

Ariane Martins Guimarães

**Substituição do óleo de peixe pela farinha de  
*Schizochytrium limacinum* em dietas para o  
camarão-branco-do-Pacífico**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura

Orientador: Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guimarães, Ariane Martins

Substituição do óleo de peixe pela farinha de  
Schizochytrium limacinum em dietas para o camarão-branco  
do-pacífico / Ariane Martins Guimarães ; orientador, Felipe  
do Nascimento Vieira - Florianópolis, SC, 2016.

60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. 3. n-3. 4.  
DHA. 5. nutrição. I. Vieira, Felipe do Nascimento. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Substituição do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum* em dietas para o camarão-branco-do-pacífico**

Por

ARIANE MARTINS GUIMARÃES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



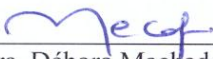
---

Dr. Felipe do Nascimento Vieira – *Orientador*



---

Dra. Adriana Helena do Nascimento Ferreira - ALTECH



---

Dra. Débora Machado Fracalossi - UFSC



---

Dr. Roberto Bianchini Derner - UFSC



Este trabalho é dedicado à minha família que está sempre presente em minha vida e ao meu lado: a minha mãe Sandra, ao meu pai Nicolau, ao meu irmão Adonai, e ao meu marido Fabiano.



## **AGRADECIMENTOS**

A minha família que está sempre ao meu lado, me apoiando, brigando quando necessário, e me escutando falar dos camarões dia após dia.

Ao meu orientador Felipe pela oportunidade de fazer o mestrado, por ser um orientador e amigo tão presente e paciente.

A Professora Dra. Débora pela amizade, dicas e ensinamentos sobre a nutrição dos organismos aquáticos.

Ao professor Walter pelo apoio na realização do experimento.

Ao Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas, principalmente ao Allan, Maria Fernanda, Jefferson e Janice, pela ajuda no preparo das rações e análises das mesmas.

Ao amigo Lula (Luiz Eduardo) e a Renatinha pela ajuda e indicações do caminho certo, durante a formulação das rações. A Mari, Roseane, Guilherme, e Ju, pela ajuda, quer seja no povoamento, nas biometrias ou na despesca.

Um agradecimento especial a amiga Fernanda, por sempre ajudar e ter disposição a isso e pela amizade; a Tamiris, Marysol e Norha, pelas análises, ajuda e amizade; e ao amigo e companheiro de tantas risadas e furadas, Delano. Obrigada querido pela amizade, apoio, ajuda e carinho com todos.

Ao Carlos Miranda por solucionar vários imprevistos elétricos e hidráulicos durante o experimento. Ao Ilson, David e Diego por ajudar no povoamento, nas biometrias e despesca; pela amizade e por estarem por perto sempre que necessário. Déia e Paulinho por manter os locais de trabalho limpos e sua amizade.

Agradeço a empresa Alltech pelo apoio e confiança para a realização desse experimento, em especial à Mariana Midori Nagata.

E agradeço a todas as outras pessoas que de alguma ou outra maneira contribuíram para este trabalho, e que eu posso tê-las esquecido de citar.





“Nunca ande pelo caminho traçado, pois  
ele conduz somente até onde os outros já foram.”

Alexander Graham Bell



## RESUMO

Foi avaliado o uso da farinha da microalga *Schizochytrium limacinum* em cinco níveis de substituição (0, 25, 50, 75, 100%) ao óleo de peixe na dieta de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*). Foi realizado o cultivo em sistema de água clara, na densidade de 60 camarões/m<sup>3</sup> (peso inicial de 3,77 ± 0,04g) e com quatro alimentações diárias. Após 46 dias, apesar da baixa diferença entre o peso final dos animais entre os tratamentos (0,61g), foi observado um aumento no peso final dos animais com a substituição do óleo de peixe pela farinha da microalga até 50 %, com posterior queda até 100 % de substituição. Para a conversão alimentar, houve uma pouca diminuição nos animais com a substituição até 50 %, com posterior aumento até 100 %. Contudo, o peso final e a conversão alimentar dos animais alimentados com a dieta com 100 % de substituição foram praticamente idênticos ao controle. A análise de lipídeos na carne dos camarões demonstra um aumento no DHA com o aumento da inclusão da farinha de microalgas na dieta. A análise dos parâmetros imunes não teve diferença estatística entre os tratamentos, mesmo com o 100% de substituição do óleo de peixe. Com isso, conclui-se que a substituição parcial do óleo de peixe pela farinha da microalga resulta em melhora nos índices zootécnicos dos camarões e a substituição total do óleo de peixe por ela não prejudica estes parâmetros. Adicionalmente, a inclusão da farinha de microalgas na dieta incrementa o teor de DHA na carne dos camarões.

**Palavras chaves:** Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, n-3, DHA, nutrição.



## **ABSTRACT**

This study evaluated the use of microalgae meal (*Schizochytrium limacinum*) in replacement of fish oil at five levels (0, 25, 50, 75, 100 %) for marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The shrimp were fattening in a clear-water system, at a density of 60 shrimp/m<sup>3</sup> (initial weight of 3.77 ± 0.04g) with four times daily. After 46 days, despite a little difference in the final weights of the animals between the treatments (0.61g), there was an increase in the final weight of the animals fed with a substitution of up to 50 % of fish oil by the microalgae meal, which then dropped off with substitutions up to 100 %. There was an improvement in feed conversion in the animals fed with substitutions up to 50 %, and then came down to 100 %. The final weight and the feed conversion of the animals fed with the diet with 100 % substitution were practically identical to the control. The analysis of lipids in the shrimp meat demonstrated an increase in DHA with the increase of the inclusion of microalgae meal in the diet. The analysis of immune parameters there was no statistical difference between treatments, even with 100% substitution of fish oil. It is concluded that the partial substitution of the fish oil by the microalgae meal resulted in improved performance levels of the shrimp and the total substitution of the fish oil without negative effects in these parameters. In addition, the inclusion of the microalgae meal raised the level of DHA in the shrimp meat.

**Keywords:** Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, n-3, DHA, nutrition.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Dessaturação e alongação dos ácidos graxos (Fonte: adaptado de NRC, 2011). .....	26
--	----





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplo da nomenclatura e abreviação de ácidos graxos (Fonte: adaptado de FRACALOSSI; CYRINO, 2013). .....	25
Tabela 2: Formulação das dietas experimentais e composição centesimal para o camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> contendo diferentes níveis de substituição de óleo de peixe pela farinha de <i>Schizochytrium limacinum</i> . .....	38
Tabela 3: Resumo das informações nutricionais do óleo de fígado de bacalhau utilizado e composição da farinha de <i>Schizochytrium limacinum</i> (dados fornecidos pelo fabricante), detalhando seus ácidos graxos mais representativos. ....	39
Tabela 4: Formulação das dietas experimentais para o camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> detalhando seus principais ácidos graxos e soma n-3, n-6 nos diferentes níveis de substituição de óleo de peixe pela farinha de <i>Schizochytrium limacinum</i> . ....	40
Tabela 5: Parâmetros zootécnicos de camarões ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) alimentados por 46 dias com dietas com substituição do óleo de peixe por <i>Schizochytrium limacinum</i> em água clara. ....	45
Tabela 6: Análise de lipídeos e ácidos graxos no músculo do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados por 46 dias com dietas contendo diferentes níveis de substituição do óleo de peixe pela farinha de <i>Schizochytrium limacinum</i> . ....	46
Tabela 7: Análises imunológicas realizadas no camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados por 46 dias com dietas contendo diferentes níveis de substituição do óleo de peixe pela farinha de <i>Schizochytrium limacinum</i> . ....	47



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
1.1	Farinha e Óleo de Peixe.....	21
1.2	Lipídeos e os Ácidos Graxos.....	23
1.3	Ácidos Graxos: n-3 e n-6 na Saúde Humana .....	27
1.4	Microalgas .....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	31
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo Geral .....	33
3.2	Objetivos Específicos .....	33
4	ARTIGO CIENTÍFICO: Farinha de microalga ( <i>Schizochytrium limacinum</i> ) em substituição ao óleo de peixe, em dietas práticas para o camarão-branco-do-Pacífico .....	35
4.1	Introdução .....	35
4.2	Material e métodos .....	37
4.2.1	Material biológico .....	37
4.2.2	Dietas experimentais .....	37
4.2.3	Análise das dietas .....	41
4.2.4	Delineamento e condições experimentais .....	41
4.2.5	Parâmetros zootécnicos .....	42
4.2.6	Análise de lipídeos e n-3 e n-6 .....	42
4.2.7	Análise imunológica.....	43
4.2.8	Análise histológica .....	43
4.2.9	Análise estatística .....	44
4.3	Resultados.....	44
4.3.1	Parâmetros zootécnicos .....	44
4.3.2	Análise de lipídeos e n-3 e n-6.....	45
4.3.3	Análise imunológica.....	46
4.3.4	Análise histológica .....	47
4.4	Discussão .....	47
4.5	Conclusão .....	49
4.6	Agradecimentos.....	49
4.7	Referências .....	50
5	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....	53
	Anexo I:.....	59
	Anexo II: .....	60



## 1 INTRODUÇÃO

A produção de pescado mundial tem crescido de maneira constante nas últimas cinco décadas, bem como o aumento per capita do consumo de peixes. Consumo esse que tinha uma média de 9,9 kg na década de 60 para 19,2 kg em 2012. Isso provavelmente devido ao aumento na renda das famílias, ao crescimento populacional, e a urbanização (FAO, 2014). Adicionalmente, pela busca de alimentos mais saudáveis e de qualidade, os organismos aquáticos têm a procura aumentada e, com a pesca estagnada, a aquicultura é um setor que teve crescimento acelerado nos últimos anos (FAO, 2002; FAO, 2014).

A aquicultura é uma importante fonte de oferta de pescado para a segurança alimentar mundial, contribuindo com mais de 15 % das fontes de proteína animal (FAO, 2002; FAO, 2014). Em 2012, a aquicultura atingiu o recorde histórico de 90,4 milhões de toneladas produzidas, representando mais da metade do pescado consumido no mundo (FAO, 2014). O cultivo de camarões representa um importante ramo dentro da aquicultura, contribuindo com 55 % do total da produção mundial de camarões (FAO, 2012).

Dentre as 59 espécies de crustáceos registradas nas estatísticas da FAO, destaca-se o *Litopenaeus vannamei*, camarão marinho conhecido como o camarão branco do Pacífico. Sendo a principal espécie cultivada mundialmente e no Brasil. Em 2012, foi responsável por aproximadamente 72 % da produção mundial de camarões (FAO, 2012; FAO, 2014).

### 1.1 Farinha e Óleo de Peixe

Para que haja continuidade no crescimento da aquicultura, espera-se que o fornecimento de insumos para a produção de ração também cresça para atender a essa demanda. Entretanto, o ponto mais crítico da criação de peixes e camarões marinhos está justamente na dependência da pesca extrativista, que fornece os peixes para a obtenção da farinha e do óleo de peixe utilizados na fabricação de ração (AMAYA; DAVIS; ROUSE, 2007; TACON; METIAN, 2008; OLSEN; HASAN, 2012).

Comparada com outras atividades zootécnicas, a aquicultura é a que mais demanda farinha de peixe no mundo (TACON et al., 2002; NUNES et al., 2011), sendo que o segundo maior grupo de espécies aquáticas a usar esse insumo é a carcinicultura (TACON; METIAN, 2008).

Em 2010, a aquicultura utilizou 71 % do óleo de peixe produzido, sendo que apenas 26 % foi para consumo humano. Em 2012, 21,7 milhões de toneladas de peixes foram destinados a uso não alimentar, sendo que 75 % desse valor foram utilizados para fabricação de farinha e óleo de peixe. Conforme a FAO (2014), há uma tendência clara à diminuição do uso do óleo e farinha de peixe enquanto seus preços internacionais aumentam. Num futuro próximo, esses insumos serão utilizados apenas estrategicamente, em baixos níveis e fases específicas de desenvolvimento (FAO, 2014).

O óleo de peixe tem sua produção em declínio, principalmente por quotas mais rigorosas sobre as matérias-primas. Há um aumento na demanda do óleo, e conseqüente aumento no preço. Isso por sua importante participação na nutrição de espécies aquáticas, e já sendo utilizado como suplemento nutricional humano, fator que tem aumentado e continua a crescer (FAO, 2014).

Estima-se que, em 2022 o óleo de peixe tenha seu preço aumentado em 23 % num cenário otimista, e que a aquicultura cresça apenas 2,5 % ao ano (2013 - 2022), devido à escassez de água doce, menos áreas disponíveis para os cultivos e os altos custos de seus principais insumos: a farinha e o óleo de peixe (FAO, 2014).

Farinha e óleo de peixe são as principais fontes de proteínas e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, respectivamente, utilizados nas dietas das espécies aquícolas (AMAYA; DAVIS; ROUSE, 2007; NRC 1993, 2011), principalmente de camarões peneídeos, que têm uma capacidade limitada para sintetizar ácidos graxos insaturados de cadeia longa (KANAZAWA et al., 1979; GLENCROSS; SMITH, 2001).

Embora já se substitua com sucesso a farinha de peixe por fontes de origem vegetal, como o farelo de soja e concentrado proteico de soja, essas formulações são totalmente dependentes do uso de óleo de peixe, visto que há um balanço de seu uso em relação à farinha de peixe (menor a quantidade de um, maior a quantidade do outro), sem qualquer efeito deletério no crescimento dos camarões (AMAYA; DAVIS; ROUSE, 2007; SÁ et al., 2013).

Disponibilizar os óleos marinhos nas dietas é a fonte mais barata e confiável de ácidos graxos aos organismos cultivados. Entretanto, o aumento da procura por peixes para o consumo humano causa uma concorrência com seu uso para a alimentação animal. Isto que poderá vir a inviabilizar economicamente a produção de várias espécies aquáticas caso a fonte proteica e de ácidos graxos das rações não seja substituída, ou que pelo menos, ocorra à diminuição da dependência da farinha e

óleo de peixe (TACON; METIAN, 2008; OLSEN; HASAN, 2012; SÁ et al., 2013).

Assim, é importante o desenvolvimento de uma nova opção de matéria-prima para a substituição do óleo de peixe, diversificando e até mesmo substituindo a matriz das rações práticas de camarões (TURCHINI et al., 2009).

## 1.2 Lipídeos e os Ácidos Graxos

Os alimentos fornecemos três grupos de macronutrientes essenciais, proteínas, carboidratos e lipídeos. Esses últimos são mais conhecidos por serem os óleos e gorduras, caracterizados por sua insolubilidade na água, sendo seu metabolismo muito influenciado pela dieta (NRC, 2011; FRACALOSSI; CYRINO, 2013, UFRGS, 2015).

Os lipídeos servem como fonte de energia, são responsáveis pela manutenção da estrutura, permeabilidade e estabilidade de membranas celulares em peixes; são transportadores de outros nutrientes (vitaminas lipossolúveis); sendo também precursores de hormônios e outras moléculas bioativas. Estes são muito abundantes em organismos planctônicos, nos óleos e gorduras de peixes marinhos (KUBITZA, 1999; SUÁREZ et al., 2002; FRACALOSSI; CYRINO, 2013; UFRGS, 2015).

Existem diferentes classes de lipídeos, por exemplo, os fosfolipídios são lipídeos que possuem fósforo em sua estrutura química, têm sua forma mais comum os fosfoglicerídeos, caracterizados por um grupo hidrofílico unido a cadeias de ácidos carboxílicos, tornando-se importantes componentes das membranas celulares, os quais, somados as proteínas, são os principais constituintes orgânicos dos tecidos (KUBITZA, 1999; SUÁREZ et al., 2002; FRACALOSSI; CYRINO, 2013; UFRGS, 2015). Os esteróis são lipídeos estruturais, presentes nas membranas celulares, também são precursores de várias moléculas que possuem atividade biológica específica, como os sais biliares; tendo como seu principal representante o colesterol. Os ésteres de cera são uma classe de lipídeos abundante no plâncton marinho. Havendo ainda outras classes de lipídeos presentes no meio aquático, como os hidrocarbonetos e os pigmentos (NRC, 2011; FRACALOSSI; CYRINO, 2013).

As gorduras são classificadas de acordo com sua quantidade de ligações (grau de insaturação) presente em sua estrutura. Os ácidos graxos saturados são aqueles que não contêm ligação dupla em sua estrutura; os monoinsaturados (MUFA, do inglês *monounsaturated fatty*

*acid*), os que contêm uma ligação dupla, e; os poli-insaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acid*), os que contêm duas ou mais insaturações (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015; NRC, 2011; FRACALOSSO; CYRINO, 2013; UFRGS, 2015).

Quanto à nomenclatura, o número que aparece ao lado do ácido graxo representa seu número de carbonos (Tabela 1), enquanto que o número após dois pontos representa a quantidade de ligações duplas que esse ácido graxo possui (16:0 ácido graxo palmítico –16 carbonos e 0 ligação dupla). Os ácidos graxos insaturados têm sua primeira dupla ligação indicada em sua nomenclatura, por exemplo, o n-3 e n-6, que indicam que a primeira insaturação encontra-se no carbono de número 3 e 6 da cadeia, contando a partir do grupo metílico final da molécula, respectivamente. Sendo comumente falados e representados como “ômeegas”, o  $\omega$  -3 e  $\omega$  -6. Por exemplo, o ácido graxo docosahexaenóico, DHA: 22:6 n-3, significa que em sua estrutura ele tem 22 carbonos com 6 ligações duplas, sendo a primeira após o carbono 3 (SUÁREZ et al., 2002; MARTIN et al., 2006; NRC, 2011; FRACALOSSO; CYRINO, 2013; ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015).

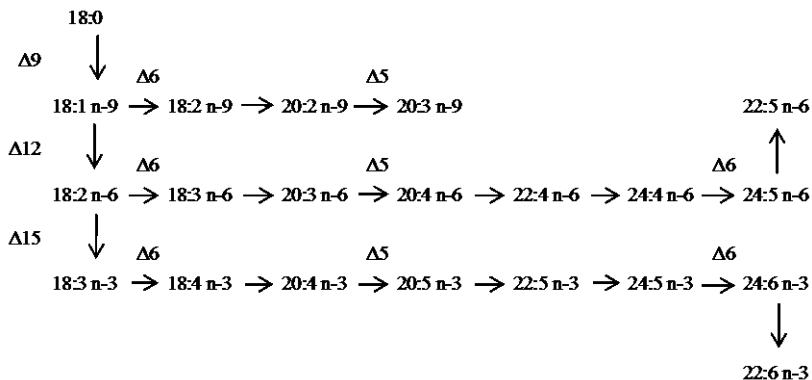


**Tabela 1:** Exemplo da nomenclatura e abreviação de ácidos graxos (Fonte: adaptado de FRACALOSSI; CYRINO, 2013).

Ácidos Graxos Saturados (SFA)	
Acético	2:0
Butírico	4:0
Capróico	6:0
Caprílico	8:0
Cáprico	10:0
Láurico	12:0
Mirístico	14:0
Palmítico	16:0
Esteárico	18:0
Araquídico	20:0
Ácidos Graxos Monoinsaturados (MUFA)	
Palmitoleico	16:1 n-7
Oléico	18:1 n-9
Cis-vaccênico	18:1 n-7
Erúcico	22:1 n-9
Nervônico	24:1 n-9
Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFA)	
Linoleico	18:2 n-6
$\alpha$ -Linolênico	18:3 n-3
Estearidônico	18:4 n-3
Araquidônico	20:4 n-6
Eicosapentaenóico	20:5 n-3
Docosahexaenóico	22:6 n-3

O número de ligações duplas e sua posição determinam as propriedades físicas e químicas e funções diferentes entre os ácidos graxos, bem como a sua importância, atuando em conjunto para regular os processos fisiológicos. Os ácidos graxos podem ser alongados e dessaturados por certo sistema enzimático para produzirem outros ácidos graxos (Figura1), sendo que apenas as plantas e microorganismos alongam e dessaturam por possuírem as enzimas  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$ ; enzimas que estão ausentes nos animais (SUÁREZ et al., 2002; NRC, 2011; ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015).

**Figura 1:** Dessaturação e alongação dos ácidos graxos (Fonte: adaptado de NRC, 2011).



Ácidos graxos dividem-se em não essenciais e essenciais. Os não essenciais são sintetizados pelo próprio organismo a partir de outro ácido graxo precursor, já os essenciais são aqueles que não são sintetizados pelo organismo, dependendo, assim, que sejam obtidos através de sua alimentação. Mas a bibliografia sobre lipídeos, bem como, a exigência nutricional deste grupo para peixes e demais animais, em geral, são menos conhecidas do que as exigências para qualquer outro tipo de nutrientes (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015; FRACALOSSI; CYRINO, 2013).

A exigência a lipídeos é apresentada como a exigência para cada ácido graxo, fosfolipídios, carotenóides e esteróis. Para *L. vannamei* algumas exigências são conhecidas e, para as que não são, utiliza-se a espécie *Penaeus monodon* como referência (GONZALES-FÉLIZ et al., 2002; NRC, 2011).

Há trabalhos que mostram que a deficiência em ácidos graxos pode causar atraso no crescimento, redução na eficiência alimentar, redução do desempenho reprodutivo e até mortalidade; entre outros. Entretanto, a alta taxa de inclusão na dieta pode causar o retardo no crescimento (NRC, 2011).

Diversos estudos comprovam que uma equilibrada concentração entre os ácidos graxos disponibilizados na dieta promove o crescimento dos camarões cultivados (GLENCROSS E SMITH, 1999; GONG et al., 2000). Glencross e Smith (1999) observaram que a manutenção de um equilíbrio entre os ácidos graxos linoléico e linolênico podem aumentar o crescimento dos camarões. Em 2001, os mesmos autores constataram que para *Penaeus monodon*, a combinação dos ácidos graxos EPA e

DHA promoveram maior crescimento dos animais. O mesmo foi observado para o *Litopenaeus vannamei*, onde autores demonstraram que o crescimento e ganho em peso é incrementado com a adição de DHA, LC-PUFA, ácido graxo linoléico e linolênico na dieta (GONZA'LES-FE'LIX et al., 2002; GONZA'LES-FE'LIX et al., 2003).

### 1.3 Ácidos Graxos: n-3 e n-6 na Saúde Humana

Os ácidos graxos n-3 e n-6 são classificados como poli-insaturados, de cadeia longa, tendo como integrantes, por exemplo, o ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA), que tem importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e retina humanos (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015; MARTIN et al., 2006). Os ácidos graxos linolênico e linoléico, são necessários para que se consiga manter em condições normais as membranas celulares, as funções do cérebro e a transmissão de impulsos nervosos (MARTIN et al., 2006).

A razão entre os ácidos graxos n-3 e n-6 é também estudada, e pesquisas demonstram que a ingestão de uma baixa relação n-3/n-6 pode acarretar na diminuição da produção do EPA e DHA, resultando em condições que contribuem para o desenvolvimento de doenças alérgicas, inflamatórias e cardiovasculares (MARTIN et al., 2006). Já o consumo exclusivo de n-6 pode resultar na produção excessiva de eicosanóides, que em um organismo sadio é observado em extremamente baixas quantidades, sendo observado em altas quantidades em tecidos alterados e em condições patológicas, como inflamações e lesões vasculares (SUÁREZ et al., 2002).

Os ácidos graxos n-6 estão muito presentes em cereais e leguminosas, bem como, nos óleos vegetais. Já os n-3 estão presentes em peixes e camarões, sendo alvo de atenção e maior consumo por humanos, com o aumento da preocupação pela busca por uma vida mais saudável e consumo de alimentos mais saudáveis (MARTIN et al., 2006; DOMINGO et al., 2007).

Vários são os estudos que demonstram os benefícios de se consumir ácidos graxos n-3 para a saúde humana. Estes causam efeito protetor à saúde, incluindo a redução de riscos de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e diabetes, considerando-se os peixes e crustáceos “alimentos funcionais” na prevenção de certas doenças – devido a seu conteúdo em EPA e DHA (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015; VICENTAINER, 2000; SUÁREZ et al., 2002; ANJO, 2004; DOMINGO, 2007; SMITH; GUENTZEL, 2010).

Entre os benefícios estudados do EPA e do DHA à saúde humana estão à prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (VISENTAINER et al., 2000; SUÁREZ et al., 2002; ANJO, 2004). Em humanos há a possibilidade da conversão do ácido linoléico em longas cadeias por dessaturação e alongação dos ácidos graxos, e o  $\alpha$ -linolênico pode ser convertido em EPA e DHA. Entretanto, a taxa de conversão é baixa, e diminui ainda mais à medida que o ácido linoléico aumenta, sendo extremamente importante a ingestão de fontes de ácidos graxos n-3 na dieta (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015; SUÁREZ et al., 2002; MARTIN et al., 2006).

#### **1.4 Microalgas**

As algas são um diverso grupo de micro-organismos, tendo mais de 800.000 espécies diferentes, podendo ter um alto teor de proteínas e um perfil de aminoácidos capaz de proporcionar aminoácidos essenciais a diferentes animais (MADIGAN et al., 2004; LOURENÇO, 2006). Acredita-se que existam mais de 300.000 espécies de microalgas, que servem de base na cadeia trófica do ambiente aquático, sendo responsáveis por mais da metade da produção primária neste ambiente (RICHIMOND, 2004; LOURENÇO, 2006; RAVEN et al., 2007; LEE, 2008; HARWOOD, GUSCHINA, 2009).

O perfil de ácidos graxos nas microalgas varia amplamente entre os principais grupos taxonômicos, dependendo da presença ou ausência de diferentes e específicas enzimas. Mesmo dentro dos grupos taxonômicos, a composição varia conforme fatores ambientais, como a disponibilidade de nutrientes, temperatura, salinidade, luz e oxigênio (LOURENÇO, 2006; ZHU et al., 2007; ROMERO et al., 2008; FRACALOSSO, CYRINO, 2013). Mas o que tem chamado a atenção para estes micro-organismos, sendo objeto de estudo de vários trabalhos, é a presença de alongases e dessaturases nas microalgas, o que gera a produção de ácidos graxos de cadeia longa (PUFA) (HARWOOD, GUSCHINA, 2009).

As algas unicelulares em crescimento apresentam comumente 20 % a 50 % do seu peso seco na forma de lipídeos, sendo que sob certas condições as microalgas podem acumular até 90%. As diatomáceas tendem a ser ricas em EPA, as dinoflageladas, em DHA e as rodófitas, em araquidônico e HUFA n-3. Entre as algas de água doce e salgada também se observa uma variação, onde as de água doce acumulam mais ácido graxo linoléico e linolênico, enquanto que as de água salgada se

observa mais EPA e DHA (LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007; LEE et al., 2008; MATA, MARTINS, CAETANO, 2010; FRACALOSSI, CYRINO, 2013).

Somente nos últimos 50 anos é que a exploração comercial de algas unicelulares começou a ocorrer, inicialmente com foco na sua massa algal como fonte proteica. Recentemente, o foco foi direcionado à produção de lipídeos, especialmente os poli-insaturados. A produção é usada para biocombustível, como suplementos nutricionais humanos e na aquicultura. Mas também são utilizadas na indústria de cosméticos e farmacêutica, no tratamento de águas residuais, e no sequestro de carbono (SHEEHAN et al., 1998; RICHIMOND, 2004; DERNER et al., 2006; LOURENÇO, 2006; CHIST, 2007; JACOB-LOPEZ et al., 2008; HARWOOD, GUSCHINA, 2009; ABDEL-RAOUF et al., 2012).

Dentre as microalgas, existe a *Schizochytrium limacinum*, que apresenta bom perfil de ácidos graxos, com 27,20 % do ácido graxo DHA (do tipo n-3), 54,69 % de ácido palmítico e teor de proteína bruta de 19,22 %. Caracteriza-se por uma coloração marrom, com nível de mistura para camarões indicado entre 0,5 kg a 10kg/t (ALLTECH, 2014).

Há estudos com a truta arco-íris onde a farinha de *S. limacinum* se mostrou como uma excelente fonte do ácido graxo DHA e melhorou o ganho em peso no nível de 15 % de inclusão na dieta (FILER, 2013). Adicionalmente, diferente do óleo vegetal, o uso de *S. limacinum* aumentou o teor de DHA nos filés de truta (CUMMINS; FILER, 2014).

A segunda parte desta dissertação refere-se a um artigo original, formatado segundo normas da revista Plos One (A1, 3,534).



## 2 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da aquicultura houve o aumento da demanda por farinha e óleo de peixe, pois estas são as principais fontes proteicas e de ácidos graxos de cadeia longa utilizados na fabricação das rações dos organismos aquáticos cultivados. Atualmente, 25 % da produção de peixe do mundo é destinada ao processamento para farinha e óleo de peixe (FAO, 2006), sendo que, em 2012, 21,7 milhões de toneladas foram destinados para usos não alimentares, como farinha e óleo de peixe (FAO, 2014).

Consequentemente, o valor e produção de farinha e óleo de peixe oscilam de acordo com a disponibilidade da matéria-prima, tornando-se necessário buscar fontes alternativas para reduzir seu uso em rações formuladas para aquicultura, substituindo em parte ou totalmente a farinha e óleo de peixe.

A substituição da farinha de peixe e óleo de peixe por ingredientes de origem vegetal ou subprodutos de origem animais já foi demonstrada. Contudo, a farinha e óleo de peixe são as principais fontes de ácidos graxos insaturados de cadeia longa nas dietas, das séries n-3 e n-6. Uma vez que os animais aquáticos têm capacidade limitada na síntese destes ácidos graxos, ao se substituir estes insumos por fontes vegetais e subprodutos animais (pobres em n-3 e n-6), o animal produzido tende também a ter baixos teores de ácidos graxos instaurados na carne. Assim, acaba-se em uma situação conflitante onde, ao mesmo tempo em que se necessita de ingredientes alternativos à farinha e óleo de peixe, precisa-se também produzir alimentos com ácido graxos de cadeia longa, tão importantes para a saúde humana e que são a maior motivação para o aumento no consumo de pescados pela população.

Com isso, é importante o desenvolvimento de novas opções de matéria-prima para a substituição do óleo de peixe, mas que sejam ricas em n-3. Neste contexto, destacam-se as fontes derivadas de microalgas, pois contêm elevadas quantidades de ácidos graxos do tipo n-3. Dentre as algas, vem ganhando destaque a microalga *Schizochytrium limacinum*. A farinha dessa microalga possui bom perfil de ácidos graxos, com 27,20 % do ácido graxo DHA (do tipo n-3) e teor de proteína bruta de 19,22 %.





### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Contribuir para o desenvolvimento da carcinicultura marinha, a partir da avaliação do potencial uso da farinha da microalga *Schizochytrium limacinum* como ingrediente nas rações para camarão marinho.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito de cinco níveis de substituição (0, 25, 50, 75, 100 %) do óleo de peixe pela farinha da microalga *Schizochytrium limacinum* em rações para o camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*), cultivados em sistema de água clara, com relação a:
  - Parâmetros zootécnicos de produção: crescimento, sobrevivência, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e produtividade;
  - Composição centesimal da carne dos camarões produzidos;
  - Análise histológica e imunológica dos animais.



## 4 ARTIGO CIENTÍFICO: Farinha de microalga (*Schizochytrium limacinum*) em substituição ao óleo de peixe, em dietas práticas para o camarão-branco-do-Pacífico

### RESUMO

Foi avaliado o uso da farinha da microalga *Schizochytrium limacinum* em cinco níveis de substituição (0, 25, 50, 75, 100%) ao óleo de peixe na dieta de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*). Foi realizado o cultivo em sistema de água clara, na densidade de 60 camarões/m<sup>3</sup> (peso inicial de  $3,77 \pm 0,04$ g) e com quatro alimentações diárias. Após 46 dias, apesar da baixa diferença entre o peso final dos animais entre os tratamentos (0,61g), foi observado um aumento no peso final dos animais com a substituição do óleo de peixe pela farinha da microalga até 50 %, com posterior queda até 100 % de substituição. Para a conversão alimentar, houve uma pouca diminuição nos animais com a substituição até 50 %, com posterior aumento até 100 %. Contudo, o peso final e a conversão alimentar dos animais alimentados com a dieta com 100 % de substituição foram praticamente idênticos ao controle. A análise de lipídeos na carne dos camarões demonstra um aumento no DHA com o aumento da inclusão da farinha de microalgas na dieta. A análise dos parâmetros imunes não teve diferença estatística entre os tratamentos, mesmo com o 100% de substituição do óleo de peixe. Com isso, conclui-se que a substituição parcial do óleo de peixe pela farinha da microalga resulta em melhora nos índices zootécnicos dos camarões e a substituição total do óleo de peixe por ela não prejudica estes parâmetros. Adicionalmente, a inclusão da farinha de microalgas na dieta incrementa o teor de DHA na carne dos camarões.

**Palavras chaves:** Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, n-3, DHA, saúde, nutrição.

### 4.1 Introdução

A produção de pescado mundial tem crescido de maneira constante nas últimas cinco décadas, incentivada pelo aumento per capita do consumo de peixes [1]. A aquicultura é um setor que teve crescimento acelerado nos últimos anos, sendo uma importante fonte de oferta de pescado para a segurança alimentar mundial. Em 2012 a aquicultura atingiu o recorde histórico de 90,4 milhões de toneladas

produzidas, superando pela primeira vez a produção total de pescados de captura [1].

Grande parte dos organismos aquáticos cultivados na aquicultura é dependente do uso de rações na alimentação (como por exemplo, peixes e camarões), sendo que para que haja a continuidade do crescimento da aquicultura, é necessário o aumento do fornecimento de insumos para a produção das rações. Entretanto, o ponto crítico da criação de peixes e camarões marinhos está justamente na dependência da pesca extrativista para o fornecimento de peixes para a farinha e óleo de peixe utilizados na fabricação de ração [2,3]. Comparada com outras atividades zootécnicas, a aquicultura é a que apresenta maior demanda mundial por farinha e óleo de peixe [4], e o segundo maior grupo de espécies aquáticas a usar esse insumo são os camarões (carcinicultura) [2]. Em 2010 a aquicultura utilizou 71 % do óleo de peixe produzido sendo que apenas 26 % foi para consumo humano. A maior parte destes insumos é proveniente da pesca de peixes pelágicos [1].

Há uma tendência clara na diminuição do uso do óleo e farinha de peixe em rações animais, seja por questões éticas e ambientais ou pelo aumento nos preços internacionais destes insumos. Acredita-se que em um futuro próximo, esses insumos serão utilizados apenas estrategicamente, em baixos níveis e em fases específicas de desenvolvimento [1]. Assim, é necessário o desenvolvimento de ingredientes alternativos a farinha e óleo de peixe para uso em rações para aquicultura.

A substituição da farinha de peixe e óleo de peixe por ingredientes de origem vegetal ou subprodutos de origem animais já foi demonstrada [5,6,7]. Contudo, a farinha e óleo de peixe são as principais fontes de ácidos graxos insaturados de cadeia longa das séries n-3 e n-6 nas dietas [8]. Uma vez que os animais aquáticos têm capacidade limitada na síntese destes ácidos graxos, ao se substituir estes insumos por fontes vegetais e subprodutos animais (pobres em n-3 e n-6), o animal produzido tende também a ter baixos teores de ácidos graxos instaurados na carne. Assim, acaba-se em uma situação conflitante onde, ao mesmo tempo em que se necessita de ingredientes alternativos a farinha e óleo de peixe, precisa-se produzir alimentos com ácido graxos de cadeia longa, tão importantes para a saúde humana e que são a maior motivação para o aumento no consumo de pescados pela população.

Com isso, é importante o desenvolvimento de uma nova opção de matéria-prima para a substituição do óleo de peixe, mas que sejam ricas em n-3. Neste contexto, destaca-se as fontes derivadas de microalgas, pois contêm elevadas quantidades de ácidos graxos do tipo

n-3 [9]. Dentre as algas, vem ganhando destaque a microalga *Schizochytrium limacinum*. A farinha dessa microalga possui bom perfil de ácidos graxos, com 27,20 % do ácido graxo DHA (do tipo n-3) e teor de proteína bruta de 19,22 %.

Neste trabalho foi avaliado o uso da farinha da microalga *Schizochytrium limacinum* em cinco níveis de substituição (0, 25, 50, 75, 100 %) ao óleo de peixe na dieta de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*), sobre os parâmetros zootécnicos e qualidade nutricional da carne dos camarões produzidos.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Material biológico**

A pesquisa foi desenvolvida com camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei*, livre de patógenos específicos (SPF – *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal, com peso médio de  $3,77 \pm 0,04$ g.

### **4.2.2 Dietas experimentais**

Foram formuladas cinco dietas experimentais (Tabela 2), com 36 % de proteína bruta e 7 % de extrato etéreo, com níveis de substituição de um óleo de peixe de alta qualidade (óleo de fígado de bacalhau – informações nutricionais na Tabela 3) pela farinha da microalga *Schizochytrium limacinum*, marca comercial All G Rich, Alltech (Tabela 3), em 0 % (controle), 25 %, 50 %, 75 % e 100 %. Sua fabricação e análise da composição centesimal, que pode ser observada na Tabela 2, foram feitas após estarem prontas no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), pertencente ao Departamento de Aquicultura da UFSC, seguindo procedimento padrão (AOAC, 1999).

**Tabela 2:** Formulação das dietas experimentais e composição centesimal para o camarão *Litopenaeus vannamei* contendo diferentes níveis de substituição de óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum*.

Ingredientes	Substituição				
	0	25	50	75	100
Farelo de soja	33,90	34,00	31,40	29,40	25,82
Farinha de trigo	15,00	15,00	15,20	15,00	15,00
Farinha de vísceras de aves	14,10	14,10	14,80	15,80	16,50
Concentrado proteico de soja	13,00	12,30	13,00	12,97	14,40
Lecitina de soja	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20
Óleo de soja	0,60	0,50	0,49	0,62	0,80
Óleo de fígado de bacalhau	4,00	3,00	2,00	1,00	0,00
Farinha de <i>Schizochytrium limacinum</i>	0,00	2,00	4,00	6,00	8,00
Premix vitamínico	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Premix mineral	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64
Fosfato monocálcio	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Carboximetilcelulose	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamina C	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Sulfato de magnésio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Cloreto de sódio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Caulim	8,67	8,37	8,38	8,48	8,75
Composição centesimal					
Proteína total (% da matéria seca)	36,90	36,84	36,86	36,28	37,40
Energia bruta (kcal)	3,78	3,80	3,77	3,95	3,86
Umidade	11,56	11,64	14,00	9,98	12,30
Cinzas	19,59	20,94	19,06	18,82	19,86
Extrato Etéreo	7,23	6,94	7,27	7,75	7,72

**Tabela 3:** Resumo das informações nutricionais do óleo de fígado de bacalhau utilizado e composição da farinha de *Schizochytrium limacinum* (dados fornecidos pelo fabricante), detalhando seus ácidos graxos mais representativos.

<b>Óleo de fígado de bacalhau<sup>1</sup></b>			
Energia bruta	9020 kcal/kg	Vitamina A	300 mg/kg
Extrato etéreo	100%	Vitamina D	1251,25 mg/kg
Colesterol	0,57%	Vitamina E	220 mg/kg
<b>Ácidos graxos (% lipídeos)</b>			
14:0	4,60%	20:1 n-11	10,03%
16:0	13,19%	22:1 n-9	4,36%
18:0	2,72%	18:2 n-6	2,09%
16:1 n-7	9,43%	20:4 n-6	1,27%
18:1 n-7	5,08%	18:3 n-3	0,63%
18:1 n-9	19,57%	20:5 n-3	9,19%
20:1 n-9	5,63%	22:6 n-3	10,15%
20:1	10,42%		
<b>Farinha de <i>Schizochytrium limacinum</i></b>			
Umidade	3,70%	<b>Ácidos graxos</b>	
Gordura bruta	50%	14:0	3,86%
Fibra bruta	0,90%	16:0	54,69%
Carboidratos	24,88%	18:0	1,80%
Proteínas	19,22%	14:1	1,60%
Mineral	3,67%	22:6 n-3	27,20%

<sup>1</sup>Óleo de Fígado de Bacalhau distribuído por Química Delawere (Porto Alegre, Brasil) e produzido por Berg Lipid tech (Aalesund, Noruega).

As dietas foram formuladas com o auxílio do software Optimal Fórmula 2000, com base nas recomendações e exigências nutricionais para o ótimo desempenho da espécie (*L. vannamei*), sendo que para as exigências não identificadas, utilizou-se a espécie *P. monodon* como referência [8]. O cadastro dos ingredientes foi feito com base no laudo de análises e com base em relatórios da empresa fornecedora do insumo, unidos a pesquisa bibliográfica [9,10,11,12,13,14].

Assim, a porcentagem de inclusão dos ingredientes (Tabela 2) foi balanceada para a manutenção da igualdade (ou pelo menos, da mínima variação), entre dietas, da quantidade de proteínas (para que fosse

considerada isonitrogenada), energia (isoenergética), e extrato etéreo. Na formulação da dieta buscou-se balancear os ingredientes para que a quantidade de ácidos graxos do tipo n-6 (poli-insaturados) se mantivessem constantes, apenas aumentando os ácidos graxos do tipo n-3 (Tabela 4), por meio da inclusão da farinha da microalga.

**Tabela 4:** Formulação das dietas experimentais para o camarão *Litopenaeus vannamei* detalhando seus principais ácidos graxos e soma n-3, n-6 nos diferentes níveis de substituição de óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum*.

Formulação de ácidos graxos (% de ácidos graxos totais)	Substituição (%)				
	0	25	50	75	100
<b>Grupos de ácidos graxos</b>					
SFA	1,83	2,81	3,84	4,89	5,95
MUFA	2,89	2,45	2,09	1,76	1,42
PUFA	2,76	3,00	3,35	3,74	4,16
<b>Ácidos graxos</b>					
18:2 n-6	1,96	1,86	1,86	1,90	1,97
18:3 n-3	0,22	0,21	0,20	0,20	0,20
20:2 n-6	0,00	0,01	0,02	0,03	0,03
20:4 n-6	0,05	0,04	0,03	0,01	0,00
20:5 n-3	0,37	0,28	0,20	0,11	0,02
22:6 n-3	0,38	0,83	1,28	1,73	2,18
PUFA n-3	1,08	1,40	1,73	2,07	2,41
PUFA n-6	1,71	1,62	1,64	1,68	1,76
(n-3)/(n-6)	0,63	0,86	1,05	1,23	1,37

<sup>†</sup> Grupos de ácidos graxos, SFA: ácidos graxos saturados, MUFA: ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: ácidos graxos poliinsaturados, LC-PUFA: ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.

Os ingredientes que compuseram as rações foram previamente triturados e peneirados em malha de 600 µm. As dietas tiveram seus ingredientes pesados e separados, sendo misturados a seco, todos os macro ingredientes e depois os micro ingredientes (entre si e depois com os macro). Após a mistura estar pronta, foram acrescentados os óleos e a lecitina de soja. Por último, a umidade foi ajustada para 15 %. Cada dieta foi peletizada (Inbramaq, MX-40) em matriz de 1,5 mm e tamanho



final do pélete em 2 mm. Foram secas em estufa a 36°C por aproximadamente 1 h com a umidade controlada a cada 10 min. Em seguida, as rações foram mantidas congeladas até o momento de cada alimentação, para evitar a oxidação e perda dos ácidos graxos das dietas (Anexo I).

#### **4.2.3 Análise das dietas**

A análise das dietas foi feita pelo Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LabNutri), seguindo metodologia descrita pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 1999). As dietas foram submetidas à análise de matéria seca com secagem a 105°C, cinzas com queima a 550°C, proteína por Kjeldahl ( $N \times 6,25$ ), e extrato etéreo por Soxhlet após hidrólise ácida. A energia bruta das amostras foi feita em bomba calorimétrica adiabática pela empresa de Análises Laboratoriais CBO, Campinas/SP.

#### **4.2.4 Delineamento e condições experimentais**

O experimento consistiu na engorda de camarões em sistema de água clara. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três réplicas, num total de 15 unidades experimentais onde foram testadas as cinco substituições (0, 25, 50, 75, 100 %) do óleo de fígado de bacalhau pela farinha de *Schizochytrium limacinum*.

O cultivo foi realizado dentro de uma sala dotada de sistema de distribuição de água salgada, aeração ( $O_2 > 5 \text{ mg L}^{-1}$ ), termostatos e tomadas para os aquecedores ( $28,6 \pm 0,12^\circ\text{C}$ ). As unidades experimentais foram caracterizadas por serem tanques circulares, de polietileno com fundo plano, com capacidade para 500 litros e área útil de 400 litros (Anexo II).

Todos os tanques foram preenchidos com água marinha oriunda da praia da Barra da Lagoa (Florianópolis, SC, Brasil), com salinidade de  $31,74 \text{ g L}^{-1}$ , alcalinidade  $132,8 \text{ mg L}^{-1}$ , pH 8,00, amônia  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  e nitrito  $0 \text{ mg L}^{-1}$ . Cada unidade experimental foi povoada com 25 camarões de peso médio de  $3,77 \pm 0,04 \text{ g}$ , resultando na densidade inicial de cultivo de  $60 \text{ camarões m}^{-3}$ .

A alimentação inicialmente foi fornecida de acordo com a tabela de Van Wick e Scarpa (1999), onde os animais foram alimentados com o equivalente a 7 % da biomassa e esta quantidade foi ajustada semanalmente de acordo com as biometrias para uma conversão programada estimada de 2:1[15]. Durante a biometria semanal que

ocorreu no período da manhã, todos os animais eram retirados do tanque, contados e pesados; tendo a próxima alimentação ajustada.

As alimentações foram fornecidas quatro vezes ao dia (08h30min; 12h, 14h30min, 17h) em sua totalidade nas bandejas de alimentação com área de 0,03m<sup>2</sup> para posterior checagem do consumo (1,5 h após a oferta do alimento). A renovação de água foi feita uma vez ao dia, no período da tarde, a uma taxa de 80 % do volume total do tanque, com remoção total dos restos de matéria orgânica (fezes, restos de ração e mudas).

Durante o experimento, o pH ( $8,07 \pm 0,21$ ), alcalinidade ( $132 \pm 9,62$ ) e a salinidade ( $32,24 \pm 0,03$ ) permaneceram estáveis, e a amônia ( $<0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), e nitrito ( $<0,14 \text{ mg L}^{-1}$ ) em níveis baixos, dentro dos limites estipulados adequados para camarões marinhos (BOYD; GAUTIER, 2000) [16]. A análise da alcalinidade seguiu método de APHA (2005); a amônia e nitrito o método de Strickland e Parsons (1972). Os parâmetros: oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade foram medidos com multiparâmetro YSI – Professional Plus.

#### 4.2.5 Parâmetros zootécnicos

Semanalmente, os animais eram capturados para a biometria e, ao final dos 46 dias de experimento, a biometria final foi realizada para a obtenção dos parâmetros zootécnicos como o indicado abaixo:

Ganho em Peso Total (g): ganho em peso final – peso inicial

Ganho de Peso Semanal (g/s) = {[peso médio final (g) – peso médio inicial (g)] / dias de cultivo} \* 7

Biomassa Final (kg m<sup>-3</sup>) = biomassa despesada (kg)/ Volume do tanque (m<sup>3</sup>)

Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) \* 100

Conversão Alimentar (CA) = ração consumida (kg)/biomassa de camarão produzida (kg)

#### 4.2.6 Análise de lipídeos e n-3 e n-6

Ao final do experimento foi coletada uma amostra de músculo dos camarões para análise de lipídeos e ácidos graxos, feita pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Campinas/SP. A análise de lipídeos totais foi feita com método baseado em IAL (2005) método 034B; e a análise de ácidos graxos baseado em AOCS (2014), Official Method Ce 1a-13 e

Ce 1h-05, AOAC (2010), Official Method 996.06, Hartman & Lago Lab. Practice (1973), e FSA (2002).

#### **4.2.7 *Análise imunológica***

Ao final do experimento foram coletados três animais de cada réplica (nove animais por tratamento) para análise imunológica. A hemolinfa foi coletada com seringas estéreis de 1mL de agulha 21G resfriadas a 4°C. Uma amostra de 40µL foi fixada em solução de 4 % de formaldeído/MAS (citrato de sódio 27 mm, EDTA 9 mm, glicose 115 mm, NaCl 336 mm, pH 7,0) para que fosse feita a contagem total de hemócitos (THC). O restante da hemolinfa foi deixado coagular a 4°C, posteriormente congelada a 20°C e centrifugada repetidamente a 6.000g por 10 min, para a obtenção do soro, o qual foi armazenado a -20°C para uso nas outras análises imunológicas.

A atividade da fenoloxidase (PO), foi determinada no soro através de espectrofotometria, pela formação do pigmento DOPA-cromo após a oxidação do substrato L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina), por metodologia de Soderhall e Hall (1984). A formação do DOPA-cromo foi monitorada 0, 5, 15 e 20 min após a adição d L-DOPA.

Para o título aglutinante do soro (lectinas), foi utilizado suspensão de eritrócitos de cachorro a 2 %. Amostras de 50µL de soro foram diluídas em TBS-2 (50 mm Tris, 150 mm NaCl, 10 mm CaCl<sub>2</sub>, 5 mm MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) em placas de 96 poços de fundo côncavo. A cada amostra de soro foram adicionados 50 µL da suspensão de eritrócitos e incubadas durante 2h a 25°C em câmara úmida. O controle foi feito substituindo o soro por TBS-2. O valor aglutinante foi definido como o recíproco da última diluição que possua a capacidade de aglutinar os eritrócitos.

#### **4.2.8 *Análise histológica***

Os animais inteiros foram fixados em solução de Davidson por 24h. Após esse período foi feito o corte do intestino médio, que foram lavados e desidratados em séries crescentes de etanol, ao término do processo, sendo infiltradas em historesina (Leica Historesin). Foram feitos cortes de 5µm de espessura, sendo corados com hematoxilina e eosina e observados em microscópio para verificar a integridade das estruturas e sua morfologia interna.

#### 4.2.9 *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada através do programa Statistica 7, por regressão quadrática e os coeficientes avaliados quanto à significância pelo teste t ( $\alpha=0,05$ ).

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 *Parâmetros zootécnicos*

A sobrevivência dos animais não teve diferença estatística, sendo que ficou em 100% nos tratamentos extremos (0% e 100% de substituição), e 96% nos demais tratamentos.

Apesar da pouca diferença entre o peso final dos animais entre os tratamentos (diferença de 0,61g entre os camarões do maior tratamento e o menor – Tabela 5), houve diferença estatística entre eles, sendo observado um aumento no peso final dos animais com a substituição do óleo de peixe pela farinha de *S. limacinum* até 50 %, com posterior queda até 100 % de substituição, sendo que seu ponto máximo foi atingido em 44,74 % de substituição. Contudo, o peso final dos animais alimentados com a dieta com 100 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de microalgas foi praticamente idêntico ao controle.

Seguindo a mesma tendência, foi observada diferença estatística, mas não grande diferença na conversão alimentar dos camarões entre os tratamentos (0,16 entre os camarões do tratamento com maior nível de substituição e o menor – Tabela 5). Contudo, foi observado uma melhora na conversão alimentar dos animais com a substituição do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum* até 50 %, com posterior queda e pior conversão até 100 % de substituição, sendo atingido seu ponto mínimo em 49,3 % de substituição. Todavia, a conversão alimentar dos animais alimentados com a dieta com 100 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum* foi praticamente idêntico ao controle.

**Tabela 5:** Parâmetros zootécnicos de camarões (*Litopenaeus vannamei*) alimentados por 46 dias com dietas com substituição do óleo de peixe por *Schizochytrium limacinum* em água clara.

% de substituição	Peso final (g)	Crescimento semanal (g/semana)	Conversão alimentar	Sobr. (%)
0	14,98±0,63	1,79±0,33	2,08±0,24	100%
25	15,16±0,79	1,79±0,34	2,00±0,27	96%
50	15,43±0,71	1,84±0,37	1,94±0,35	96%
75	15,20±0,24	1,84±0,35	1,98±0,42	96%
100	14,82±0,18	1,81±0,33	2,10±0,61	100%
<b>Efeito quadrático</b>	$y = -0,00019x^2 + 0,017x + 14,94$ R <sup>2</sup> = 0,914	NS	$y = 6E-05x^2 - 0,005x + 2,087$ R <sup>2</sup> = 0,972	NS

NS = não significativo, Sobr. = sobrevivência.

#### 4.3.2 Análise de lipídeos e n-3 e n-6

É possível observar na tabela 6 que a quantidade de lipídeos totais não teve grande variação no músculo dos animais, sendo observado aumento em direção ao tratamento com 50 % de substituição e leve declínio em direção ao tratamento com 100 % de substituição.

A quantidade total de n-3 se manteve praticamente constante, com queda de 0,01g/100g do tratamento controle para o tratamento com 100 % de substituição. Já os ácidos graxos n-6 tiveram um aumento em direção ao tratamento 100 %.

O total de ácidos graxos saturados e poli-insaturados aumentou em direção ao tratamento com 100 % de substituição, enquanto que os monoinsaturados sofreram uma queda.

Observa-se o aumento constante da concentração do ácido graxo palmítico em direção ao 100 % de substituição, visto que a farinha da microalga possui aproximadamente 56 % dele em sua composição.

**Tabela 6:** Análise de lipídeos e ácidos graxos no músculo do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentados por 46 dias com dietas contendo diferentes níveis de substituição do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum*.

Lipídeos e ácidos graxos no músculo do camarão	Substituição (%)				
	0	25	50	75	100
Lipídeo total (g/100g)	0,86 (0,02) <sup>1</sup>	0,89 (0,02) <sup>1</sup>	0,91 (0,03) <sup>1</sup>	0,83 (0,03) <sup>1</sup>	0,87 (0,01) <sup>1</sup>
<b>Grupos de ácidos graxos (g/100g)<sup>2</sup></b>					
SFA	0,25	0,27	0,29	0,27	0,29
MUFA	0,17	0,15	0,16	0,13	0,14
PUFA	0,37	0,39	0,38	0,36	0,38
LC-PUFA n-3	0,22	0,22	0,21	0,20	0,21
LC-PUFA n-6	0,15	0,16	0,16	0,16	0,17
(n-3)/(n-6)	1,47	1,38	1,31	1,25	1,24
N.I.	0,03	0,04	0,05	0,04	0,03
<b>Composição em ácidos graxos (g/100g)</b>					
16:0	0,15	0,17	0,18	0,17	0,19
18:0	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08
18:1 n-9	0,15	0,13	0,15	0,11	0,14
18:2 n-6	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13
18:3 n-3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
20:4 n-6	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
20:5 n-3	0,12	0,11	0,09	0,08	0,08
22:6 n-3	0,09	0,11	0,12	0,12	0,13
Outros	0,06	0,05	0,06	0,05	0,02
N.I.	0,03	0,04	0,05	0,04	0,03

N.I.= não identificado. <sup>1</sup> Média e estimativa de desvio padrão. <sup>2</sup> Grupos de ácidos graxos, SFA: ácidos graxos saturados, MUFA: ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: ácidos graxos poliinsaturados, LC-PUFA: ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.

### 4.3.3 Análise imunológica

Nas análises imunológicas realizadas: contagem total de hemócitos; atividade da enzima fenoloxidase; e título aglutinante, não houve diferença estatística entre os valores obtidos entre os tratamentos

com o grupo controle nas substituições do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum*.

**Tabela 7:** Análises imunológicas realizadas no camarão *Litopenaeus vannamei* alimentados por 46 dias com dietas contendo diferentes níveis de substituição do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum*.

Análise imunológica	Substituição (%)				
	0	25	50	75	100
Concentração total de hemócitos ( $10^6$ células/ml)	40,09 ± 9,77	51,60 ± 5,30	56,46 ± 12,99	63,28 ± 7,33	53,31 ± 5,65
Atividade da fenoloxidase (U/min/mg proteína)	31,64 ± 11,95	59,48 ± 12,89	40,93 ± 5,59	52,26 ± 9,44	17,65 ± 2,84
Título Aglutinante (Lectina – log <sub>2</sub> )	8,33 ± 0,58	8,33 ± 0,58	8,33 ± 0,58	8,67 ± 0,58	9,67 ± 0,58

#### 4.3.4 Análise histológica

Na análise histológica observou-se o mesmo tamanho de vilosidades (pequenas) nos tratamentos e todos estavam igualmente íntegros, morfológicamente sem danos em todos os tratamentos.

## 4.4 Discussão

As dietas formuladas apresentaram o mesmo nível de proteína, energia digestível e adequada relação de ácidos graxos, atendendo à exigência nutricional para a espécie *L. vannamei* [8]. A adequada formulação da dieta foi refletida no crescimento dos camarões, já que em todos os tratamentos o ganho de peso foi superior a 1,7g por semana de cultivo, o que é considerado um excelente desempenho na fase de engorda do camarão branco em sistema de água clara. Este crescimento é superior ao crescimento semanal relatado em outros trabalhos também na fase de engorda para o camarão branco do Pacífico [17,18].

Aparentemente, o nível de 50 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum* obteve a mais adequada disponibilidade de ácidos graxos para o camarão, oriundos conjuntamente do óleo de peixe (fonte de vários ácidos graxos) e da farinha da microalga (excelente fonte de DHA, também fonte de ácido palmítico e oleico), o que acarretou na leve melhora nos índices zootécnicos dos camarões. Contudo, a substituição total do óleo de peixe não prejudicou esses parâmetros, uma vez que o crescimento foi

semelhante entre os camarões do controle e do tratamento com 100 % de substituição. Fato citado por Chen et al. (2015) [7], que demonstrou que uma adequada proporção de ácidos graxos nas dietas com substituição, poderiam promover igual crescimento e sobrevivência aquela obtida pelas dietas com óleo de peixe.

A composição final da carne dos camarões refletiu o conteúdo de sua dieta, onde a dieta com maior composição em DHA agregou maior quantidade deste ácido graxo na carne dos animais (tratamento com 100 % de substituição). Este resultado difere do observado em estudos avaliando a substituição do óleo de peixe por óleos vegetais (soja e linhaça) para camarões [7], e apesar do desempenho de crescimento dos animais ser semelhante, o camarão produzido apresentou diminuição de n-3 e demais ácidos graxos insaturados na carne. Já com a adição da farinha de *S. limacinum*, a quantidade de ácidos graxos na carne dos camarões produzidos conseguiu se equiparar a qualidade nutricional do óleo de peixe, mesmo com 100 % de substituição, no que se refere a perfil de ácidos graxos das séries n-3 e n-6 na carne. Ressalta-se ainda, que o óleo de peixe usado na fabricação das dietas foi o óleo de fígado de bacalhau, que possui alta qualidade nutricional (alto teor de EPA e DHA), o que demonstra o potencial de uso da farinha de *S. limacinum* na dieta para camarões. Este resultado é semelhante ao já observado para peixes com uso de dieta suplementada com *S. limacinum*, como com garoupa [19], contudo inédito para camarões marinhos.

Observa-se o aumento constante da concentração do ácido graxo palmítico em direção ao tratamento com 100 % de substituição, visto que a farinha da microalga possui aproximadamente 56 % desse ácido graxo em sua composição, provavelmente sua contribuição ocorreu para o aumento dos ácidos graxos saturados. A produção de ácido graxo palmítico em palmitoleico, esteárico e oléico, foi relatada no hepatopâncreas de camarão de água doce *Macrobrachium borellh* [20], podendo estar ocorrendo nesse caso para o *L. vannamei*.

A não diferença nos parâmetros imunológicos entre os camarões é positiva, pois mostra que mesmo com a total substituição do óleo de peixe pela farinha de *S. limacinum*, não houve efeito negativo em tais parâmetros. O aumento do fornecimento do ácido graxo DHA na dieta está diretamente relacionado à manutenção dos parâmetros imunes citados, visto que ele está diretamente envolvido na resposta desses mecanismos [21,22].

Não houve alterações na morfologia e tamanho das vilosidades intestinais entre os tratamentos, mesmo no tratamento com 100 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de *S. limacinum*. Isso demonstra



que mesmo a substituição total do óleo de peixe pela farinha de *S. limacinum* não comprometeu a estrutura do trato intestinal dos camarões.

Finalmente, ressalta-se que a dieta com 100 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de *Schizochytrium limacinum* teve excelentes resultados zootécnicos, mostrando que é possível a formulação de uma dieta de alto desempenho para camarões sem nenhum ingrediente de origem marinha (óleo ou farinha de peixe), com farinha de resíduos de aves como único ingrediente de origem animal, contribuindo para a sustentabilidade da aquicultura. Deste modo, demonstra que é possível a substituição do óleo de peixe por um produto independente da pesca extrativista, mas que mantém a qualidade nutricional e teor de n-3 e n-6 na carne do animal produzido, tão importantes para a saúde humana [23, 24,25]. Assim se tem um produto final com grande apelo comercial, seja pelo caráter de sustentabilidade, ao não utilizar produtos oriundos da pesca extrativista, ou do caráter de saúde humana, por ser um produto com alto teor de n-3 e n-6.

#### 4.5 Conclusão

A substituição parcial do óleo de peixe (óleo de fígado de bacalhau) pela farinha da microalga *Schizochytrium limacinum* melhora os parâmetros zootécnicos de crescimento e conversão alimentar dos camarões, ainda que de forma discreta.

A substituição total do óleo de peixe (bacalhau) pela farinha de *Schizochytrium limacinum* é possível sem afetar negativamente seus parâmetros zootécnicos e qualidade nutricional dos camarões produzidos.

A substituição total do óleo de peixe (bacalhau) pela farinha de *Schizochytrium limacinum* agrega DHA na carne dos camarões.

A substituição parcial do óleo de peixe (bacalhau) pela farinha de *Schizochytrium limacinum* não prejudica os parâmetros imunológicos dos camarões.

#### 4.6 Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro pela empresa Alltech, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado para Ariane Martins Guimarães e a bolsa de produtividade de Felipe do Nascimento Vieira (número de processo

PQ 309868/2014-9), e a empresa Nicoluzzi pelo fornecimento dos ingredientes para o preparo das dietas experimentais.

#### 4.7 Referências

- [1] FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). The state of world fisheries and aquaculture. SOFIA. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>
- [2] Tacon AGJ, Metian M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture*. 2008; 285: 146–158.
- [3] Olsen RL, Hasan MR. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*. 2012; 27: 120 -128.
- [4] Tacon AGJ, Cody JJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP, Decamp OE. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*. 2002; 8: 121-137.
- [5] Amaya E, Davis DA, Rouse DB. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 2007; 262: 419-425.
- [6] Sá MVC, Sabry-Neto H, Cordeiro-Júnior E, Nunes AJP. Dietary concentration of marine oil affects replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 2013; 19: 199-210.
- [7] Chen K, Li E, Xu C, Wang X, Lin H, Qin JG, Chen L. Evaluation of different lipid sources in diet of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Reports*. 2015; 2: 163-168.
- [8] Nutrient requirements of fish and shrimp, NRC (National Research Council), Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington: National Academic Press, 2011.
- [9] Turchini GM, Torstensen BE, Wing-Keong NG. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*. 2009; 1: 10-57.
- [10] Akiyama DM. Soybean meal utilization by marine shrimp. AOCs world congress on vegetable protein utilization in human food and animal feed stuffs, Singapore, 1988.

- [11] Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, et al. Tabela Brasileira para Aves e Suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais. 2005; 2. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Tabelas+brasileiras++Rostagno\\_000gy1tqvm602wx7ha0b6gs0xfzo6pk5.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Tabelas+brasileiras++Rostagno_000gy1tqvm602wx7ha0b6gs0xfzo6pk5.pdf)
- [12] Lima DM, Padovani RM, Rodriguez-Amaya DB, Farfán JA, Nonato CT, Lima MT, et al. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA); EM ALIMENTAÇÃO. 2006. Disponível em: [http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_versao2.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf)
- [13] Lima DM, Padovani RM, Rodriguez-Amaya DB, Farfán JA, Nonato CT, Lima MT, et al. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA); EM ALIMENTAÇÃO. 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>
- [14] UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo. Departamento de informática em saúde – Escola Paulista de Medicina. Disponível em: <http://www.dis.epm.br/servicos/nutri/public/alimento/nutriente/ndbno/16115>.
- [15] Davis DA, Samocha TM, Bullis RA, Patnaik S, Browdy CL, Stokes AD, Atwood HL. Practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): working towards organic and/or all plant production diets. 2004. Base de dados: UANL (Universidade Autónoma De Nuevo León). Acesso em: <http://eprints.uanl.mx/8363/>
- [16] Boyd CE, Gautier D. Effluent composition and water quality standards. *Global Aquaculture Advocate*. 2000; 3: 61-66.
- [17] Suárez JA, Gaxiola G, Mendoza R, Cadavid S, Garcia G, Alanis G, et al. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. 2009; 289: 118-123.
- [18] Bauer W, Prentice-Hernandez C, Tesser MB, Wasielesky W, Poersch LH. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 2012; 342: 112-116.

- [19] García-Ortega A, Kissinger KR, Trushenski JT. Evaluation of fish meal and fish oil replacement by soybean protein and algal meal from *Schizochytrium limacinum* in diets for giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. *Aquaculture*. 2016; 452: 1-8.
- [20] González-Baró MDR, Pollero RJ. Palmitic acid metabolism in hepatopancreas of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1993; 106: 71-75.
- [21] Zuo R, Ai Q, Mai K, Xu W, Wang J, Xu H, et al. Effects of dietary docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid ratio (DHA/EPA) on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys scrocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). *Aquaculture*. 2012; 334: 101-109.
- [22] Li Q, Ai Q, Mai K, Xu W, Zheng Y. A comparative study: In vitro effects of EPA and DHA on immune functions of head-kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys scrocea*). *Fish & shellfish immunology*. 2013; 35: 933-940.
- [23] Visentainer JV, Carvalho PDO, Ikegaki M, Park YK. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2000; 20: 90-93.
- [24] Domingo JL, Bocio A, Falcó, G, Llobet JM. Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*. 2007; 230: 219-226.
- [25] Smith KL, Guentzel JL. Mercury concentrations and omega-3 fatty acids in fish and shrimp: Preferential consumption for maximum health benefits. *Marine pollution bulletin*. 2010; 60: 1615-1618.

## 5 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABDEL-RAOUF, N. et al. Microalgae and wastewater treatment. *Journal of Biological Sciences*, n. 19, p. 57–275, 2012.

Aditivos e Ingredientes. Editora Insumos. 2016; 167: 40-48. Disponível em: [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/167.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/167.pdf). Acesso em: 04/09/2015.

AMAYA, E.; DAVIS, D. A.; ROUSE, D. B. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 262, n. 2, p. 419-425, 2007.

ALLTECH. Alltech Agroindustrial Ltda. Sobre a Alltech, 2014. Disponível em: <http://pt.alltech.com/about/our-story>. Acesso em: 06/12/2015.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

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

CUMMINS, V.; FILER, K. Impact of All-G-Rich on the growth performance and DHA levels os catfish *Ictalurus punctatus* when fed in combination with soy bean oil. *World Aquaculture Society Meetings Aquaculture America – 2014*.

DERNER, R. B. et al. Microalgae, products and applications. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.

DOMINGO, J.L.; et al. Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*, v. 230, n. 2, p. 219-226, 2007.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). *The state of world fisheries and aquaculture*. Roma, SOFIA, 2002.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). *The state of world fisheries and aquaculture*. Roma, SOFIA, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). *The state of world fisheries and aquaculture*. Roma, SOFIA, 2012.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). The state of world fisheries and aquaculture. Roma, SOFIA, 2014.

FILER, K. Impact of Algae SP1 on the growth performance and DHA levels of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In: World Aquaculture Society Meetings, Aquaculture America – 2013.

FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1 ed. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Florianópolis, 2013.

GLENCROSS, B. D.; SMITH, D. M. The dietary linoleic and linolenic fatty acids requirements of the prawn *Penaeus monodon*. Aquaculture Nutrition, v. 5, n. 1, p. 53-64, 1999.

GLENCROSS, B. D.; SMITH, D. M. Optimizing the essential fatty acids, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid, in the diet of the prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture Nutrition, v. 7, n. 2, p. 101-112, 2001.

GONG, H.; LAWRENCE, A. L.; JIANG, D.; GATLIN, D. M. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*. II. Active components of soybean lecithin. Aquaculture, v. 190 (3/4), p. 325-342, 2000.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L.; et al. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. Aquaculture Nutrition, v. 9, n. 2, p. 105-113, 2003.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; et al. Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture, v. 207, n. 1, p. 151-167, 2002.

HARWOOD, J. L.; GUSCHINA, I. A. The versatility of algae and their lipid metabolism. Biochimie, v. 91, n. 6, p. 679-684, 2009.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C.H.G.; FRANCO, T. T. Rates of CO<sub>2</sub> removal by *Aphanotheca microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. Chemical Engineering and Processing, v. 47, n. 8, p. 1365- 1373, 2008.

KANAZAWA, A.; TESHIMA, S. I.; ONO, K. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 63, n. 3, p. 295-298, 1979.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias—parte I. Panorama da Aquicultura, v. 2, n. 52, p. 42-50, 1999.

LEE, R.E (Ed). *Phycology*. Cambridge University Press. Colorado State University, USA, 4 th ed., 2008.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brok*. 10 ed. São Paulo; Pratic Hall Inc., 608p, 2004.

MARTIN, C. A.; et al. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr*, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S.. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, Porto, v. 14, p.217-232, 13 jul. 2010.

NRC (National Reserarch Council), Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington: National Academic press, 1993.

NRC (National Research Council), Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Nutrient requirements of fish and shrimp, Washington: National Academic Press, p. 376, 2011.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; NETO, H. S. As próximas gerações de ração para camarão marinho. *Rev. Panorama da Aquicultura*, v. 21, n. 123, p. 24-35, jan-fev, 2011.

OLSEN, R. L; HASAN, M. R. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, v.27, p. 120 -128, 2012.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 7a. Ed. Coord.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycolgy. Oxford: Blackwell Science, 566 p., 2004.

ROMERO, J.; et al. Effect of conditions culture on growth and lipids accumulation by *Schizochytrium limacinum* in continuous culture. Journal of Biotechnology, v. 136, p. S321-S322, 2008.

SÁ, M. V. C.; et al. Dietary concentration of marine oil affects replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition, v. 19, n. 2, p. 199-210, 2013.

SHEEHAN, et al.. A look back at the U.S. department of Energy's aquatic species program-biodiesel from algae, National Renewable Energy Laboratory, Golden, p.1-294, 1998.

SMITH, K. L.; GUENTZEL, J. L. Mercury concentrations and omega-3 fatty acids in fish and shrimp: Preferential consumption for maximum health benefits. Marine pollution bulletin, v. 60, n. 9, p. 1615-1618, 2010.

SUÁREZ, H. M.,et al.Importância de ácidos graxos poli-insaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 101-110, 2002.

TACON, A.G.J.; et al. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition, v. 8, p. 121-137, 2002.

TACON, A.G.J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. Aquaculture, v. 285, p. 146–158, 2008.

TURCHINI, G. M.; TORSTENSEN, B. E.; NG, W. K. Fish oil replacement in finfish nutrition. Reviews in Aquaculture, v. 1, n. 1, p. 10-57, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Instituto de química. Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <http://www.iq.ufrgs.br/ead/quimicapop/material/acidograxo.pdf>. Acessado em 02/12/2015.



VISENTAINER, J. V., et al. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 1, p. 90-93, 2000.

ZHU, L.; et al. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 2, p. 210-214, 2007.



Anexo I: Dietas experimentais: separação, mistura e identificação para armazenamento e aspecto final da ração.



Anexo II: Unidades experimentais e seus sistemas de tubulação de água salgada, aeração, aquecedores, e bandejas de alimentação.

