and immune evasion. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 84, n. August 2018, p. 558–571, 2019.
- LI, Y. et al. Nutrient efficacy of microalgae as aquafeed additives for the adult black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 11, p. 3625–3635, 2016.
- LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, 2011.
- LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–183, 2012.
- LIMA, A. P. S. Estrutura genética de populações cultivadas do camarão marinho *litopenaeus vannamei* em Pernambuco. 2007, 85 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007
- LIN, C. Y.; TSENG, Y. M. Effects of LED irradiation and sea water culture on the lipid characteristics of *Nannochloropsis oculata*. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 10, n. 2, 2018.
- LIN, J. et al. Microbial community in a multi-trophic aquaculture system of *Apostichopus japonicus*, *Styela clava* and microalgae. **Aquaculture International**, v. 24, n. 4, p. 1119–1140, 2016.
- LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.
- LOW, C.; TOLEDO, M. I. Evaluación de la vida útil de floculados de *Nannochloropsis oculata* almacenados a distintas temperaturas de conservación. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 2, p. 315–321, 2015.
- LU, Y. et al. Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, n. 1, p. 67–70, 1995.
- MACIAS-SANCHO, J. et al. Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. **Aquaculture**, v. 426–427, p. 120–125, 2014.
- MACIAS-SANCHO, J. et al. *Arthrospira platensis* filtrada como alimento complementario de juveniles del camarón blanco: Efectos sobre crecimiento y sistema inmune. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 4, p. 593–604, 2017.

MALAKOOTIAN, M. et al. Optimization of culture media for lipid production by *Nannochloropsis oculata* for Biodiesel production. **Environmental Health Engineering and Management Journal**, v. 2, n. 3, p. 141–147, 2015.

MANISALI, A. Y.; SUNOL, A. K.; PHILIPPIDIS, G. P. Effect of macronutrients on phospholipid production by the microalga *Nannochloropsis oculata* in a photobioreactor. **Algal Research**, v. 41, n. April, p. 101514, 2019.

MARTÍNEZ-MACIAS, M. DEL R. et al. Uptake of copper from acid mine drainage by the microalgae *Nannochloropsis oculata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6311–6318, 2019.

MARTÍNEZ-MACÍAS, R. et al. Effect of fed-batch and semicontinuous regimen on *Nannochloropsis oculata* grown in different culture media to high-value products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 585–590, 2018.

MARTÍNEZ MACIAS, M. DEL R. et al. Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiésel. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 33, n. Special Issue 1, p. 85–91, 2017.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010.

MATONDO, F. K. et al. Spirulina Supplements Improved the Nutritional Status of Undernourished Children Quickly and Significantly: Experience from Kisantu, the Democratic Republic of the Congo. **International Journal of Pediatrics**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

MATSUI, H.; ANRAKU, K.; KOTANI, T. Spectrophotometry can monitor changes in algal metabolism triggered by nutrient deficiency in *Nannochloropsis oculata* cultured under various light-emitting diode light regimes. **Fisheries Science**, v. 85, n. 1, p. 167–176, 2019.

MELO, A.; CARLOS, P.; MARTINS, C. ANÁLISE DA CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS E CAPACIDADE COAGULANTE DA HEMOLINFA DO CAMARÃO *Litopenaeus Vannamei* (BOONE , 1931) EM CULTIVOS ANALYSIS OF TOTAL HEMOCYTES COUNTING AND CAPACITY OF HEMOLYMPH COAGULATION OF SHRIMP *Litopenaeus vannamei* (BOONE , 19. **B. Inst. Pesca**, v. 35, n. 4, p. 545–551, 2009.

MELO, F. P. et al. Toxicidade do nitrito para o camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistemas de água clara e bioflocos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 4, p. 855–865, 2016.

MIYOKO, M. N. et al. DESENVOLVIMENTO DA CARCINICULTURA MARINHA NO BRASIL E NO MUNDO: avanços tecnológicos e desafios. v. 41, n. 2, p. 65, 2011.

MILLÁN-OROPEZA, A.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. Biomass and lipid production from *Nannochloropsis oculata* growth in raceway ponds operated in sequential batch mode under greenhouse conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 33, p. 25618–25626, 2017.

MILLEDGE, J. J.; HEAVEN, S. **A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production** *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2013.

MIRBAKSHI, M. et al. Molecular Identification of *Vibrio harveyi* from Larval Stage of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea:Decapoda) By Polymerase Chain Reaction and 16S rDNA Sequencing. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 13, n. 2, p. 384–393, 2014.

MORALES-COVARRUBIAS, MARÍA SOLEDAD; LOZANO-OLVERA, R.; HERNÁNDEZ-SILVA, A. J. Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones, Ecuador*, n. 5., p. 33-39, 2010.

MOHA-LEÓN, J. D. et al. Improving the lipid content of *Nannochloropsis oculata* by a mutation-selection program using UV radiation and quizalofop. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 191–199, 2019.

NOLETO, K. S., SOARES, J. A. L. S., SOUSA, J. T. C., BARROS, P. C. A., NUNES, L. R. & SANTOS, E. C. B. Elaboração de nuggets com a polpa do camarão *Litopenaeus vannamei* e seus compostos nutricionais. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**. 10(2): 85-93 2017.

NUNES, A. J. P; FEIJÓ, R. G.; O Vírus da Mancha Branca e a convivência no cultivo de camarão marinho no Brasil. *Panorama da aquicultura*. 2017. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-virus-da-mancha-branca-e-a-convivencia-no-cultivode-camarao-marinho-no-brasil/>. Acesso em: 10 out 2017.

NUNES, A. J. P., GESTEIRA, T. C. V., OLIVEIRA, G. G., LIMA, R. C.; MIRANDA, P. T. C.; MADRID, R. M. 2005 Princípios para boas práticas de manejo na engorda de camarão marinho no Estado do Ceará. Instituto de Ciências do Mar (Labomar/ UFC). Programa de Zoneamento Ecológico Econômico (ZEE) do Estado do Ceará, Fortaleza, Ceará, 109 p

NUNES, A.J., MARTINS, P.C.C., GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada. Produtores sofrem com mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **Panorama Aqüiculture** 83, 37–51. 2004.

OANH, N. T. T. et al. Chemical Constituents of *Nannochloropsis oculata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 55, n. 3, p. 589–591, 2019.

OLIVEIRA, C. A. DE et al. Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria spirulina *Nutritional, functional and therapeutic potential of cyanobacterium spirulina*. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição.**, v. 7527, p. 52–59, 2013.

OLIVEIRA, E. G. et al. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1297–1303, 2008.

OLIVEIRA, E. G. et al. Optimisation of *Spirulina platensis* convective drying: Evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 1572–1578, 2010.

OSTRENSKY, A. 1991 Toxidade da amônia e do nitrito no processo produtivo de pós-larvas do camarão-rosa, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. Tese Mestrado, Univ. Fed. Paraná, Curitiba, PR, 105 pp

PALACIOS, Y. M.; VONSHAK, A.; BEARDALL, J. Photosynthetic and growth responses of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch cultures in relation to light intensity. **Phycologia**, v. 57, n. 5, p. 492–502, 2018.

PAVÓN-SURIANO, S. G. et al. Evaluation of colour temperatures in the cultivation of *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis oculata* in the production of lipids and carbohydrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 22, p. 21332–21340, 2018.

PHUOC, L. H. et al. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290, n. 1–2, p. 61–68, 2009.

PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. February, p. 47–52, 2019.

PIÑA-VALDEZ, P. et al. EFECTO COMBINADO DE TEMPERATURA Y SALINIDAD EN EL CONSUMO DE OXÍGENO EN POSTLARVAS DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* OXIGÊNIO DE PÓSLARVAS DE CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei* COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE AND SALINITY ON OXYGEN CONSUMPTION ON WHIT. **Boletim do Instituto de Pesca Inst. Pesca**, v. 41, n. 1, p. 89–101, 2015.

PRAKASH, J. et al. International Journal of Solar Energy. **International Journal of Solar Energy**, v. 18, n. May 2013, p. 303–311, 1997.

RAHMAN, N. A. et al. *Tetraselmis chuii* biomass as a potential feed additive to improve survival and oxidative stress status of Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **International Aquatic Research**, v. 9, n. 3, p. 235–247, 2017.

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3411–3424, 2011.

RAVEN, P.H. et al. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RAZZAK, S. A. et al. **Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013.

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. **BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING**, v. 94, p. 1495–1503, 2012.

REYIMU, Z.; ÖZÇİMEN, D. Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, p. 40–46, 2017.

REZASOLTANI, S. et al. Cyanobacterial extract as a source of nutrients for mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*. **Algal Research**, v. 39, n. December 2018, p. 101480, 2019.

REZENDE DOS SANTOS, R. et al. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, 2016.

RIZWAN, M. et al. **Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018.

RODRIGUES, J. A. G. et al. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodófitica *Halymenia pseudofl oresia* mediante uma estratégia Cultivation of shrimps treated with sulfated polysaccharides of *Halymenia pseudofl oresia* rhodophyceae through a prophylactic strate. **Revista Ciência Agronômica**, v. 20, n. 1, p. 71–78, 2009.

ROLIN, C. et al. Interactions between *Paramoeba perurans*, the causative agent of amoebic gill disease, and the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Aquaculture**, v. 456, p. 1–8, 2016.

RONQUILLO, J. D.; FRASER, J.; MCCONKEY, A. J. Effect of mixed microalgal diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. **Aquaculture**, v. 360–361, p. 64–68, 2012.

ROSENBERG, J. N. et al. **A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution** *Current Opinion in Biotechnology*, 2008.

RUSAINI; OWENS, L. Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns: A review. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 3, p. 367–377, 2010.

SÁ, M.V.C. **Limnocultura: Limnologia para aquicultura**. Edições UFC, 218p. 2012.

SAIU, G. et al. **Study of the Growth Parameters of the Nannochloropsis Oculata for the Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater through Design of Experiment Approach EUMAC-Eutrophication and MACrophites View project Ostrlnnova View project Study of the Growth Parameters of the Nannochloropsis Oculata for the Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater through Design of Experiment Approach**. 2016Disponível em: <www.aidic.it/cet>. Acesso em: 19 jul. 2019

SALES, R. et al. Production and use of a flocculated paste of Nannochloropsis oculata for rearing newborn seahorse Hippocampus reidi. **Algal Research**, v. 17, p. 142–149, 2016.

SANJEEWA, K. K. A. et al. Anti-inflammatory and anti-cancer activities of sterol rich fraction of cultured marine microalga nannochloropsis oculata. **Algae**, v. 31, n. 3, p. 277–287, 2016.

SELVIN, J.; LIPTON, A. P. Vibrio alginolyticus associated with white spot disease of Penaeus monodon. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, n. 1–2, p. 147–150, 2003.

SEPÚLVEDA, C. et al. Utilization of centrate for the production of the marine microalgae Nannochloropsis gaditana. 2015.

SHENE, C. et al. High pressure homogenization of Nannochloropsis oculata for the extraction of intracellular components: Effect of process conditions and culture age. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 4, p. 631–639, 2016.

SILVA, J. W. A. et al. Effect of nitrate depletion on lipid accumulation by the marine microalga Nannochloropsis oculata. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n. especial, p. 811–816, 2015.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. **Microalgae harvesting techniques: A review** *Journal of Environmental Management*, 2018.

SINGH, R. N.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2347–2353, 2012.

SIRAKOV, I. N.; VELICHKOVA, N. **Bioremediation of wastewater originate from aquaculture and Biomass production from microalgae species- NaNNochloropsis oculata and tetraselmis chuii** *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. [s.l: s.n.].

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. **Spirulina – From growth to nutritional product: A review** *Trends in Food Science and Technology*, 2017.

SOTO-RODRIGUEZ, S. A. et al. Virulence of Vibrio harveyi responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei. **Journal of**

Invertebrate Pathology, v. 109, n. 3, p. 307–317, 2012.

SOTO-RODRÍGUEZ, S. A. et al. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. **Aquaculture**, v. 258, n. 1–4, p. 109–115, 2006.

SOUSA, D. R. L. et al. DOENÇA DA MANCHA BRANCA DO CAMARÃO CINZA (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Científica de Medicina Veterinária da UNICEPLAC**, v. 5, n. 1, p. 2448–4571, 2019.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STENTIFORD, G. D. et al. New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1–6, 2017.

SUBASINGHE, R. **FAO . 2017 . Regional review on status and trends in aquaculture development in Asia-Pacific – 2015 , by Rohana Subasinghe . FAO Fisheries and Aquaculture Fisheries and REGIONAL REVIEW ON STATUS AND TRENDS IN AQUACULTURE DEVELOPMENT IN ASIA-PACIFIC – 2015.** [s.l: s.n.].

SUN, Y. et al. Boosting *Nannochloropsis oculata* growth and lipid accumulation in a lab-scale open raceway pond characterized by improved light distributions employing built-in planar waveguide modules. **Bioresource Technology**, v. 249, n. September 2017, p. 880–889, 2018.

TALPUR, A. D.; IKHWANUDDIN, M.; AMBOK BOLONG, A. M. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 400–401, p. 46–52, 2013.

TANG, K. F. J. et al. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, n. 2–3, p. 261–265, 2005.

TANG, K., NAVARRO, S., PANTOJA, C., ARANGUREN, F., & LIGHTNER, D. (2012). New genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) from the Kingdom of Saudi Arabia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(3), 179–185. <https://doi.org/10.3354/dao02470>

THOMPSON, F. et al. Biodiversity of Vibrios Biodiversity of Vibrios. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 68, n. OCTOBER 2004, p. 403–431, 2004.

TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45–55, 2013.

VANDENBERGHE, J. et al. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **Applied and Environmental**

Microbiology, v. 65, n. 6, p. 2592–2597, 1999.

VIDHYA HINDU, S. et al. A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 227–238, 2019.

VINATEA, L., 2004. **Fundamentos de Aquicultura**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 349.

VOGELEY, H.J.L., NERY, R., DO VALLE, B., VOGLEY, F.C., LIMA, J.V., SOARES, R. & PEIXOTO, S. Resistência dos camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus subtilis* a infecções por vibrio. *Atlântica*, Rio Grande, 34:41-45. 2012

WEI, L. et al. Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 534–538, 2013a.

WEI, L. et al. Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. 2013b.

WEI, L. et al. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. **Algal Research**, v. 26, n. 2, p. 2519–2530, 2016.

WEI, L.; HUANG, X. Long-duration effect of multi-factor stresses on the cellular biochemistry, oil-yielding performance and morphology of *Nannochloropsis oculata*. 2017.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 2010.

XU, W. J.; PAN, L. Q. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. **Aquaculture**, v. 356–357, p. 147–152, 2012.

YEGANEH, S.; TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 84–88, 2015.

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

YUAN, G. et al. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. **Food Control**, v. 59, p. 818–823, 2016.

ZENGER, K. R. et al. Genomic selection in aquaculture: Application, limitations and opportunities with special reference to marine shrimp and pearl oysters. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. JAN, 2019.

ZHANG, L. et al. Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 136–142, 2015.

ZHANG, Q. et al. Cultivation of algal biofilm using different lignocellulosic materials as carriers. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 115, 2017.

ZHOU, H. et al. Sensitivity of Larvae and Adult and the Immunologic Characteristics of *Litopenaeus vannamei* under the Acute Hypoxia. **Journal of Chemistry Table**, v. 2014, 2014.