



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Graziela Cleuza Vieira

**Substituição e suplementação da dieta de moluscos em laboratório com ingredientes alternativos**

Florianópolis,

2022

Graziela Cleuza Vieira

**Substituição e suplementação da dieta de moluscos em laboratório com ingredientes alternativos**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Prof. Claudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.  
Coorientadora: Profa. Simone Sühnel, Dra.

Florianópolis,

2022

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

Vieira, Graziela Cleuza

Substituição e suplementação da dieta de moluscos em  
laboratório com ingredientes alternativos / Graziela Cleuza  
Vieira ; orientador, Claudio Manoel Rodrigues de Melo,  
coorientadora, Simone Sühnel, 2022.

89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. dieta alternativa. 3. alfafa. 4. óleo  
de peixe. 5. crescimento e nutrição de juvenis de moluscos.  
I. Melo, Claudio Manoel Rodrigues de . II. Sühnel, Simone .  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Graziela Cleuza Vieira**

**Substituição e suplementação da dieta de moluscos em laboratório com ingredientes alternativos**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Claudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Gilberto Caetano Manzoni, Dr.  
Univali - Universidade do Vale do Itajaí.

Prof. Dr. Helcio Luis de Almeida Marques, Dr.  
Instituto de Pesca

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Aquicultura.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Claudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2022

Este doutorado é dedicado a mim, aos meus pais e a minha irmã.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão aos meus queridos professores orientadores. Muito obrigada professor Claudio Melo por todo o suporte, apoio, orientação, por confiar em mim e em meu trabalho, por me permitir ser livre para executar meus experimentos e escrever a tese no meu tempo. À Professora Simone Sühnel pelo acolhimento quando mais precisei, por toda a dedicação, confiança, pelo carinho de corrigir com esmero a minha redação e por, também, entender o meu tempo de redigir esse trabalho. Gratidão por todo o auxílio e dedicação de ambos na publicação do nosso primeiro artigo. Sou muito grata aos dois que foram mestres sensacionais ao longo desses quatro anos de doutorado, doze anos de aquicultura e moluscos. A boa influência de vocês dois me possibilitou amadurecer, me enxergar como aluna e profissional que sou e além disso, auxiliar no meu processo de me tornar um humano melhor. Aprendi muito com vocês e vou levar um pedacinho de cada um na minha bagagem da vida.

Gostaria de Agradecer aos parceiros da *Oregon State University*. Gratidão Professor Chris Langdon, por todo o seu apoio, paciência, elucidação de todo o meu projeto de doutorado, grande auxílio na execução dos experimentos desse trabalho e publicação do nosso primeiro artigo. Além disso, gostaria de agradecer ao Professor Matt Hawkyard pela execução dos experimentos com a espécie *Venerupis philippinarum* e por todo o suporte e dedicação para a publicação do nosso primeiro artigo. Me considero uma acadêmica de muita sorte, pois foi um grande prazer e uma grande oportunidade e rica experiência.

Gostaria de agradecer a “família LMM” por todas as experiências vividas no laboratório nesses 12 anos. Todos contribuíram de alguma forma com a minha carreira e também com o meu doutorado, seja na execução do trabalho ou através de experiências vividas que me presentearam com aprendizados e muito amadurecimento. Gratidão ao Chico, João Paulo, Tatu, Jaque, Duda, Itamar, Aninha, Rico, Sino, Juan, Alexandre por todo apoio, auxílio e suporte ao longo de todo o meu trabalho e tempo que convivi com vocês. Gostaria de agradecer em especial, a minha parceira de todas as horas e “pau pra toda obra” Bianca Scaranto (Bibis) que foi meu braço direito e me ajudou muito na execução de todos os meus experimentos e além disso, foi uma grande amiga em todo período de doutorado. Muito obrigada, Bibis por todo o teu apoio, tu foste muito importante em todo o meu processo e eu só consegui dar conta de tudo porque estavas ao meu lado me ajudando em TUDO que eu precisava. Sorte a minha de ter uma parceria tão boa como a tua.

Agradeço a minha família, que é o meu porto seguro, por todo o apoio ao longo da minha vida. Aos meus amados pais por toda dedicação a mim, apoio nas minhas escolhas e

ajuda com os meus experimentos aos finais de semana. Obrigada a minha irmã querida Izabela, que é amiga, parceira e cúmplice por todo o companheirismo.

Gratidão ao meu esposo Daniel Tolfo por me apoiar em todas as fases do doutorado, por me trazer leveza, paz e mais felicidade aos meus dias. Obrigada, meu amor pelas nossas fugas para o mato, cachoeiras e natureza que sempre me recarregaram as energias durante esses anos de doutorado. Gratidão as minhas amigas amadas Angelita Lazarini e Alice Prompt que sempre me apoiaram, me ajudaram, me tranquilizaram e trouxeram alegria e luz nos momentos não tão legais da minha jornada acadêmica.

Muito obrigada ao Carlito pela gentileza de ter me auxiliado com os assuntos acadêmicos e relacionados ao meu segundo processo seletivo para finalmente conseguir me matricular no PPGAQI e dar início a realização de um sonho. Tu és um queridão, Carlito. Gostaria de agradecer também a querida e inspiradora Professora Katt pelos seus conselhos e carinho comigo.

Gratidão ao universo por me permitir vivenciar todas as ricas experiências ao longo destes doze anos e por tudo fluir com facilidade, alegria e glória em minha vida. Fui muito feliz todo esse tempo na aquicultura e agradeço por todas as experiências vividas, amadurecimento, aprendizado e por quem me tornei nessa jornada. Amo demais o tema moluscos bivalves e hoje com muito orgulho estou realizando o sonho de concluir um doutorado nessa área.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

O sucesso do cultivo de algumas espécies moluscos bivalves marinhos depende da produção de juvenis em laboratório (“*hatchery*”). Entretanto, entre os principais gargalos na produção de juvenis destes moluscos estão o tempo de permanência destes em laboratório e a dependência de microalgas em sua alimentação. A utilização de dietas tradicionais, especialmente em dietas uni ou bialgais, pode não ser garantia de um bom balanceamento de nutrientes. Além disso, a produção de microalgas exige um grande esforço e tem alto custo de produção. Estes fatores podem influenciar no bom desenvolvimento na produção de juvenis em laboratório, nesse contexto, o objetivo da presente tese foi avaliar os efeitos das substituições parciais e totais de microalgas vivas por alfafa em pó e suplementação com óleo de peixe nas dietas tradicionais oferecidas em laboratório para juvenis de diferentes espécies de moluscos bivalves. No capítulo 1 avaliou o crescimento de juvenis do mexilhão *Perna perna* e dos moluscos de areia *Mesodesma mactroides* e *Venerupis philippinarum* com substituições parciais e totais microalgas vivas por alfafa em pó. No capítulo 2 avaliou-se o crescimento de juvenis das ostras *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar* com substituições parciais e totais microalgas vivas por alfafa em pó e a suplementação com diferentes porcentagens de óleo de peixe (OP). Em resumo, o presente estudo demonstrou que o produto cloroplasto seco de alfafa (CAS) pode ser usado com sucesso como substituto parcial ou total de microalgas vivas (MV) na dieta de juvenis de *P. perna*, *M. mactroides* e *V. philippinarum* e substituto parcial para de microalgas vivas na dieta de juvenis *C. gigas* e *C. gasar*. A suplementação com OP na dieta de juvenis *C. gigas* e *C. gasar* demonstrou benefício quando comparada com dieta tradicional com apenas MV. As informações do presente estudo podem contribuir com o conhecimento na alimentação de moluscos bivalves utilizando ingrediente alternativo com grande disponibilidade que poderá ser eficiente e influenciar positivamente no crescimento e desenvolvimento de juvenis em *hatchery*.

**Palavras-chave:** Aquicultura, Dieta alternativa, alfafa, óleo de peixe, crescimento e nutrição de juvenis de moluscos.



## ABSTRACT

The successful cultivation of some marine bivalve species relies on artificial rearing of juveniles in hatcheries. However, among the main bottlenecks of mollusks rearing, we may quote the long spendable time in controlled cultivation systems and its dependency on microalgae as food resource. The utilization of traditional diet, especially based in one or two species of microalgae, may not guarantee an adequate nutrient balancing. Besides, microalgae production is laborious and expensive. These factors may play essential role on the development of juvenile production in hatcheries. Therefore, the main objective of the present thesis was to evaluate the effect of total and partial substitution of alive microalgae diet by alfalfa and the supplementation of diet with oil fish. In the first chapter, we evaluated the seeds growth rate of the mussel *Perna Perna*, of the sand mollusks *Mesodesma mactroides* and of the *Venerupis philippinarum* submitted to different ratio of substitution of microalgae for dried alfalfa chloroplast (CAS). In the second chapter, we evaluated the seeds growth rate of the oysters *Crassostrea gigas* and *C. gasar* submitted to different ratio of substitution of microalgae for CAS, and diet supplemented with different percentages of fish oil (OP). In summary, the present study demonstrated the CAS may successfully replace, partially or totally, the diet based on alive microalgae (MV) of *P. perna*, *M. mactroides* and *V. philippinarum*, but for *C. gigas* and *C. gasar*, CAS can only partially substitute the MV diet. The supplementation of MV diet with OP enhanced the growth of *C. gigas* and *C. gasar* seeds when compared to traditional diet of MV. The results of this study may contribute in establishing information on alternative feeding of bivalve mollusks, as the high availability and usage of these ingredients may be efficient in increase growth rate and development of mollusks rearing in hatcheries.

Keywords: Aquaculture, Alternative diet, alfalfa, fish oil, growth and nutrition of juvenile shellfish.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

- Figura 1.** Histograma de distribuição de tamanho de partícula do produto CAS suspenso em água do mar filtrada (com base em 156 partículas medidas em 3 imagens diferentes tiradas com uma objetiva de 40X). Os diâmetros das partículas foram medidos a partir de imagens digitais usando o *software Image Pro e Image J*..... 38
- Figura 2.** Porcentagem das concentrações iniciais de partículas (%) e diâmetros médios de partículas ( $\mu\text{m}$ ) medidos em suspensões de 1L de cloroplasto de alfafa seco (CAS) em água do mar durante um período de 24 horas. As alíquotas foram tomadas em 0, 0,25, 0,5, 1, 2 8 e 24 horas, respectivamente. Cada alíquota foi fotografada digitalmente com um microscópio composto e medida com software de análise de imagem. Cada ponto representa o valor determinado para uma única réplica (três réplicas amostradas por ponto no tempo) ..... 38
- Figura 3A.** Concentrações totais de aminoácidos (ácido aspártico = Asp, treonina = Thr, serina = Ser, glutamina = Glu, glicina = Gly, alanina = Ala, valina = Val, cisteína = Cys, metionina = Met, isoleucina = Ile, leucina = Leu , tirosina = Tyr, fenilalanina = Phe, lisina = Lys, histadina = His, arginina = Arg, prolina = Pro e taurina = Tau;% do conteúdo de aminoácidos total) medido em *Isochrysis galbana* liofilizada (cepa caribenha ISO; linha azul) , *Chaetoceros gracilis* (CG; linha preta) ou cloroplasto de alfafa seco (CAS; linha vermelha)..... 40
- Figura 3B.** Aminoácidos livres (ácido aspártico = Asp, treonina = Thr, serina = Ser, glutamina = Glu, glicina = Gly, alanina = Ala, valina = Val, cisteína = Cys, metionina = Met, isoleucina = Ile, leucina = Leu, tirosina = Tyr, fenilalanina = Phe, lisina = Lys, histadina = His, arginina = Arg, prolina = Pro e taurina = Tau;% do conteúdo total de aminoácidos) medido em *Isochrysis galbana* liofilizada (cepa caribenha ISO; linha azul), *Chaetoceros gracilis* (CG; linha preta) ou cloroplasto de alfafa seco (CAS; linha vermelha)..... 40
- Figura 4.** Média dos pesos vivos, secos e orgânicos individuais finais (intervalo de confiança de  $\pm 95\%$ ;  $n = 3$ ) de mexilhões *Perna perna* para cada tratamento. A notação MV, CAS e MV x CAS denotam os efeitos principais e interativos, junto com os p-valores resultantes, da ANOVA bidirecional com modelo de interação. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unilateral;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1 ..... 44
- Figura 5.** Média dos pesos vivos individuais finais, secos e orgânicos (intervalo de confiança de  $\pm 95\%$ ;  $n = 3$ ) de Manila clam *Venerupis philippinarum* para cada tratamento. A notação MV, CAS e MV x CAS denotam os efeitos principais e interativos, junto com os p-valores resultantes, da ANOVA bidirecional com modelo de interação. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unilateral;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1 ..... 46
- Figura 6.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm 95\%$  de intervalo de confiança;  $n = 3$ ) do *Mesodesma mactroides* para cada tratamento. A notação MV, CAS e MV x CAS denotam os efeitos principais e interativos, junto com os

p-valores resultantes, da ANOVA bidirecional com modelo de interação. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unilateral;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1 ..... 48

## ARTIGO 2

- Figura 1.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gigas* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1 ..... 66
- Figura 2.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gasar* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1 ..... 68
- Figura 3.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gigas* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1 ..... 70
- Figura 4.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gasar* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1 ..... 72

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

- Tabela 1.** Estudos de substituição/suplementação com ingredientes alternativos na alimentação de moluscos bivalves. ISO = *Isochrysis* aff. *Galbana* ..... 26

### ARTIGO 1

- Tabela 1.** Lista de tratamentos dietéticos avaliados com cada espécie. A cada tratamento foi atribuído um código referente à razão percentual do peso seco de microalgas vivas (MV) para cloroplasto de alfafa seco (CAS) na dieta..... 34
- Tabela 2.** Análise centesimal aproximada do cloroplasto de alfafa desidratado (CAS) e método de análise ..... 39
- Tabela 3.** Composição da classe de lipídios (% de lipídios totais) e lipídios totais (mg g<sup>-1</sup>) medidos em cloroplasto de alfafa seco (CAS), *Isochrysis galbana* (cepa do Caribe; ISO) e *Chaetoceros gracilis* (CG). \* Álcoois e fosfolipídios foram combinados para ISO e CG, mas analisados separadamente para CAS..... 41
- Tabela 4.** Concentrações de ácidos graxos, relatadas como porcentagem dos ácidos graxos totais, medidas em cloroplasto de alfafa desidratado (CAS) e microalgas vivas. Amostras de microalgas foram retiradas de culturas na Oregon State University que foram usadas para os testes de mexilhões de Manila. Os ácidos graxos não foram comparados estatisticamente devido ao baixo tamanho das amostras de microalgas (n = 2). Os ácidos graxos que representavam menos de 0,1% da porcentagem do total de ácidos graxos em todas as três fontes não foram relatados..... 42

### ARTIGO 2

- Tabela 1.** Lista de tratamentos dietéticos avaliados para cada espécie. A cada tratamento, para ambos os experimentos, foi atribuído um código referente à razão percentual do peso seco de microalgas vivas (MV) para cloroplasto de alfafa seco (CAS) e óleo de peixe (OP) na dieta..... 63

## LISTA DE ABREVEATURAS

ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Epagri -	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
IBGE -	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LMM -	Laboratório de Moluscos Marinhos
EUA -	Estados Unidos da América
OP -	Óleo de peixe
CAS -	Cloroplasto seco de alfafa
MV -	Microalgas vivas
ISO -	<i>Isochrysis galbana</i>
CG -	<i>Chaetoceros gracilis</i>
FAO -	Organização para a Alimentação e Agricultura
ONU -	Organização das Nações Unidas
IBAMA -	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
SAP -	Secretaria de Aquicultura e Pesca
MAPA -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
DHA -	Ácido docosahexaenóico
EPA -	Ácido eicosapentaenoico
DPA -	Ácido docosapentanoico
PUFA's -	Ácidos graxos poli-insaturados
L -	Litro
mg -	Miligramas
h -	hora
µm -	micrômetros
N -	normal
T -	tempo
PET -	Polietileno tereftalato
UE -	Unidade experimental
PV -	Peso vivo
PS -	Peso seco
PO -	Peso orgânico
PC -	Peso de cinzas

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
	PROBLEMÁTICA E JUSTIFICATIVA .....	15
	PRODUÇÃO AQUÍCOLA .....	16
	<b>Algumas considerações sobre as espécies de moluscos estudadas na presente tese.....</b>	<b>17</b>
	<b>O mexilião <i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1758).....</b>	<b>18</b>
	<b>A ostra do mangue <i>Crassostrea gasar</i> (Adanson, 1757).....</b>	<b>19</b>
	<b>A ostra-do-Pacífico ou ostra japonesa, <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) ...</b>	<b>20</b>
	<b>O marisco branco, <i>Mesodesma mactroides</i> (Reeve, 1854).....</b>	<b>20</b>
	<b>O molusco de areia, <i>Venerupis philippinarum</i> (Adams e Reeve, 1850).....</b>	<b>21</b>
	<b>Alimentação de moluscos bivalves. ....</b>	<b>22</b>
	<b>Nutrição de moluscos bivalves.....</b>	<b>23</b>
	<b>Suplementação e a substituição de dietas na alimentação de moluscos bivalves .....</b>	<b>25</b>
	<b>Alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e o óleo de peixe.....</b>	<b>26</b>
1.1	OBJETIVOS .....	28
1.1.1	Objetivo Geral .....	28
1.1.2	Objetivos Específicos.....	28
1.2	ESTRUTURA DA TESE.....	29
<b>2.</b>	<b>ARTIGOS.....</b>	<b>30</b>
2.1	ARTIGO 1 .....	30
	<b>Resumo .....</b>	<b>31</b>
2.1.1	<b>Introdução .....</b>	<b>31</b>
2.1.2	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>33</b>
2.1.3	<b>Resultados .....</b>	<b>37</b>
2.1.4	<b>Discussão .....</b>	<b>48</b>
2.1.5	<b>Agradecimentos .....</b>	<b>51</b>
2.1.6	<b>Referências .....</b>	<b>52</b>
2.2	ARTIGO 2 .....	58
	<b>Resumo .....</b>	<b>58</b>
2.2.1	<b>Introdução .....</b>	<b>59</b>
2.2.2	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>61</b>

2.2.3	Resultados .....	64
2.2.4	Discussão .....	72
2.2.5	Agradecimentos .....	75
2.2.6	Referências .....	75
3.	CONCLUSÃO GERAL .....	79
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....	80

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### PROBLEMÁTICA E JUSTIFICATIVA

Os moluscos bivalves são uma rica fonte de nutrientes incluindo proteínas, vitaminas, minerais e ácidos graxos que proporcionam importantes benefícios para a saúde humana (CHIESA et al., 2018) e o cultivo desses animais, contribui com a garantia de oferta para o consumo evitando a extração dos mesmos nos estoques naturais. Dessa forma, a malacocultura pode beneficiar pequenos produtores, consumidores de pescados, indústria, setor de serviços entre outros (FERREIRA, 2004).

O sucesso do cultivo de algumas espécies moluscos bivalves no Brasil depende da produção de juvenis em laboratório (“*hatchery*”) e no estado de Santa Catarina o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) possui um importante papel na produção desses animais dispondo de tecnologia que permite a produção programada de juvenis que beneficia os maricultores catarinenses e do restante do Brasil. Entretanto, entre os principais gargalos na produção de juvenis de moluscos bivalves está o tempo de permanência destes em laboratório e a dependência da alimentação exclusiva de microalgas, contudo para manter o crescimento da malacocultura catarinense faz-se necessário aprimorar as técnicas de produção em busca de soluções inovadoras para a reprodução, larvicultura e manutenção de juvenis em laboratório.

Os moluscos bivalves alimentam-se através da filtração removendo partículas suspensas na água. Na natureza sua dieta é composta de uma mistura heterogênea de partículas suspensas, proveniente de uma combinação de produção primária (microalgas planctônicas e bentônicas), detritos (matéria orgânica morta) e material em suspensão derivado da terra (BAYNE, 2017). Todavia em laboratório, a dieta tradicional para moluscos bivalves é baseada em uma combinação de microalgas vivas (BROWN et al., 1997), porém sua produção exige um grande esforço e alto custo de produção (DE PAUW et al., 1983). Além disso, a utilização de dietas tradicionais pode não garantir que os moluscos recebam todos os componentes necessários para o seu crescimento e desenvolvimento, uma vez que a composição bioquímica das microalgas depende da espécie, dos nutrientes disponíveis no ambiente (LUZARDO-ALVAREZ; OTERO-ESPINAR; BLANCO-MÉNDEZ, 2010), do sistema de produção (BOROWITZKA, 1999) e da fase em que é colhida (FIDALGO et al., 1998).



Nesse contexto, sabe-se que no cenário atual da aquicultura ainda não há uma dieta formulada padronizada ideal para a manutenção de moluscos bivalves em laboratório, e o desenvolvimento de dietas artificiais para espécies aquáticas comerciais é um tema de pesquisa de grande relevância devido ao impacto sanitário e econômico na aquicultura (JONES, 1998; BUJAN-LÓPEZ, 2003). Em vista disso, a nutrição é um dos fatores que pode contribuir vigorosamente para o bom desenvolvimento e crescimento de juvenis.

Na produção de juvenis, o tempo de permanência no laboratório e a grande dependência de microalgas em sua dieta são pontos críticos e frente à grande demanda por juvenis de ostras a alimentação pode representar um fator limitante, portanto mais estudos se fazem necessários a respeito da nutrição de moluscos bivalves. Nesse contexto, torna-se importante a busca por alternativas de baixo custo e eficientes, que influenciem positivamente no crescimento e desenvolvimento de juvenis.

A presente tese propõe avaliar uma nova alternativa de dieta, que possa contribuir na manutenção de juvenis do mexilhão *Perna perna* e dos moluscos de areia *Mesodesma mactroides* e *Venerupis philippinarum* e das ostras *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar*. Em parceria com a Universidade do Estado de Oregon (Oregon State University/OSU), Estados Unidos da América, foram testadas dietas com cloroplasto de alfafa seco (CAS) e óleo de peixe para alimentações destes moluscos. Os estudos realizados com *V. philippinarum* foram realizados na OSU (EUA).

## PRODUÇÃO AQUÍCOLA

A aquicultura desempenha um papel social e econômico de grande relevância por meio da produção alimentícia e geração de trabalho e renda. Recentemente a edição do *State of The World Fisheries and Aquaculture* (FAO, 2020) da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO/ONU) relatou que a produção aquícola mundial cresceu em média de 5,3% ao ano, no período de 2001 a 2018. Em 2018, foram produzidas 179 milhões de toneladas de pescado no mundo, com valor estimado em US\$ 401 bilhões (FAO, 2020). Dentre os países produtores de pescado, a China destaca-se, sendo responsável por 35% da produção total superando a produção total da Ásia (34%; sem os dados da China), Américas (14%), Europa (10%), África (7%) e Oceania (1%) (FAO, 2020).

Segundo a FAO, no ano de 2017, o consumo de pescado representou 17% da ingestão de proteína animal pela população mundial e 7% de todas as proteínas consumidas. O consumo per capita de pescado pela população mundial chegou a 20,5 kg/pessoa/ano em 2018 (FAO, 2020), demonstrado que é uma fonte proteica que apresenta elevada importância na

segurança alimentar da população global e contribui fortemente para a renda e movimentação da economia (FAO, 2016). Entre os animais aquícolas cultivados estão os moluscos de concha que no ano de 2018 movimentaram um montante de 34,6 milhões de dólares (FAO, 2020).

Em 2018, os moluscos bivalves (17,7 milhões de toneladas) representaram 56,2% da produção de aquicultura costeira marinha mundial (FAO, 2020) e entre as espécies mais cultivadas estão as ostras do gênero *Crassostrea* spp. (5.171,1 mil de toneladas), *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (643,5 mil toneladas), o molusco de areia *Venerupis philippinarum* (ADAMS; REEVE, 1850) (4.139,2 mil toneladas) e mexilhões da família *Mytilidae* (1.205,1 mil toneladas). No Brasil, o estado de Santa Catarina destaca-se como o principal produtor de moluscos bivalves cultivados, sendo responsável por cerca de 98% da produção nacional de moluscos em 2017 (EPAGRI, 2018) e no ano de 2019, a produção total de moluscos bivalves no Estado de Santa Catarina foi de 15,1 mil toneladas, fornecendo uma renda bruta de pouco mais de 92 milhões de reais (EPAGRI, 2020).

#### ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES DE MOLUSCOS ESTUDADAS NA PRESENTE TESE

A malacocultura brasileira vem evoluindo progressivamente nos últimos anos, entretanto o cultivo restringe-se a poucas espécies. São quatro as espécies de moluscos bivalves cultivadas no Brasil com a tecnologia de cultivo desenvolvida, sendo três delas nativas, o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), a ostra-do-mangue, *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), a vieira, *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) e a quarta espécie trata-se da ostra-do-Pacífico, *Crassostrea gigas*, que possui o seu cultivo bem sucedido no estado de Santa Catarina devido as condições geográficas (NASCIMENTO, 1983) e ao domínio e aperfeiçoamento das técnicas de produção de juvenis em laboratório.

Segundo Ferreira (1998), os estudos de espécies nativas de moluscos bivalves com potencial para cultivo devem ser prioridade para o desenvolvimento da malacocultura no Brasil, visto que, por exemplo, o consumo dos moluscos de areia, até este momento, é oriundo da extração em estoques naturais. Entre as espécies de moluscos de areia exploradas ao longo da costa brasileira estão *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854), *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791; sinonímia *Lucina jamaicensis* (Lamarck, 1801; de acordo com RIOS, 2009), *Trachycardium muricatum* (Linnaeus, 1758; sinonímia *Trachycardium manoeli*, de acordo com Prado, 1993) e *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791). Além do potencial para

cultivo de *A. brasiliana* (LAGREZE, et al., 2015; LAGREZE et al., 2018), *M. mactroides* também se destaca como uma opção para a aquicultura (PROVERBIO, 2017; SANTOS et al., 2020a, 2020b) e pode tornar-se mais uma alternativa entre as espécies nativas cultivadas de moluscos bivalves no Brasil.

#### O MEXILHÃO *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), pertence à família Mytilidae é considerado o maior dos mitilídeos brasileiro, podendo atingir até 14 cm de comprimento (KLAPPENBACH, 1964), possui ocorrência no Brasil e se distribui do litoral do Espírito Santo ao litoral de Santa Catarina (WALLNER-KERSANACH; BIANCHINI, 2008). Esta espécie, apresenta grande importância para os ambientes em que habita, estruturando comunidades em litorais rochosos e sendo bioatrator de diversidade (FREITAS; VELASTIN, 2010), além disso, o mexilhão *P. perna* possui sua importância social e econômica para Santa Catarina, por se tratar da espécie de molusco bivalve mais cultivada no estado, alcançando uma produção de 12 mil toneladas no ano de 2018 (EPAGRI, 2020).

Os cultivos de mexilhões *P. perna* no Brasil surgiram como uma forma de exploração racional dos recursos marinhos (MARENZI, 2006) e no ano de 1988, iniciou-se o cultivo de mexilhões *P. perna* em parceria com os pescadores artesanais catarinenses (FERREIRA; OLIVEIRA NETO; SILVESTRE 2006). O cultivo dessa espécie pode ser realizado em sistema suspenso fixo em ambientes com até 4 metros de profundidade ou espinhéis flutuantes em locais abrigados que podem variar de entre 4 e 40 metros de profundidade (FERREIRA; MAGALHÃES, 2004) e seus juvenis são obtidos do ambiente natural com a utilização de coletores (captação de larvas) nas fazendas marinhas ou são extraídas diretamente dos costões rochosos.

A extração de juvenis de *P. perna* em estoques naturais é normatizada para instrução normativa (IN) IBAMA N° 105, de 20 de julho de 2006, sendo permitida a retirada de animais entre 2 e 3 cm de comprimento total (medida tomada no seu maior eixo) acima da linha de baixa-mar, em faixas verticais alternadas de até 50 cm (cinquenta centímetros) de largura. Além disso, a extração de juvenis de mexilhão no estoque natural deve ser autorizada pela Secretaria de Aquicultura e Pesca - SAP/MAPA de cada estado, a autorização de ser exclusivamente aos malacocultores licenciados ou signatários do Termo de Ajustamento de Conduta - TAC (Portaria IBAMA nº. 69/2003).

Os juvenis também podem ser captados por coletores artificiais ou através da técnica de assentamento remoto de “larvas olhadas”, que consiste na transferência de larvas no estágio pedivéliger, produzidas em laboratório, para serem introduzidas em áreas de cultivo (NOVAES, 2016). A produção de juvenis em laboratório é tecnologicamente viável, pois viabiliza a disponibilidade de juvenis o ano inteiro, enquanto a captação de juvenis por coletores é realizada em determinada época do ano. A captação de juvenis com coletores artificiais e a produção destas em laboratório podem contribuir positivamente para a conservação dos estoques naturais.

#### A OSTRAS DO MANGUE *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

A espécie *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) (sin. *Crassostrea tulipa* e *C. brasiliiana*) é endêmica em ambientes estuarinos e regiões de manguezais encontrando-se fixadas geralmente nas raízes de mangues ou em rochas (VARELA et al., 2007) e encontra-se distribuída da costa de Senegal até Angola na África (AFINOWI, 1984) e na América do Sul, distribui-se da Guiana Francesa até o sul do Brasil (LAPÈGUE et al., 2002). A *C. gasar*, por pertencer ao gênero *Crassostrea*, é uma espécie eurialina e euritérmica (GALTSOFF, 1964; QUAYLE, 1988) que pode alcançar mais de 70 mm de altura (LEGAT et al., 2017a). A ostra *C. gasar*, vem sendo inserida gradativamente na malacocultura brasileira (PIE et al., 2006) devido ao seu potencial zootécnico de crescimento tanto em ambientes marinhos quanto estuarinos (LEGAT et al., 2017a; LOPES et al., 2013). No sul do Brasil, na região da grande Florianópolis algumas fazendas marinhas já adquirem os juvenis do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) e cultivam essa espécie que representou 5% da produção em Santa Catarina no ano de 2018 (EPAGRI, 2020).

Alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de colaborar com o progresso da tecnologia de produção de *C. gasar* em laboratório e sabe-se que o ciclo reprodutivo dessa espécie é influenciado positivamente com a diminuição da salinidade e aumento da temperatura, tornando a reprodução em laboratório viável o ano inteiro (GOMES et al., 2014). Ramos et al. (2014) demonstraram que em laboratório a temperatura de 22°C foi ideal para a maturação do tecido gonádico de *C. gasar* e Silveira et al. (2011) concluíram que a epinefrina e o pó de concha foram eficientes no assentamento larval.

A preferência por cultivar essa espécie de ostra de mangue é baseada em seu crescimento mais rápido e tamanho maior quando comparada a *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (CHRISTO e ABSHER, 2006). Em relação ao cultivo de *C. gasar* Funo et

al. (2015) observaram que a sobrevivência e o crescimento foram promissores em salinidade de 30 a 35. No sul do Brasil em cultivo em lanternas, verificou-se animais de 60 mm de altura em 5 meses de cultivo (MACCACCHERO et al., 2007), acima de 60 mm de altura aos 8 meses (LEGAT et al., 2017a) e com 70 mm de altura com 10 meses de cultivo (BRUNETTO et al. 2020). Todas as observações dos estudos citados acima demonstram que a ostra do mangue *C. gasar* é uma espécie interessante para o cultivo.

#### A OSTRAS DO PACÍFICO OU OSTRAS JAPONESAS, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

A ostra do Pacífico, *Crassostrea, gigas* encontra-se naturalmente no Japão, Coreia e China (IMAI, 1982) e é cultivada em alguns países da Europa, América do Norte e América do Sul devido à sua adaptabilidade e rápido crescimento. No Brasil, essa espécie foi introduzida entre os anos 70 e 80 por instituições de pesquisa e universidades dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina (COSTA, 1983; RAMOS; NASCIMENTO; SILVA, 1986 e POLI, 1993) e a primeira produção comercial da ostra do Pacífico em Santa Catarina foi iniciada no ano de 1991 com o intuito de propiciar uma alternativa à pesca artesanal (OLIVEIRA-NETO, 2005).

Nos últimos anos, no Brasil, ocorreram avanços biotecnológicos na produção de juvenis dessa espécie em laboratório (GOMES et al., 2018; MELO et al., 2015; PUCHNICK-LEGAT et al., 2015) e com isso, estes estudos contribuíram com o avanço e consolidação da cadeia produtiva de ostras em Santa Catarina. Segundo Ferreira et al. (2011) a obtenção de juvenis em ambiente natural se limita às condições de temperatura da costa Catarinense. Entretanto, foi observada a ocorrência de *C. gigas* em ambiente natural em uma das Baías de Florianópolis e também em Laguna (MELO et al., 2010a). A ostra do Pacífico, *C. gigas*, tem uma grande importância social e econômica para maricultores em Santa Catarina, que seu cultivo no ano de 2018 movimentou cerca de 32 milhões de reais (EPAGRI, 2020). A região da Grande Florianópolis é conhecida popularmente como a capital nacional da ostra e este título faz com que turistas sejam atraídos pelos roteiros gastronômicos, movimentando e desenvolvendo a economia local.

#### O MARISCO BRANCO, *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854)

O molusco de areia *Mesodesma mactroides* (syn. *Amarilladesma mactroides*), no Brasil é conhecido como “marisco branco” e em outros países como “almeja amarilla” ou “yellow clam”, é uma espécie de bivalve bentônica infaunal (Gianuca, 1987) e distribui-se desde a Ilha

Grande, no Rio de Janeiro, até a Bahia Blanca, na Argentina (RIOS, 1994). O crescimento das populações humanas litorâneas submete essa espécie a poluição e ao pisoteio humano, por viver em região entre marés (FONTANA et al., 2003), além disso, esses animais também estão suscetíveis à sobre exploração e surtos de mortalidades (DEFEO et al., 1992b).

O *M. mactroides*, apresenta importância no Brasil, Uruguai e Argentina por sua pesca recreativa histórica, com valor socioeconômico associado (DEFEO et al., 1992a; BRAZEIRO; DEFEO, 1999; SCHOEMAN et al., 2013). Alguns estudos preliminares sobre seu potencial para o cultivo na aquicultura têm demonstrado resultados promissores na produção de juvenis em laboratório. Santos et al. (2020a) avaliaram o desenvolvimento embrionário e larval de *M. mactroides* em laboratório e puderam observar que a metamorfose completa se deu no 27º dia e seu o melhor desenvolvimento destas ocorre em salinidade de 35 (SANTOS et al., 2020b). Estas informações básicas podem auxiliar na definição de condições ideais para a produção de juvenis dessa espécie em laboratório.

#### O MOLUSCO DE AREIA, *Venerupis philippinarum* (Adams e Reeve, 1850)

O molusco de areia *Venerupis philippinarum* (Adams e Reeve, 1850; sinônimo *Ruditapes philippinarum*) é distribuído originalmente na região do Indo-Pacífico, entretanto essa espécie foi introduzida em muitos países para seu cultivo na aquicultura, incluindo as águas costeiras do Atlântico Europeu e do Mediterrâneo (GOSLING, 2004) e América do Norte (FLASSCH; LEBORGNE, 1992). O Manila clam *Venerupis philippinarum* é um dos moluscos de areia mais produzidos no mundo (CAILL-MILLY et al., 2014). Em 2014, Manila clam representaram ~ 25% da produção mundial total de moluscos (CORDERO et al., 2017) e segundo a FAO, no ano de 2018 foram produzidas cerca de 4,1 milhões de toneladas (FAO, 2020).

O cultivo de Manila clam tradicionalmente depende de juvenis naturais que são coletadas em zonas entre-marés (YAN; ZHANG; YANG, 2006), porém por se tratar de uma espécie comercialmente importante há uma demanda crescente por estudos que permitam a produção de *V. philippinarum* em *hatcheries*. Foram realizados alguns estudos avaliando o desenvolvimento larval (YAN; ZHANG; YANG, 2006; NUMAGUCHI, 1998) e o crescimento de juvenis (TAMAYO et al., 2011; LIN; XU, 1997) em laboratório.

## ALIMENTAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES

Os moluscos bivalves alimentam-se de partículas em suspensão na coluna d'água e seu comportamento alimentar e nutrição podem ser afetados por seu modo de vida infaunal ou epifaunal (HAWKINS et al., 1980, PRINS; SMAAL, 1989; PRINS et al., 1991, SMAAL et al., 1997, BAYNE, 2018). As espécies infaunais apresentam maior capacidade de seleção de partículas quando comparadas às espécies epifaunais (BACON et al., 1998) além disso, apresentam processos de alimentação diferenciados com a presença de bactérias quimiossintéticas endossimbiontes presentes nos filamentos branquiais (GOSLING, 2004).

O processo de alimentação nos bivalves, de uma maneira geral, conta com os órgãos paliais (brânquias, palpos labiais e manto) onde as partículas em suspensão na coluna d'água passam pelo processo de captura, transporte, seleção e ingestão ou rejeição (BAYNE, 2017) e segundo Wildish e Kristmanson (1997) a alimentação dos moluscos bivalves pode ser descrita por seis processos (RESGALLA et al, 2006):

- (1) O transporte de água do mar em direção as brânquias;
- (2) A captura das partículas (séston) na superfície de filtração das brânquias;
- (3) A classificação das partículas (ingeridas x rejeitadas) e o transporte das partículas ingeríveis para a boca;
- (4) Ingestão das partículas selecionadas;
- (5) Transporte para o trato digestório para digestão intra e extracelular;
- (6) Absorção de nutrientes pelas superfícies intestinais.

No processo de alimentação o transporte de água do mar, contendo partículas em suspensão, é realizado pelo batimento dos cílios branquiais que produzem uma corrente de água (WARD et al., 1998) que movimentam as partículas nos filamentos branquiais e nos palpos labiais, ocorrendo a primeira seleção alimentar, onde partículas de tamanhos inadequados, materiais inertes e excesso de alimento são agregados e envoltos por muco proteico e eliminados na forma de pseudofeces (WARD, 1996; ROBBINS, 2008; ESPINOSA et al., 2009). A seleção de partículas menores ocorre nos filamentos das branquiais, enquanto as partículas maiores são classificadas nos palpos labiais (BAYNE, 2017) e o tamanho das partículas ingeridas varia de acordo com a espécie e a fase de vida, como demonstraram Barillé et al. (1997) que 95% das partículas de séston ingeridas por *C. gigas* adultas estavam na faixa de 2 a 20  $\mu\text{m}$ , enquanto para larvas de *Crassostrea virginica* o tamanho das partículas ingeridas variou de 0,5 a 12  $\mu\text{m}$  (BALDWIN; NEWELL, 1995). Os mexilhões adultos da

espécie *Mytilus edulis* tem preferência por partículas entre 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  (ROSA et al., 2015) e os adultos da vieira *Placopecten magellicanus* e do molusco de areia *Mya arenaria* ingerem partículas entre 5 a 15  $\mu\text{m}$  (RABY et al., 1997).

Após a seleção nos palpos labiais, o material é levado até a boca, esôfago e estômago (GOSLING, 2004) que possui uma parede contendo um escudo gástrico quitinoso e uma área de seleção pregueada e ciliada (BENINGER; LE PENNEC, 1991). Para auxiliar na digestão de forma química e mecânica, os moluscos bivalves contam com o estilete cristalino que é composto por enzimas digestivas, os cílios gástricos e o estilete, em rotação, misturam as partículas alimentares com o muco e formam o cordão, que é puxado pelo interior do estômago para os divertículos digestivos para digestão glandular (intracelular). Em seguida, o cordão segue para o intestino e ao final processo de digestão, o material fecal é eliminado na forma de fezes através do ânus (BAYNE, 2017).

## NUTRIÇÃO EM MOLUSCOS BIVALVES

O primeiro passo para oferecer uma nutrição completa para os animais aquáticos cultiváveis é o conhecimento de suas exigências nutricionais, sendo difícil fazer este tipo de estudo com moluscos bivalves, uma vez que sua dieta é baseada em fitoplâncton. No entanto, sabe-se que a nutrição de moluscos bivalves está fortemente relacionada com a sobrevivência, crescimento e reprodução desses animais (ADAMS; SALINAS-FLORES; LIM, 2013; BROWN; MCCAUSLAND, 2000; LANGDON; SIEGFRIED, 1984) e há poucas informações disponíveis sobre os itens alimentares específicos usufruídos por bivalves no ambiente natural, embora seja geralmente assumido que estes animais dependem do fitoplâncton presente na coluna de água como sua principal fonte de energia (BAYNE, 2017). Ainda que as exigências nutricionais dos moluscos bivalves sejam desconhecidas, sabe-se que os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFA) são importantes (KNAUER; SOUTHGATE, 1997), visto que os moluscos bivalves necessitam de fontes dietéticas de ácidos graxos, como o ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6n-3) (LANGDON; WALDOCK, 1981; SÜHNEL et al., 2012, CHENG et al., 2020), ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5n-3) (FARIAS et al., 2003; SÜHNEL et al., 2012), ácido araquidônico (ARA; 20: 4n -6) (PERNET et al., 2004) e ácido docosapentaenóico (DPA = 22: 5n-6) (PERNET et al., 2005; MILKE et al., 2006).

Os ácidos graxos são importantes, para os moluscos bivalves, no desenvolvimento e na alta qualidade dos gametas e podem determinar as condições ideais de maturação



(LARAMORE et al., 2011), pois há uma relação entre o ciclo reprodutivo bivalves e a composição de ácidos graxos no tecido gonádico (BAPTISTA et al., 2014; NARVÁEZ et al., 2008; PAZOS et al., 1996). Foi observado que os ácidos graxos acumulam-se em oócitos maduros, servindo como fonte de energia durante o desenvolvimento larval (HENDRIKS et al., 2003; SOUDANT et al., 1996; GALLAGER; MANN, 1986) e alguns estudos demonstraram que o aumento dos valores de PUFA n-3 estão associados à maturação de oócitos em ostras (DRIDI et al., 2007; SOUDANT et al., 1999; PAZOS et al., 1996), moluscos de areia (BAPTISTA et al., 2014; OJEA et al., 2004) e vieiras (PALACIOS et al., 2005).

Diante do exposto, observa-se que os ácidos graxos são componentes importantes e fundamentais na dieta de moluscos bivalves em diferentes fases do seu desenvolvimento. Para os bivalves, a dieta mais comum em laboratório é baseada em uma combinação de microalgas vivas (BROWN et al., 1997), as quais são ricas em matéria orgânica como ácidos graxos, proteínas, carboidratos e outras moléculas (SADOVSKAYA et al., 2014) e um dos elementos importantes na seleção da espécie microalga utilizada desses animais é a sua composição de ácidos graxos (GOSLING, 2004). No entanto, dietas uni e bialgae utilizadas para a manutenção bivalves em laboratório, dependendo da combinação de espécies, como observado por Lagreze et al. (2015) na larvicultura, podem não proporcionar um bom desempenho zootécnico dos animais. Além disso, a dependência da alimentação exclusiva de microalgas pode representar um fator limitante para a manutenção de juvenis em laboratório (DE PAUW et al., 1983) e dessa forma, torna-se de extrema importância estudos relacionados com a suplementação alimentar de moluscos bivalves com o intuito de fornecer nutrientes importantes de forma alternativa na alimentação desses animais. Em vista disso, a nutrição é um dos fatores que pode contribuir vigorosamente para o bom desenvolvimento e crescimento de larvas, juvenis e condicionamento de reprodutores de bivalves em laboratório.

A mistura de microalgas vivas é a dieta mais comum para os moluscos bivalves em laboratório (BROWN et al., 1997), estas são interessantes para a alimentação de moluscos bivalves, pois produzem e acumulam grandes quantidades de lipídios. Este acúmulo de lipídios varia entre as espécies e sua concentração pode ser influenciada por fatores como luminosidade (PIRT, 1986), nutrientes (SUKENIK; WAHNON, 1991) e temperatura (THOMPSON et al., 2010). As microalgas vivas são utilizadas na alimentação de moluscos bivalves pois, são ricas em ácidos graxos e estes correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os poliinsaturados (PUFA's) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 2004; BROWN, 1991).

A produção de microalgas pode não ser garantia de alimentação ideal devido à variação no valor do nutricional, concentração algal variável, contaminação bacteriana (ÖNAL; LANGDON; ÖNAL, 2005) e os custos de alimentações vivas são geralmente elevados (DE PAUW et al., 1983) representando uma proporção significativa dos custos totais de larvicultura e engorda (LE RUYET et al., 1993). Em vista disso, houveram inúmeras tentativas de encontrar fontes alternativas de menor custo e sustentáveis nas dietas de moluscos bivalves, que possam atuar como substituto total ou parcial de microalgas vivas na produção em laboratório (SÜHNEL et al., 2014; TANYAROS et al., 2016a; LANGDON e ONAL, 1999; LANGDON; WALDOCK 1981) (veja Tabela 1 para maiores detalhes).

## SUPLEMENTAÇÃO E A SUBSTITUIÇÃO DE DIETAS NA ALIMENTAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES

A suplementação e a substituição da dieta de microalgas vivas por microalgas secas ou em pasta e por outros compostos vem sendo testada, como alternativa para a alimentação de moluscos bivalves em laboratório. Segundo Laing (1989), uma dieta alternativa para bivalves deve atender alguns requisitos importantes, entre eles o tamanho da partícula, estabilidade no sistema de cultivo, digestibilidade, toxicidade nula e uma composição bioquímica que atenda às necessidades nutricionais de cada espécie.

Como exemplo de suplementação da dieta algal, Langdon e Waldock (1981) demonstraram que a adição de microcápsulas, contendo ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6n-3), na alimentação de juvenis de *C. gigas* contribuíram para o melhor desempenho de crescimento em relação aos animais alimentados somente com microalgas vivas. Em outro estudo desenvolvido por Sühnel et al. (2012), os autores observaram que a adição de ácido eicosapentaenoico (EPA; 20: 5n-3) na alimentação de reprodutores de *Nodipecten nodosus* com a microalga *Isochrysis* sp. (ISO), proporcionou um efeito positivo na maturação e uma maior sobrevivência de larvas e juvenis (pré-sementes).

Além da suplementação alimentar para os moluscos bivalves, utilização de fontes alternativas de alimento ou microalgas secas na substituição da dieta de microalgas vivas de bivalves vem sendo testadas. A exemplo, juvenis do molusco de areia *Ruditapes decussatus*, apresentaram resultados positivos no crescimento com a substituição de 50% de microalgas por farinha de milho (PÉREZ- CAMACHO et al., 1998) e 50% de microalgas por farinha de germe de trigo (ALBENTOSA et al., 1999). Langdon e Onal (1999) observaram que juvenis de *Mytilus galloprovincialis* alimentados com 75% de microalgas secas e 25% de microalgas

vivas cresceu significativamente mais rápido do que os mexilhões alimentados com uma dieta padrão de microalgas vivas. Carboni et al. (2016) observaram que a substituição de 50% de microalgas vivas por resíduo de biodiesel, para a alimentação de juvenis de *C. gigas*, levou ao crescimento rápido e significativo, em comparação aos animais alimentados somente com microalgas vivas. Sühnel et al. (2014) observaram que a substituição da dieta de microalgas vivas com 50% de microalga seca rica em carotenoides proporcionou uma melhor maturação dos gametas femininos e uma maior sobrevivência larval da vieira *Nodipecten nodosus*. Neste estudo de Sühnel et al. (2014), foi possível maturar por 15 dias reprodutores de *Nodipecten nodosus* com 75% de microalga seca. Contudo cabe destacar que a utilização de ingredientes alternativos na dieta deve ser viável economicamente e disponíveis para a aquisição (LUZARDO-ALVAREZ et al., 2010).

**Tabela 1** – Estudos de substituição/suplementação com ingredientes alternativos na alimentação de moluscos bivalves. ISO = *Isochrysis* aff. *galbana*.

Espécie	Fase de vida (comp.)	Ingrediente	Dieta base (proporção)	% de subst.	Resultado	Referência
<i>R. decussatus</i>	Juvenis (2,10 mm)	farinha de milho	ISO (100%)	50	A taxa crescimento de juvenis, em peso orgânico, foi a mesma da dieta composta apenas de microalgas.	PÉREZ-CAMACHO et al. (1998).
<i>M. galloprovincialis</i>	Juvenis (100 mg)	microalgas secas	ISO: <i>C. calcitrans</i> (50:50%)	75	Os juvenis alimentados com microalgas secas cresceram significativamente mais rápido do que os animais alimentados somente com microalgas vivas.	LANGDON & ONAL (1999).
<i>C. gigas</i>	Juvenis (1,96 mm)	resíduo de biodiesel	<i>T. suecica</i> : <i>I. galbana</i> (70:30%)	50	Influenciou positivamente no crescimento e sobrevivência de juvenis ao longo de 4 semanas.	CARBONI et al. (2016).
<i>N. nodosus</i>	Adultos (70-75 mm)	microalgas secas (Algamac)	ISO: <i>C. muelleri</i> : <i>Skeletonema</i> (50:25:25%)	50	Resultou em um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada. Aumentou a sobrevivência das larvas "D" e pediveliger.	SÜHNEL et al. (2014).
<i>C. belcheri</i>	Juvenis (1,76 mm)	concentrados flocculados de água do viveiro de camarões	<i>C. calcitrans</i> : <i>T. suecica</i> (50:50%)	5	Promoveu um melhor crescimento em juvenis.	TANYAROS et al. (2016b).
<i>C. belcheri</i>	Larvas (70-80 µm)	levedura	ISO: <i>C. calcitrans</i> (50:50%)	25	O crescimento médio diário dos juvenis alimentados com levedura foi tão elevado quanto o crescimento dos juvenis alimentadas com 100% de microalgas.	TANYAROS et al. (2016a).
<i>Ruditapes decussatus</i>	Juvenis (2,10 mm)	farinha de germen de trigo	ISO (100%)	50	A substituição apresentou taxas médias de crescimento dos juvenis sem diferenças significativas quando comparada os animais alimentados com 100% de microalgas.	ALBENTOSA et al. (1999).

## ALFAFA (*Medicago sativa*) E O ÓLEO DE PEIXE

Devido ao seu alto valor nutricional (FIORENTINI; GALOPPINI, 1981) e disponibilidade, a leguminosa alfafa *Medicago sativa* (Linnaeus, 1753) é uma alternativa interessante para alimentação de animais de aquicultura. A alfafa é uma leguminosa natural da

Ásia Central, sendo considerada a "rainha das plantas forrageiras" devido ao seu elevado valor nutritivo, grande produtividade e boa palatabilidade (PAULA; SILVA, 1998). A alfafa é amplamente cultivada e possui alto teor de proteínas com um perfil de aminoácidos balanceado, ácidos graxos, além de conter vitaminas e carotenoides (VHANALAKAR; MULEY, 2015).

Nos organismos aquáticos, por se tratar de uma fonte rica em proteínas, a alfafa já foi testada em rações para peixes. Na dieta de alevinos de peixes, Ali et al. (2003) demonstraram que a inclusão de até 5% de farelo de alfafa pode ser utilizada na alimentação da tilápia *Oreochromis niloticus* sem qualquer perda em seu desempenho de crescimento. Olvera-Novoa et al. (1990) relataram que a alfafa pode substituir até 35% da proteína da farinha de peixe da dieta sem afetar o crescimento de alevinos de tilápia *Oreochromis mossambicus*.

Considerando que *M. sativa* é rica em nutrientes e apresentou alguns resultados promissores na alimentação de peixes, espera-se que esta possa auxiliar no crescimento de juvenis de moluscos bivalves. Vieira et al. (2021), demonstraram que é possível alimentar moluscos bivalves com alfafa em pó, visto que essa versão possui uma granulose média adequada ( $3,96 \pm 2,81 \mu\text{m}$ ) para a alimentação destes animais, tornando-se uma opção viável para várias espécies.

A substituição de total ou parte das microalgas por uma alternativa inerte e/ou de baixo custo, pode acarretar na diminuição dos custos de produção de juvenis em laboratório, permitindo assim que uma maior quantidade destas seja produzida. Nessa perspectiva, o desenvolvimento de dietas artificiais para espécies aquáticas comerciais é um tema de pesquisa de grande relevância devido ao impacto sanitário e econômico na aquicultura (BUJAN-LÓPEZ, 2003; JONES, 1998).

Alguns estudos foram realizados destacando a importância dos ácidos graxos poliinsaturados na dieta de moluscos bivalves, como o desenvolvido por Delaunay et al. (1993), os quais demonstraram que o crescimento, a sobrevivência e a metamorfose da vieira, *Placopecten maximus*, dependem de um equilíbrio delicado entre as quantidades dietéticas de DHA e EPA. Rico-Villa et al. (2006) também demonstraram que os ácidos graxos poliinsaturados da família n-3 são importantes para a sobrevivência e crescimento larval de *C. gigas*. Além disso, observou-se que o ácido araquidônico (ARA; 20: 4n-6) pode influenciar no crescimento e sobrevivência durante os estágios larval e pós-larval de *Argopecten irradians* (MILKE; BRICELJ; PARRISH, 2006) e *Placopecten magellanicus* (PERNET; BRICELJ; PARRISH, 2005). Wikfors et al. (1996) concluíram que os altos teores de ácidos graxos totais da microalga *Tetraselmis* spp. influenciou positivamente no crescimento de juvenis de *C.*

*virginica* e Langdon e Waldock (1981) também demonstraram que a adição de DHA na dieta de juvenis de *C. gigas* promoveu um efeito positivo em seu crescimento.

O óleo de peixe derivado de tecidos oleosos de peixes compreende ácidos graxos ômega-3, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (FERDOSH et al., 2015; PIKE; JACKSON, 2010). De acordo com HASHIM et al. (2021), o atum é uma das fontes mais comuns de ômega-3 e uma das maiores fontes de óleo de peixe em todo o mundo. O óleo de peixe pode ser obtido através de carne fresca e também subprodutos do peixe, como cabeças, vísceras, armações, peles, sangue e outras partes não utilizadas do peixe (ŠIMAT, et al., 2019). Šimat, et al. (2019) observaram que óleo de peixe extraído de subprodutos do atum resultou na presença de DHA (30%), EPA (40%), ácido oleico (14%) e ácido palmítico (1%). Os subprodutos podem oferecer uma fonte alternativa para a produção de óleo de peixe, além de melhorar a gestão de resíduos e preservar os sistemas ecológicos do atum (HASHIM et al., 2021).

Neste contexto, é interessante avaliar outros ingredientes com potencial para a nutrição de moluscos bivalves. A alfafa *Medicago sativa* é uma interessante opção devido ao seu valor nutricional (FIORENTINI; GALOPPINI, 1981) e o óleo de peixe também, devido seu teor de ácidos graxos (FERDOSH et al., 2015; PIKE; JACKSON, 2010).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a substituição da dieta de juvenis de *P. perna*, *M. mactroides* e *V. philippinarum*, bem como, analisar a substituição e suplementação da dieta de juvenis de *C. gigas* e *C. gasar*.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o crescimento e sobrevivência com a utilização de cloroplasto de alfafa em pó na alimentação de juvenis das espécies *P. perna*, *M. mactroides* e *V. philippinarum*.

Avaliar o crescimento e sobrevivência com a utilização de cloroplasto de alfafa em pó e óleo de peixe na alimentação de juvenis das espécies *C. gigas* e *C. gasar*.

## 1.2 ESTRUTURA DA TESE

Na presente tese, os artigos científicos contaram com a colaboração de pesquisadores da *Oregon State University* dos Estados Unidos. Foram realizados experimentos avaliando os efeitos do crescimento e sobrevivência utilizando substituições parciais e totais de uma dieta de microalgas vivas por alfafa em pó para juvenis de mexilhões (*P. perna*) e dos moluscos de areia (*M. mactroides* e *V. philippinarum*). Além disso, foram investigados os efeitos do crescimento e sobrevivência utilizando substituições parciais e totais de uma dieta de microalgas vivas por alfafa em pó e a suplementação com óleo de peixe de resíduos de atum na alimentação de juvenis de *C. gigas* e *C. gasar*, em laboratório. Os experimentos do capítulo II com as espécies *P. perna* e *M. mactroides* foram realizados no Brasil, enquanto com a espécie *V. philippinarum* foi realizado por pesquisadores parceiros nos Estados Unidos. Os experimentos com *C. gigas* e *C. gasar* foram realizados no Brasil.

A tese foi estruturada em três partes: uma introdução geral e dois capítulos, organizados da forma descrita abaixo:

**Capítulo I** – Introdução geral apresentando a contextualização do tema e objetivos.

**Capítulo II** – Artigo científico intitulado “Substituição de microalgas vivas por produtos de alfafa nas dietas do mexilhão marrom (*Perna perna*), marisco branco (*Mesodesma mactroides*) e o molusco de areia Manila clam (*Venerupis philippinarum*)”. O artigo aborda o efeito da substituição parcial e total da dieta de microalgas vivas pela alfafa em pó no crescimento e sobrevivência dessas espécies em laboratório. Artigo publicado na revista *Aquaculture nutrition* (<https://doi.org/10.1111/anu.13364>).

**Capítulo III** – Artigo científico intitulado “Utilização de alfafa e óleo de peixe na alimentação de juvenis de *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar*”. O artigo avalia a viabilidade de inclusão de alfafa e suplementação com óleo de peixe de resíduos de atum na alimentação dos juvenis de *C. gigas* e *C. gasar* em laboratório. Artigo elaborado segundo as normas da revista *Aquaculture Nutrition*.

## 2. ARTIGOS

### 2.1 ARTIGO 1

Substituição de microalgas vivas por um produto de cloroplasto de alfafa seco em dietas para mexilhão marrom (*Perna perna*), marisco branco (*Mesodesma mactroides*) e Manila clam (*Venerupis philippinarum*)

Produto de alfafa em dietas para mexilhões e moluscos de areia

**Graziela Cleuza Vieira<sup>1</sup>, Matt Hawkyard<sup>2</sup>, Chris Langdon<sup>2</sup>, Simone Sühnel<sup>1</sup>, Bianca Maria Scaranto<sup>1</sup>, João Paulo Ramos Ferreira<sup>1</sup>, Carlos Henrique Araújo de Miranda Gomes<sup>1</sup>, Louis P. Vézina<sup>3</sup>, Claudio Manoel Rodrigues De Melo<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Moluscos Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88061-600, Brasil.

<sup>2</sup> Department of Fisheries and Wildlife, Coastal Oregon Marine Experiment Station, Hatfield Marine Science Center, Oregon State University, 2030 SE Marine Science Drive, Newport, OR 97365, USA.

<sup>3</sup> Virentia, Maguire, Québec, Canada.

\* Endereço de e-mail do autor correspondente: claudio.melo@ufsc.br (C.M.R. De Melo)

#### **Abstract**

Owing to its high nutritional value and widespread availability, the legume alfalfa *Medicago sativa* (Linnaeus 1753) is a possible feed for aquatic animals. In this study, a dried alfalfa chloroplast (DAC) product supplied by Virentia Inc., Quebec, Canada, was evaluated as a partial or total replacement for live microalgae (LM) in diets for juveniles of *Perna perna* and the *Mesodesma mactroides* – two species with high aquaculture potential in Brazil. In addition, trials were conducted with *Venerupis philippinarum*, a species commonly used in global aquaculture. Nine diets containing different ratios (based on dry weight) of live microalgae (*Chaetoceros neogracile* and/or *Isochrysis galbana*) and DAC were evaluated. With all three bivalve species, additions of DAC to partial microalgal rations increased final dry and organic weights, compared with those provided with partial algal rations alone. *M. mactroides* and *P. perna* appeared to utilize DAC to a greater extent than *V. philippinarum* as indicated by the higher final organic weights obtained by these two species when larger fractions of LM were substituted with DAC. Overall, the results of this study indicate that DAC supplements can be useful in supporting mussel and clam tissue growth when algal feeds are limited or unavailable.

**Keywords:** non-algal feed; bivalve mollusk; mussel; clam; alfalfa; alternative feed

## RESUMO

Devido ao seu alto valor nutricional e ampla disponibilidade, a leguminosa alfafa *Medicago sativa* (Linnaeus 1753) é um alimento alternativo para animais aquáticos. Neste estudo, um produto de cloroplasto de alfafa seco (CAS) fornecido por Virentia Inc., Quebec, Canadá, foi avaliado como substituto parcial ou total para microalgas vivas (MV) em dietas de juvenis de *Perna perna* e *Mesodesma mactroides* - duas espécies com alto potencial na aquicultura brasileira. Além disso, os ensaios também foram conduzidos com *Venerupis philippinarum*, uma espécie comum na aquicultura mundial. Nove dietas contendo diferentes proporções (com base no peso seco) de microalgas vivas (*Chaetoceros neogracile* ou *Isochrysis galbana*) e CAS foram avaliadas. Com todas as três espécies de bivalves, as adições de CAS às dietas parciais de microalgas aumentaram os pesos secos e orgânicos finais, em comparação com aqueles que possuíam apenas quantidades parciais de microalgas vivas (MV). *M. mactroides* e *P. perna* demonstraram utilizar CAS em maior extensão do que *V. philippinarum*, conforme indicado pelos maiores pesos orgânicos finais obtidos por essas duas espécies quando porcentagens maiores de MV foram substituídas por CAS. No geral, os resultados deste estudo indicam que os suplementos de CAS podem ser úteis na assistência ao crescimento de mexilhões e moluscos de areia, quando a disponibilidade de MV é limitada ou indisponível.

**Palavras-chave:** alimentação sem algas; molusco bivalve; mexilhão; molusco; alfafa; alimento alternativo

### 2.1.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de moluscos possui grande potencial para gerar impactos ambientais positivos e benefícios nutricionais para os humanos. Cerca de 17,7 milhões de toneladas de moluscos (34,6 bilhões de dólares) são produzidos anualmente, consistindo principalmente de moluscos de areia, mexilhões e ostras (FAO, 2020). No Brasil, o estado de Santa Catarina é responsável por 98,1% da produção nacional de malacocultura de bivalves, com 20,9 mil toneladas (peso vivo) produzidas em 2017 (IBGE, 2018). O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus 1758) responde por mais da metade da produção do país com 11,9 mil toneladas produzidas em 2017, gerando uma receita de quase 10 milhões de dólares (EPAGRI, 2018).

Atualmente a malacocultura no Brasil tendem a práticas mais sustentáveis, que incluem a diversificação do número de espécies cultivadas. Entre as novas espécies potenciais para o cultivo de moluscos, o molusco *Mesodesma mactroides* (Reeve 1854; syn. *Amarilladesma mactroides*), comumente chamado de marisco branco, vem sendo estudada recentemente (PROVERBIO, 2017; SANTOS et al., 2020a; SANTOS et al., 2020b). *Mesodesma mactroides* é importante no Brasil, Uruguai e Argentina como uma pesca recreativa histórica com valor socioeconômico associado (BRAZEIRO; DEFEO, 1999; Defeo, JARAMILLO;



LYONNET, 1992; HERRMANN et al., 2011; IHERING, 1897; SHOEMAN; SCHLACHER; DEFEO, 2013). Estudos preliminares sobre o valor potencial da aquicultura desta espécie têm mostrado resultados promissores (SANTOS et al., 2020a; SANTOS et al., 2020b).

*V. philippinarum* (ADAMS; REEVE, 1850) é uma das espécies de bivalves mais cultivadas do mundo, com uma produção de 4,1 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2020). Em 2014, Manila clam representou ~ 25% da produção mundial total de moluscos (CORDERO et al., 2017). Eles demonstram potencial para aumento da produção de aquicultura e possui alto potencial para uso em sistemas de policultivo (FAO, 2018); entretanto, o aperfeiçoamento na eficiência e na manutenção de juvenis em laboratório poderia melhorar o retorno econômico.

O sucesso do cultivo de moluscos bivalves depende muito da eficiência dos *hatcheries* e dos sistemas de berçário (HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004), considerando que a alimentação pode ser um ponto crítico. O fitoplâncton é o principal alimento para os moluscos bivalves; no entanto, o comportamento alimentar e a nutrição de espécies de bivalves podem ser afetados por seu habitat infaunal ou epifaunal (BAYNE, 2017; HAWKINS; NAVARRO; IGLESIAS, 1980; PRINS, SMAAL; POWWER, 1991; PRINS; SMAAL, 1989; SMAAL; VONCK; BAKKER, 1997). As espécies infaunais apresentam maior capacidade de seleção de partículas quando comparadas às espécies epifaunais (BACON; MACDONALD; WARD, 1998).

A dieta mais comum para bivalves de larvas e juvenis é baseada em uma mistura de várias espécies de microalgas vivas que atendem às necessidades nutricionais de larvas e estágios juvenis (BROWN et al., 1997); entretanto, o alto custo e esforço técnico necessários para a produção de microalgas são gargalos para a produção de juvenis de bivalves (MULLER-FEUGA; GUÉDES; PRUVOST, 2003). Embora vários estudos tenham avaliado a suplementação (LANGDON; WALDOCK, 1981; SÜHNEL et al., 2012) ou a substituição (ADAMS; SALINAS-FLORES; LIM, 2013; LANGDON; ÖNAL, 1999; PÉREZ-CAMACHO et al, 1998; SÜHNEL et al., 2014; 2015) de microalgas vivas em dietas para moluscos bivalves, ainda há necessidade de alimentos alternativos mais baratos (LUZARDO-ALVAREZ; OTERO-ESPINAR; BLANCO-MÉNDEZ, 2010). A substituição total ou parcial de microalgas vivas por uma fonte alternativa de alimento de baixo custo pode diminuir os custos de produção em laboratório e em berçários, resultando em operações comerciais mais lucrativas.

Devido ao seu alto valor nutricional (FIORENTINI; GALOPPINI, 1981) e disponibilidade, a leguminosa alfafa *Medicago sativa* (Linnaeus 1753) é uma alternativa

potencial para alimentação de animais de aquicultura. Esta planta é amplamente cultivada e possui um alto teor de proteínas com um perfil de aminoácidos equilibrado, além de conter vitaminas e carotenóides (VHANALAKAR; MULEY 2015).

Por se tratar de um ingrediente rico em proteínas, a alfafa já foi testada em rações para peixes. Por exemplo, Ali et al. (2003) demonstraram que a inclusão de até 5% de farelo de alfafa pode ser usada em dietas para alevinos da tilápia *Oreochromis niloticus* sem qualquer perda no desempenho de crescimento. Olvera-Novoa et al. (1990) relataram que a alfafa pode substituir até 35% da proteína da farinha de peixe da dieta sem afetar o crescimento de alevinos *Oreochromis mossambicus*. Apesar dessas descobertas, não se sabe sobre os efeitos da alfafa na alimentação de moluscos.

No presente estudo, relatamos os efeitos das substituições parciais e totais de uma dieta de microalgas vivas por um concentrado de cloroplasto de alfafa desidratado (Virentia Inc.) no crescimento de mexilhões juvenis (*P. perna*) e moluscos de areia (*M. mactroides* e *V. philippinarum*).

## 2.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### ORIGEM DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo, juvenis de *P. perna* foram adquiridos na Praia da Daniela, Florianópolis, Santa Catarina (27 ° 26'37,2 "S e 48 ° 31'26,3" O), onde foram colhidos por pescadores locais. Juvenis de *M. mactroides* foram produzidos no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, seguindo o método de Santos et al. (2020b). As alturas médias iniciais da concha dos juvenis de *P. perna* e *M. mactroides* utilizadas neste estudo foram  $5,5 \pm 2,0$  e  $3,5 \pm 0,5$  mm ( $n = 15$ ), respectivamente, e seus pesos vivos foram  $914 \pm 4$  e  $335 \pm 3$  mg ( $n = 405$ ), respectivamente. Juvenis de moluscos de areia de Manila (*V. philippinarum*) foram fornecidos por Taylor Shellfish (Kona, HI) e tinham 0,6-1 mm de altura da concha.

## DESENHO EXPERIMENTAL E DIETAS

A produção de CAS é baseada em uma nova abordagem para processar alface fresca e remover fibras e outros fatores antinutricionais potenciais; esta abordagem fornece uma fração de cloroplastos intactos com atributos físicos semelhantes aos de microalgas. Suplementos experimentais sem algas foram baseados na inclusão de cloroplasto de alface desidratado (CAS; Virentia Inc.) a 25%, 50%, 75% e 100% de substituição de uma alimentação completa composta por uma dieta de microalgas vivas (MV). Além disso, para cada nível de alimentação de reposição CAS, grupos de controle foram incluídos com bivalves alimentados apenas com alimentações parciais de algas, bem como um grupo de controle de animais não alimentados. No total, foram nove tratamentos dietéticos testados com cada espécie de bivalve. A cada tratamento foi atribuído um código referente à proporção do peso seco percentual de MV para CAS na dieta (Tabela 1).

**Tabela 1.** Lista de tratamentos dietéticos avaliados com cada espécie. A cada tratamento foi atribuído um código referente à razão percentual do peso seco de microalgas vivas (MV) para cloroplasto de alface seco (CAS) na dieta.

Tratamentos	% Microalga viva (MV)	% Cloroplasto de alface seco (CAS)
100/00	100	00
75/00	75	00
50/00	50	00
25/00	25	00
00/100	00	100
25/75	25	75
50/50	50	50
75/25	75	25
00/00	00	00

Para mexilhões e mariscos brancos, utilizamos a microalga *Isochrysis aff. galbana* (ISO) para o componente algal das dietas. Uma alimentação diária de 100% de ISO foi adicionada à 100.000 células mL<sup>-1</sup> (100/00). Para o tratamento 100% CAS (00/100), a concentração de alface adicionada foi ajustada para 2 mg L<sup>-1</sup>, que era equivalente ao peso orgânico seco de 100.000 células de ISO mL<sup>-1</sup> (LANGDON; ÖNAL, 1999). Para os moluscos de areia Manila clam, usamos uma mistura uniforme (1: 1 por concentração celular) de *Isochrysis galbana* (cepa do Caribe) e *Chaetoceros gracilis* (CG) alimentados em uma concentração total de 50.000 células mL<sup>-1</sup>. Da mesma forma, a concentração de alface adicionada foi ajustada para 1 mg L<sup>-1</sup> para o tratamento 100% CAS (00/100) no ensaio de Manila. Em todos os ensaios, as outras dietas experimentais foram formuladas como proporções dessas quantidades. As alíquotas de CAS foram pesadas e armazenadas em

recipientes hermeticamente fechados de 2 mL a 4°C para uso durante cada período experimental de sete dias. Na hora da alimentação, o pó de CAS foi hidratado e suspenso com um volume conhecido de água do mar e dado aos animais, conforme cada tratamento experimental.

Os ensaios de alimentação com mexilhões e moluscos de areia foram conduzidos em recipientes de plástico de 15 L (a unidade experimental UE). A água do mar foi filtrada (1 µm) e esterilizada por ultravioleta, com salinidade de 35 e temperatura média de  $18,8 \pm 1,7^\circ\text{C}$ . Os Manila clam foram cultivados em volumes de 5 L de água do mar filtrada com 1 µm aerada obtida de Yaquina Bay, Oregon. A temperatura da água do mar foi mantida entre 20-22°C. A água de cada UE de todos os experimentos foi renovada a cada 48 h.

Os nove tratamentos dietéticos foram distribuídos aleatoriamente em baldes e avaliados em triplicata (Tabela 1). Quinze *P. perna* mais quinze *M. mactroides* ou vinte *V. philippinarum* juvenis foram alocados aleatoriamente em cada UE. Experimentos com *P. perna* e *M. mactroides* foram conduzidos em conjunto, adicionando as duas espécies à mesma UE. Os juvenis de *P. perna* foram colocados no fundo de cada UE e os juvenis de *M. mactroides* foram mantidos em recipientes de polietileno tereftalato (PET) 4,5x14x12 cm colocados dentro da UE, que foram preenchidos com 420 cm<sup>3</sup> de areia da praia previamente esterilizada em autoclave a 120 °C por 30 minutos. Os Manila clam foram colocados em placas de PET no fundo dos recipientes de 5 L para facilitar as trocas de água. O experimento durou 21 dias para *P. perna* e *M. mactroides* e 35 dias para *V. philippinarum*.

No final do período experimental, a sobrevivência dos juvenis em cada UE foi registrada pela contagem dos animais vivos que restaram. No início dos experimentos (T0) e no final, foram determinados o peso vivo médio (PV), o peso seco (PS) e o peso orgânico (PO) dos animais sobreviventes de cada UE por tratamento. Para medições PS, juvenis vivos de cada UE foram secos em um forno a 60°C por 48 h antes da pesagem. Em seguida, os juvenis secos foram transferidos para uma mufla a 450°C por 48 h e determinados os pesos das cinzas (PC). Finalmente, PO foram calculados subtraindo PC dos valores PS para cada amostra. Todas as medidas de peso dos grupos foram obtidas pesando os grupos de animais em uma balança de precisão 0,001 g (JA3003N BioPrecisa ou Sartorius Research) e os pesos individuais foram obtidos dividindo os pesos dos grupos pelo número de animais que sobrou de cada grupo.

## CARACTERIZAÇÃO DO CLOROPLASTO DE ALFAFA SECO (CAS) E MICROALGAS VIVAS (MV)

A análise do tamanho das partículas de CAS foi realizada dispersando as partículas em água do mar filtrada e examinando as partículas de imagens digitais (câmera Lecia DFC400) obtidas com um microscópio (Leica DM1000) com uma lente objetiva x40. As imagens das partículas foram analisadas usando Image Pro Premier (versão 9.2) e software Image J (versão 1.5i).

Um ensaio de sedimentação de partículas de 24 horas foi conduzido para determinar: 1) a fração de partículas de CAS em suspensão que diminuem com o tempo como resultado da decantação; 2) a mudança no tamanho médio das partículas ao longo do tempo; e 3) perdas entre recipientes diferentes que foram aerados com uma pedra de ar (sistema aerado) ou não (sistema estático). Seis béqueres de 1 L foram enchidos com 1 L de água do mar filtrada de 1  $\mu\text{m}$  ( $\sim 20^\circ\text{C}$ , salinidade de 34). Três desses béqueres foram vigorosamente aerados com uma pedra de aeração (sistema aerado), enquanto três dos béqueres não foram aerados (sistema estático). O CAS foi adicionado a uma concentração semelhante à usada como uma alimentação completa no ensaio de alimentação de Manila (1 mg de peso orgânico  $\text{L}^{-1}$ ), o que resultou em uma concentração de partícula inicial de  $\sim 50.000$  células  $\text{L}^{-1}$ . Esta concentração de partículas foi necessária para obter densidades mensuráveis usando um hemocítmetro. As amostras de água foram retiradas com pipeta de Pasteur em 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 8 e 24 horas e colocadas em tubo de centrifugação. Dentro de uma hora da coleta, cada tubo foi então agitado em vórtice por 10 segundos e, em seguida, uma amostra fotografada digitalmente e medida usando análise de imagem conforme descrito anteriormente.

As análises da composição de ácidos graxos e aminoácidos do CAS foram realizadas no *Marine Lipid Laboratory*, Oregon State University e no *Amino Acid Laboratory*, University of California, Davis (UC Davis), respectivamente. A extração de lipídios foi realizada com base no método de Folch, Less e Sloane (1956). Os ácidos graxos foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC; Copeman et al., 2020) e as classes de lipídios foram analisadas usando um sistema Chromarod-Iatroskan baseado nos métodos desenvolvidos por Lu et al. (2008). O conteúdo e a composição de aminoácidos totais foram analisados de acordo com o método oficial da AOAC (2005) 994,12. Amostras de CAS foram hidrolisadas com ácido clorídrico (6N) em ampolas seladas ( $110^\circ\text{C}$ , 24h), secas com gás nitrogênio. As amostras contendo aminoácidos livres foram dissolvidas em ácido sulfossalicílico (3%), incubadas durante a noite à temperatura ambiente, centrifugadas e

filtradas (0,45  $\mu\text{m}$ ). Por fim, as amostras foram ajustadas para pH 2,2 e analisadas. A proteína total foi determinada a partir da soma dos aminoácidos totais (por concentração de matéria seca) excluindo a taurina.

## ANÁLISE DE DADOS

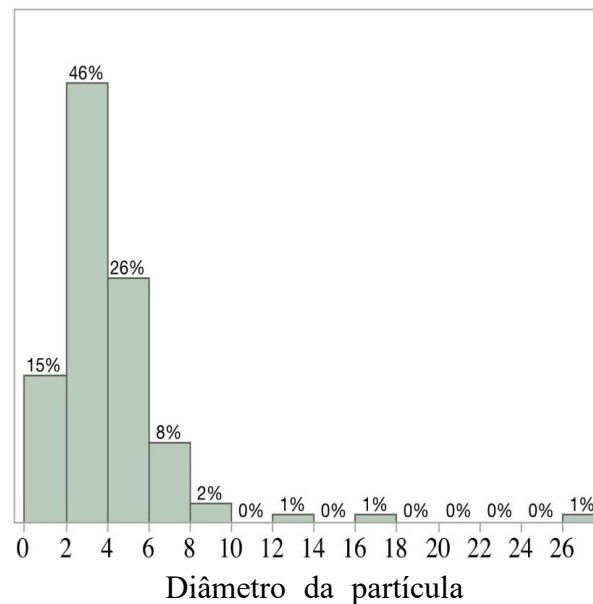
Os dados foram testados para pressupostos básicos para análise de variância (ANOVA) usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene para normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, respectivamente. O crescimento e a sobrevivência dos juvenis foram analisados usando ANOVA de duas vias com os principais efeitos 'alimentação de microalgas vivas' (MV; níveis: 0, 25, 50, 75, 100) e 'cloroplasto de alfafa seco' (CAS; níveis: 0, 1) e a interação MV x CAS para avaliar o efeito do CAS no desempenho dos bivalves. Além disso, uma ANOVA de uma via foi utilizada para analisar os efeitos dos tratamentos (Tabela 1), seguida pela comparação das médias dos tratamentos usando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A concentração de partículas e os diâmetros celulares médios em relação ao ( $\ln$ ) tempo foram avaliados por análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas usando R Studio (R Studio Team, 2020) e software JMP (v15.1.0; SAS Institute Inc.).

### 2.1.3 RESULTADOS

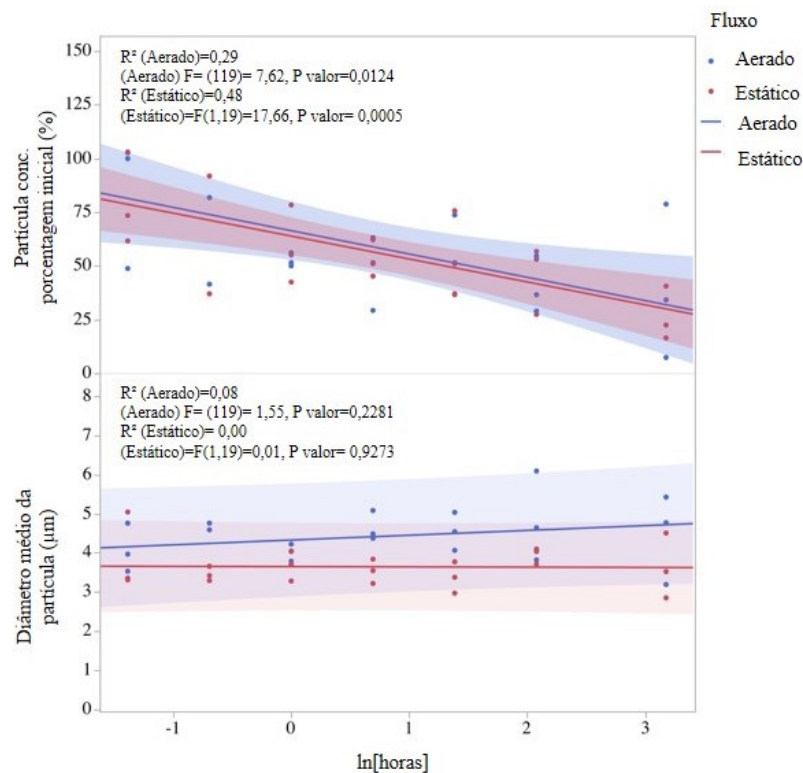
#### CARACTERÍSTICAS DO CLOROPLASTO DE ALFAFA SECO (CAS)

As partículas de cloroplasto de alfafa desidratado variaram de 0,54 a 27,0  $\mu\text{m}$  com um diâmetro médio de partícula de  $3,96 \pm 2,81 \mu\text{m}$  (Fig. 1). Noventa e sete por cento das partículas medidas tinham menos de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e deveriam ter um tamanho adequado para ingestão por juvenis das três espécies de bivalves usadas no presente estudo. Quando suspensas na água do mar, as concentrações de CAS diminuíram significativamente ao longo do tempo (análise de regressão múltipla,  $p=0,0002$ ), mas não foram afetadas pela presença ou ausência de aeração ( $p=0,777$ ) e não houve interação significativa entre tempo e aeração ( $p=0,676$ ) (Fig. 2). O tamanho médio de partícula de CAS suspensa na água não se alterou ao longo do tempo (análise de regressão múltipla  $p=0,671$ ), mas foi significativamente impactada pela aeração ( $p < 0,0001$ ) com partículas nos sistemas aerado e estático em média 4,39 e 3,68  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Não houve interação ( $p=0,516$ ) entre aeração e tempo, indicando que o tamanho médio das partículas não se alterou significativamente ao longo da duração da suspensão devido à ausência ou presença de aeração.

**Figura 1.** Histograma de distribuição de tamanho de partícula do produto CAS suspenso em água do mar filtrada (com base em 156 partículas medidas em 3 imagens diferentes tiradas com uma objetiva de 40X). Os diâmetros das partículas foram medidos a partir de imagens digitais usando o *software Image Pro e Image J*



**Figura 2.** Porcentagem das concentrações iniciais de partículas (%) e diâmetros médios de partículas ( $\mu\text{m}$ ) medidos em suspensões de 1L de cloroplasto de alfafa seco (CAS) em água do mar durante um período de 24 horas. As alíquotas foram tomadas em 0, 0,25, 0,5, 1, 2 8 e 24 horas, respectivamente. Cada alíquota foi fotografada digitalmente com um microscópio composto e medida com software de análise de imagem. Cada ponto representa o valor determinado para uma única réplica (três réplicas amostradas por ponto no tempo).



A análise centesimal indicou que o peso seco de CAS é composto por 20,7% de lipídios, 43,4% de aminoácidos totais (proteína excluindo taurina), 27,1% de carboidratos e 8% de cinzas. O conteúdo de energia das partículas CAS foi determinado como 23,1 kJ g<sup>-1</sup> (Tabela 2).

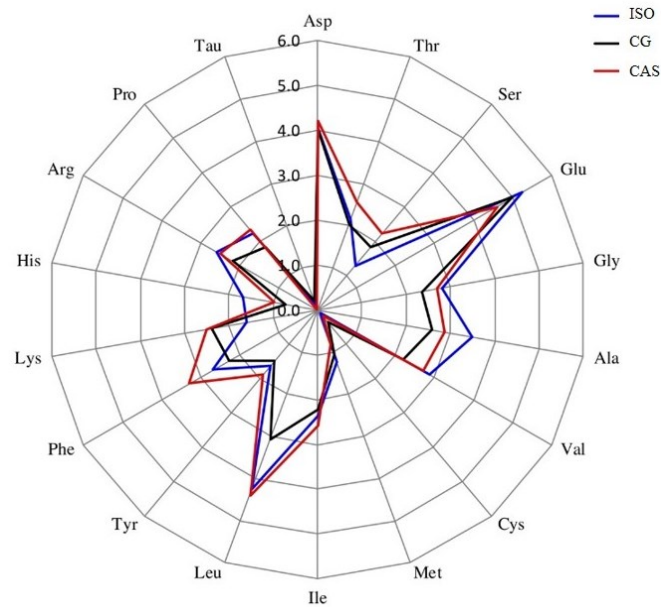
**Tabela 2.** Análise centesimal aproximada do cloroplasto de alfafa desidratado (CAS) e método de análise.

Parâmetro	Valor	Método de análise
Proteína total (%)	43,4	Soma total dos aminoácidos, excluindo taurina
Carboidrato total (%)	27,1	Peso total da amostra - (peso da proteína + peso total de lipídios + peso das cinzas) = peso estimado de carboidratos (expresso como uma porcentagem do peso total da amostra)
Lipídio total (%)	20,7	Folch (1956)
Cinzas (%)	8,0	As amostras de CAS foram adicionadas a recipientes pré-pesados, pesados e colocados em uma estufa de secagem (65°C) por 72 h. As amostras foram novamente pesadas para o cálculo dos pesos secos e posteriormente colocadas em estufa (450°C) por 24 h para obtenção dos pesos das cinzas.
Energia (kJ.g <sup>-1</sup> )	23,1	Estimado a partir das concentrações de macronutrientes medidas ou estimadas e com base em valores energéticos típicos de proteína (23,6 kJ.g <sup>-1</sup> ), lipídio (39,5 kJ.g <sup>-1</sup> ) e carboidrato (17,2 kJ.g <sup>-1</sup> ).

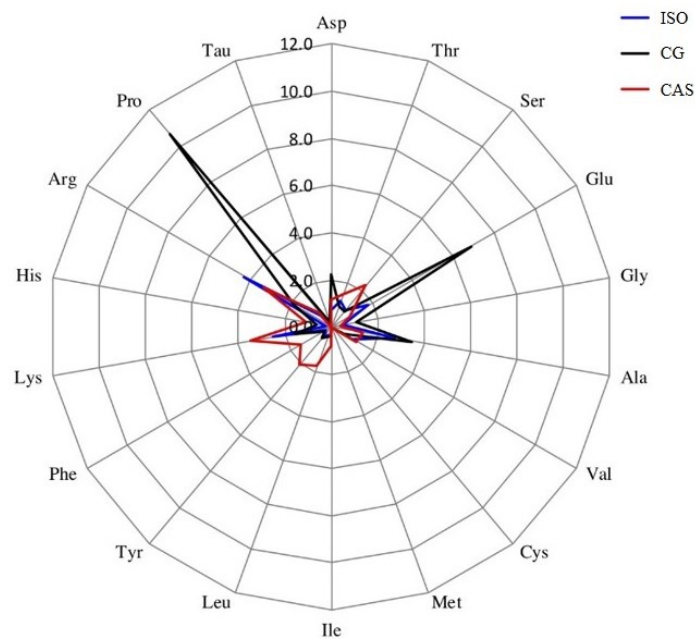
O perfil de aminoácidos total para CAS foi semelhante aos de ISO e CG (Fig. 3A) com níveis elevados (> 4%) de ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina e níveis baixos (<1%) de cisteína e taurina. Os níveis do aminoácido essencial histidina foram baixos (0,99%) em CAS e CG, mas maiores (1,69%) em ISO (Fig 3A). Houve maiores diferenças nas concentrações relativas dos aminoácidos livres com altos níveis de ácido glutâmico ( $\cong$  6,8%) e prolina (10,7%) em CG em comparação com <2% de ácido glutâmico e <1% de prolina em CAS e ISO (Fig 3B).



**Figura 3A.** Concentrações totais de aminoácidos (ácido aspártico = Asp, treonina = Thr, serina = Ser, glutamina = Glu, glicina = Gly, alanina = Ala, valina = Val, cisteína = Cys, metionina = Met, isoleucina = Ile, leucina = Leu, tirosina = Tyr, fenilalanina = Phe, lisina = Lys, histadina = His, arginina = Arg, prolina = Pro e taurina = Tau; % do conteúdo de aminoácidos total) medido em *Isochrysis galbana* liofilizada (cepa caribenha ISO; linha azul), *Chaetoceros gracilis* (CG; linha preta) ou cloroplasto de alfafa seco (CAS; linha vermelha).



**Figura 3B.** Aminoácidos livres (ácido aspártico = Asp, treonina = Thr, serina = Ser, glutamina = Glu, glicina = Gly, alanina = Ala, valina = Val, cisteína = Cys, metionina = Met, isoleucina = Ile, leucina = Leu, tirosina = Tyr, fenilalanina = Phe, lisina = Lys, histadina = His, arginina = Arg, prolina = Pro e taurina = Tau; % do conteúdo total de aminoácidos) medido em *Isochrysis galbana* liofilizada (cepa caribenha ISO; linha azul), *Chaetoceros gracilis* (CG; linha preta) ou cloroplasto de alfafa seco (CAS; linha vermelha).



As composições da classe de lipídios de CAS, ISO e CG (Tabela 3) indicaram que CAS continha mais lipídios (20,7%) do que ISO ou CG, 9,7 e 8,2%, respectivamente. Mais de 85% dos lipídios CAS e algas eram compostos por fosfolipídios, com proporções muito menores (<10%) de ácidos graxos livres e triacilgliceróis. Esteróis e ésteres de esterol estavam presentes em menos de 2% do conteúdo total de ácidos graxos.

**Tabela 3.** Composição da classe de lipídios (% de lipídios totais) e lipídios totais (mg g<sup>-1</sup>) medidos em cloroplasto de alfafa seco (CAS), *Isochrysis galbana* (cepa do Caribe; ISO) e *Chaetoceros gracilis* (CG). \* Álcoois e fosfolipídios foram combinados para ISO e CG, mas analisados separadamente para CAS.

<b>Composição da classe</b>	<b>CAS</b>	<b>ISO</b>	<b>CG</b>
Ésteres de esterol	0	0,13	0,19
Triacilgliceróis	0,19	6,34	1,19
Ácidos graxos livres	8,58	0,79	6,53
Esteróis	1,11	0,45	2,17
Fosfolipídios *	86,1	92,3	89,9
Alcoóis	3,99	-	-
PUFA (% do total de ácidos graxos)	65,9	52,4	53,5
Lípidos totais (% peso em peso com base no peso seco)	20,7	9,7	8,2

Perfis de ácidos graxos de CAS, ISO e CG (Tabela 4) mostram que 18: 3n3 (ácido linolênico) foi o ácido graxo predominante (49%) em CAS com concentrações muito baixas (<0,2%) ou ausência de n3 poliinsaturados ácidos graxos (PUFA), como araquidônico (20: 4n6), eicosapentaenóico (20:5n3) e docosahexaenóico (22: 6n3) ácidos graxos. Em contraste, 18: 3n3 estava presente em 14% em ISO e não foi detectado em CG, enquanto 20: 5n3 estava presente em 23% em CG e 22: 6n3 estava presente em 12% em ISO. O ácido araquidônico estava presente em baixas concentrações em CG (< 2%) e não detectado em ISO.

**Tabela 4.** Concentrações de ácidos graxos, relatadas como porcentagem dos ácidos graxos totais, medidas em cloroplasto de alfafa desidratado (CAS) e microalgas vivas. Amostras de microalgas foram retiradas de culturas na Oregon State University que foram usadas para os testes de mexilhões de Manila. Os ácidos graxos não foram comparados estatisticamente devido ao baixo tamanho das amostras de microalgas (n = 2). Os ácidos graxos que representavam menos de 0,1% da porcentagem do total de ácidos graxos em todas as três fontes não foram relatados.

Ácido Graxo	CAS	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Chaetoceros gracilis</i>
<b>14:0 (Ácido mirístico)</b>	0,23±0,04	15,46±0,49	9,19±1,24
<b>14:1</b>	0,32±0,11	0,66±0,38	1,01±0,01
<b>i15:0</b>	1,30±0,06	0,33±0,01	0,53±0,00
<b>15:0</b>	0,22±0,02	0,23±0,01	0,39±0,03
<b>15:1</b>	0,00±0,00	0,04±0,05	0,12±0,00
<b>i16:0</b>	0,17±0,20	0,20±0,01	0,34±0,00
<b>ai16:0</b>	2,06±0,30	1,27±0,05	1,98±0,02
<b>16:0</b>	14,17±0,36	9,32±0,30	4,76±0,30
<b>16:1ω11</b>	7,62±1,20	2,26±0,13	3,45±0,03
<b>16:1ω7 (Ácido palmitoléico)</b>	0,08±0,09	5,47±0,08	17,09±0,79
<b>i17:0</b>	2,31±0,11	0,00±0,00	2,05±0,05
<b>ai17:0</b>	0,03±0,06	0,60±0,03	0,50±0,01
<b>16:2ω4</b>	0,00±0,00	0,91±0,01	9,05±0,04
<b>17:0</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,11±0,00
<b>16:3ω4 (Ácido palmitolonolênico)</b>	0,00±0,00	0,23±0,00	15,75±0,66
<b>17:1</b>	0,00±0,00	0,24±0,01	2,68±0,06
<b>16:4ω1</b>	0,00±0,00	0,21±0,00	0,93±0,09
<b>18:0</b>	1,88±0,02	0,40±0,18	0,92±0,00
<b>18:1ω9</b>	1,85±0,39	8,52±0,05	0,22±0,01
<b>18:1ω7</b>	0,32±0,06	1,63±0,02	0,73±0,04
<b>18:2ω6</b>	16,31±0,59	5,38±0,02	0,22±0,00
<b>18:3ω6</b>	0,00±0,00	0,25±0,00	0,61±0,04
<b>18:3ω3 (α- ácido linolênico)</b>	49,04±3,62	13,64±0,04	0,00±0,00
<b>18:4ω3</b>	0,00±0,00	17,37±0,01	0,74±0,02
<b>20:0</b>	0,44±0,05	0,00±0,00	0,21±0,00
<b>20:1ω11</b>	0,00±0,00	0,96±0,00	0,00±0,00
<b>20:1ω7</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,00
<b>20:4ω6 (ARA)</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	1,25±0,06
<b>20:5ω3 (EPA)</b>	0,00±0,00	0,84±0,00	23,20±1,62
<b>22:5ω6</b>	0,00±0,00	1,36±0,05	0,00±0,00
<b>22:4ω3</b>	0,38±0,17	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>24:0</b>	1,07±0,25	0,00±0,00	0,06±0,08
<b>22:6ω3 (DHA)</b>	0,13±0,27	11,99±0,49	1,58±0,08

#### SOBREVIVÊNCIA E PESO DO MEXILHÃO PERNA PERNA

A sobrevivência de *P. perna* após 21 dias variou de 91,11 ± 7,69 a 100 ± 00%, sem diferença significativa entre as dietas testadas.

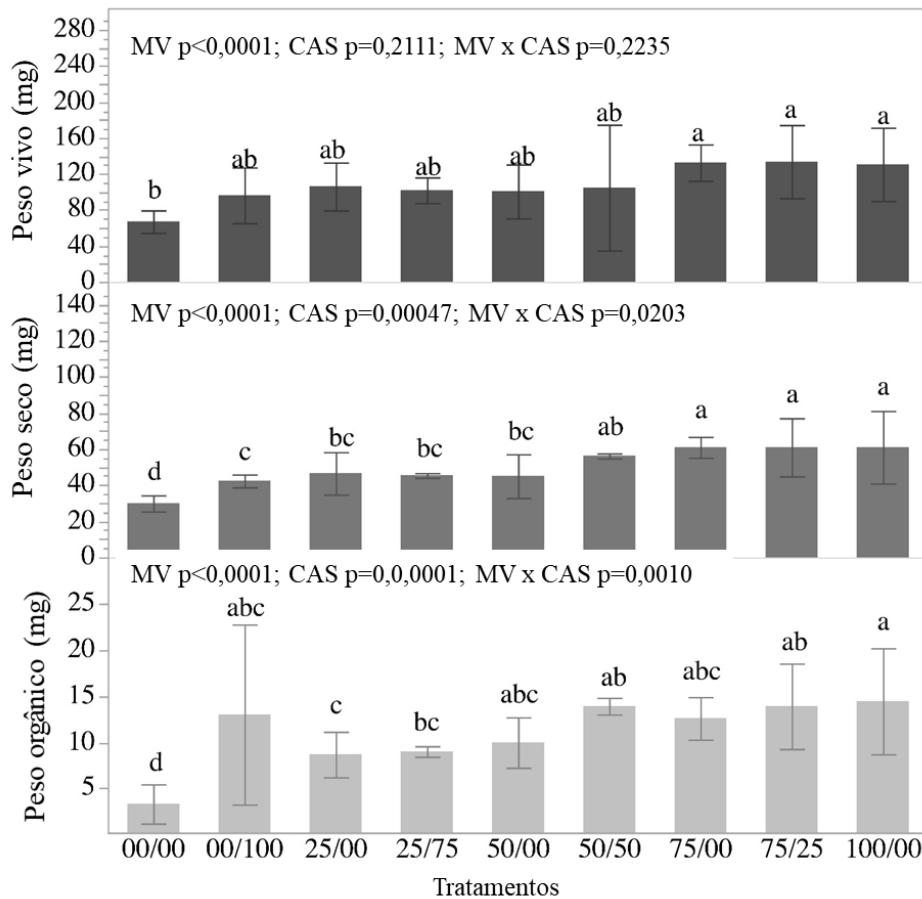
Ao final do período experimental de três semanas (T21), o PV (Fig. 4) dos juvenis variou entre 67,20 ± 5,01 e 133,78 ± 16,37 mg entre os tratamentos. Os pesos vivos dos mexilhões

foram significativamente impactados pelo efeito principal 'alimentação de microalga viva' (MV;  $p < 0,0001$ ), mas nem o efeito principal 'cloroplasto de alfafa seco' (CAS) nem a interação entre MV e CAS foram significativos ( $p = 0,2111$  e  $p = 0,2235$ , respectivamente) (Fig. 4). A única diferença no tratamento de MV para o mexilhão foi observada entre o controle de animais não alimentados 00/00 ( $67,20 \pm 5,01$  mg), que foi menor do que os mexilhões nos tratamentos 75/25 ( $133,78 \pm 16,37$  mg), 75/00 ( $132,66 \pm 8,16$  mg) e 100/00 ( $130,75 \pm 16,41$  mg).

Os valores finais de PS variaram de  $29,91 \pm 1,82$  a  $61,03 \pm 8,08$  mg entre os tratamentos. O PS do mexilhão foi significativamente impactado pelos efeitos de MV e CAS ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0047$ , respectivamente) e com PS maiores observados nos tratamentos que receberam CAS quando comparados aos que não receberam CAS. Houve também uma interação significativa entre MV e CAS ( $p = 0,0203$ ), sugerindo que as relações entre MV e PS foram impactadas pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 4). O PS dos mexilhões alimentados com uma alimentação de 100% de microalgas (100/00;  $61,03 \pm 8,08$  mg), 75/25 ( $61,00 \pm 6,47$  mg), 75/00 ( $60,92 \pm 2,31$  mg) foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aqueles alimentados com uma alimentação de somente 25% de microalgas (25/00) ( $46,55 \pm 4,72$  mg), 25/75 ( $45,42 \pm 0,52$  mg), 50/00 ( $45,03 \pm 4,87$  mg) e 100% CAS (00/100;  $42,35 \pm 1,43$  mg) dietas. Os valores de PS do grupo de controle dos animais não alimentados (00/00) foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os dos mexilhões de todos os outros tratamentos alimentares (Fig. 4).

Os valores finais de PO variaram de  $3,30 \pm 0,86$  a  $14,47 \pm 2,32$  mg entre os tratamentos. Os pesos orgânicos dos mexilhões foram significativamente impactados pelos efeitos principais MV e CAS ( $p < 0,0001$  para ambos os efeitos) com maiores PO observados nos tratamentos que receberam CAS em comparação com aqueles que não receberam CAS. Houve também uma interação significativa entre MV e CAS ( $p = 0,0010$ ), sugerindo que as relações entre MV e PO foram influenciadas pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 4). O PO dos mexilhões alimentados com dieta à base de 100% de algas (100/00) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que os de mexilhões alimentados com as dietas 25/75 ( $9,00 \pm 0,23$  mg) e 25/00 ( $8,68 \pm 0,99$  mg). Os valores de PO do grupo controle de animais não alimentados (00/00) foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os dos mexilhões alimentados com todas as outras dietas (Fig. 4).

**Figura 4.** Média dos pesos vivos, secos e orgânicos individuais finais (intervalo de confiança de  $\pm 95\%$ ;  $n = 3$ ) de mexilhões *Perna perna* para cada tratamento. A notação MV, CAS e MV x CAS denotam os efeitos principais e interativos, junto com os p-valores resultantes, da ANOVA bidirecional com modelo de interação. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unilateral;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1.



#### SOBREVIVÊNCIA E PESO DE MEXILHÕES DE MANILA *Venerupis philippinarum*

A sobrevivência de *V. philippinarum* após 35 dias variou de 95 a 100% e não diferiu entre os tratamentos.

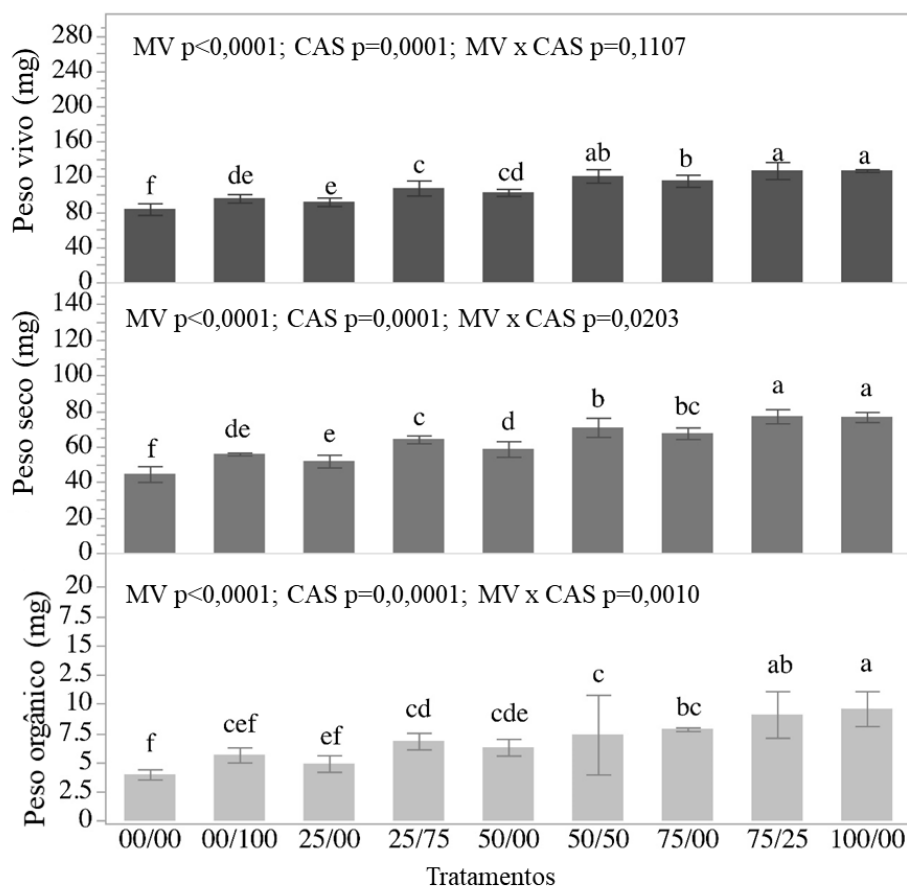
Os pesos vivos foram influenciados significativamente por MV e CAS ( $p < 0,0001$  para ambos os efeitos) os PV mais elevados foram observados nos tratamentos que receberam CAS em comparação com aqueles que não receberam CAS. Não houve uma interação significativa entre MV e CAS ( $p = 0,1107$ ), sugerindo que as relações entre MV e PV não foram afetadas pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 5).

Os valores médios de PS (Fig. 5) variaram de  $44,40 \pm 1,78$  a  $76,93 \pm 1,18$  mg entre os tratamentos. Os pesos secos foram influenciados significativamente por MV e CAS ( $p < 0,0001$  para ambos os efeitos) com PS gerais mais elevados observados nos tratamentos que receberam CAS em comparação com aqueles que não receberam CAS. Houve diferenças

significativas entre MV e CAS ( $p = 0,4994$ ), sugerindo que as relações entre MV e PS não foram afetadas pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 5). O PS de Manila clam alimentadas com a alimentação completa de migroalgas (100/00;  $76,6 \pm 1,18$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que aquelas de todos os outros tratamentos, com exceção dos animais do tratamento 75/25 ( $76,93 \pm 1,60$  mg). Notavelmente, Manila clam de todos os tratamentos com CAS, incluindo tratamentos dietéticos 75/25 ( $76,93 \pm 1,60$  mg), 50/50 ( $70,71 \pm 2,15$  mg), 25/75 ( $64,1 \pm 0,89$  mg) e 00/100 ( $55,8 \pm 0,33$  mg), apresentaram pesos secos significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que aqueles animais alimentados com as respectivas alimentações com apenas MV ou tratamentos de animais não alimentados: 75/0 ( $67,4 \pm 1,34$  mg), 50/0 ( $58,5 \pm 1,75$  mg), 25/0 ( $51,7 \pm 1,40$  mg) e 00/00 ( $44,4 \pm 1,78$  mg) (Fig. 4E). O PS de animais não alimentados (00/00;  $44,4 \pm 1,78$  mg) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que dos bivalves alimentados os tratamentos: 100/00, 75/00, 75/25, 00/100 e 50/00 (Fig. 5).

O PO médio de Manila clam variou de  $4,00 \pm 0,18$  a  $9,61 \pm 0,60$  mg entre os tratamentos. Os pesos orgânicos foram significativamente influenciados para MV e CAS ( $p < 0,0001$  para ambos) com o PO mais elevados foram observados nos tratamentos que receberam CAS quando comparados com aqueles que não receberam CAS. Não houve uma interação significativa entre MV e CAS ( $p = 0,3474$ ), sugerindo que as relações entre MV e PO não foram afetadas pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 5).

**Figura 5.** Média dos pesos vivos individuais finais, secos e orgânicos (intervalo de confiança de  $\pm 95\%$ ;  $n = 3$ ) de Manila clam *Venerupis philippinarum* para cada tratamento. A notação MV, CAS e MV x CAS denotam os efeitos principais e interativos, junto com os p-valores resultantes, da ANOVA bidirecional com modelo de interação. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unilateral;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1.



#### SOBREVIVÊNCIA E PESO DO MARISCO BRANCO *Mesodesma mactroides*

A sobrevivência de *M. mactroides* após 21 dias variou de  $84,44 \pm 10,18$  a  $97,78 \pm 3,84\%$  e não apresentou diferença entre os tratamentos.

Em T21, PV de *M. mactroides* variou de  $23,11 \pm 2,05$  a  $76,58 \pm 0,37$  mg. OS Pesos vivos foram significativamente influenciados por MV ( $p < 0,0001$ ), mas não por CAS ( $p = 0,1325$ ), no entanto, houve uma interação significativa entre MV e CAS ( $p = 0,0165$ ) sugerindo que as relações entre MV e PV foram impactados pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 6). Os valores PV para *M. mactroides* foram considerados maiores com a dieta de 100% de algas (100/00;  $76,58 \pm 3,16$  mg) e significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores em comparação com o PV de juvenis de todos os outros tratamentos (Fig. 6).

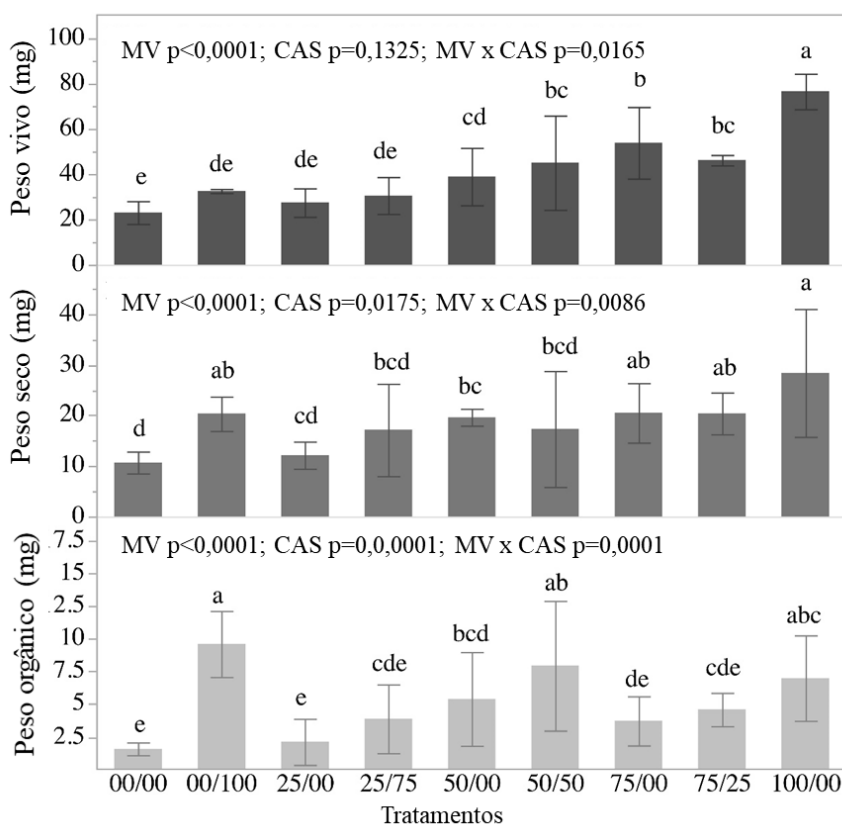
Os valores médios de PS variaram de  $10,70 \pm 0,87$  a  $28,42 \pm 5,08$  mg entre os tratamentos em T21. Os pesos secos foram significativamente influenciados por MV e CAS

( $p = 0,00175$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) com PS maiores observados nos tratamentos que receberam CAS quando comparados àqueles que não receberam CAS. Houve também uma interação significativa entre MV e CAS ( $p = 0,0086$ ), sugerindo que as relações entre MV e PS foram influenciadas pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 6). O PS dos animais com a alimentação completa de microalgas (100/00;  $28,42 \pm 5,08$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que aqueles animais alimentados com: 50/00 ( $19,64 \pm 0,68$  mg), 50/50 ( $17,30 \pm 4,61$  mg), 25/75 ( $17,15 \pm 3,67$  mg) e 25/00 ( $12,18 \pm 1,08$  mg). O PS do tratamento de controle de animais não alimentados (00/00) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que aqueles alimentados com os tratamentos: 100/00, 75/00, 75/25, 00/100 e 50/00 (Fig 6).

Os valores médios de PO variaram de  $1,59 \pm 0,19$  a  $9,60 \pm 1,01$  mg entre os tratamentos. Os pesos orgânicos foram influenciados significativamente pelos efeitos de MV e CAS ( $p < 0,0001$  para ambos os efeitos) com maiores PO observados nos tratamentos que receberam CAS em comparação com aqueles que não receberam CAS. Houve também uma interação significativa entre MV e CAS ( $p = 0,0001$ ), sugerindo que as relações entre MV e PS foram impactadas pela inclusão ou exclusão de CAS (Fig. 6). Os valores de PO não diferiram entre os tratamentos 00/100 ( $9,60 \pm 1,01$  mg), 50/50 ( $7,94 \pm 1,99$  mg) e 100/00 ( $6,99 \pm 1,31$  mg); no entanto, o PO de animais alimentados com alimentação de 100% de CAS (00/100) apresentou pesos maiores ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos animais dos tratamentos 50/00 ( $5,40 \pm 1,44$  mg), 75/25 ( $4,59 \pm 0,51$  mg), 25/75 ( $3,89 \pm 1,06$  mg), 75/00 ( $3,73 \pm 0,76$  mg) e 25/00 ( $2,12 \pm 0,71$  mg). O PO de do tratamento de controle com animais não alimentados (00/00) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que aqueles alimentados com os tratamentos: 00/100, 50/50, 100/00 e 50/00 (Fig. 6).



**Figura 6.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  95% de intervalo de confiança;  $n = 3$ ) do *Mesodesma mactroides* para cada tratamento. A notação MV, CAS e MV x CAS denotam os efeitos principais e interativos, junto com os p-valores resultantes, da ANOVA bidirecional com modelo de interação. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unilateral;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1.



## 2.1.4 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o cloroplasto de alfafa seco (CAS) pode servir como substituto parcial de microalgas vivas para o cultivo de juvenis da espécie de mexilhão epifaunal *P. perna* e dos moluscos de areia infaunais *M. mactroides* e *V. philippinarum*. No geral, quando essas espécies foram alimentadas parcialmente com microalgas vivas, seu crescimento (em termos de peso seco e orgânico) no final do estudo foi melhorado com o uso de CAS como substituto. Essas tendências sugerem que todas as três espécies foram capazes de obter nutrição do CAS; no entanto, as tendências gerais também sugeriram que *P. perna* e *M. mactroides* foram capazes de utilizar CAS em maior extensão quando representou maiores substituições fracionárias de MV (como evidenciado pela interação significativa entre MV e CAS. Em contrapartida *V. philippinarum*, demonstrou ganhos mais consistentes, porém menores no crescimento como resultado de adições de CAS a todas as alimentações parciais de MV.

O CAS poderia ser utilizado como um substituto para uma alimentação baseada em 100% MV, sem afetar significativamente os pesos secos ou orgânicos, que variou entre as espécies. *P. perna* e *V. philippinarum* puderam ser cultivadas com até 50% e 25% de substituição de mv por CAS, respectivamente, sem reduções significativas no crescimento quando comparadas às alimentações completas de MV. *Mesodesma mactroides* pode ser alimentado com até 100% CAS sem reduções significativas no peso seco ou orgânico, no entanto, este resultado não foi tão consistente entre os níveis de alimentação. Por exemplo, *M. mactroides* alimentados com 100% de CAS (00/100) apresentaram um peso orgânico médio final que era semelhante ao dos animais alimentados com a alimentação de 100% MV (100/00), entretanto esses animais apresentaram pesos orgânicos menores quando alimentados com 25/75 do que com dietas 100% MV. Além disso, a resposta de *M. mactroides* aos diferentes níveis de substituição de CAS resultou em respostas de crescimento mais variáveis em termos de peso seco e orgânico em toda a faixa de níveis de substituição. Devido à resposta de crescimento mais consistente, o CAS pode ser mais adequado como substituto parcial de algas para *P. perna* do que para *M. mactroides*.

Para *M. mactroides*, os pesos secos e orgânicos dos juvenis alimentados com 100% de CAS foram significativamente maiores do que os animais não alimentados e também daqueles alimentados com 25% de MV. O maior PO final ocorreu com uma alimentação de 100% CAS. Considerando que *M. mactroides* é uma espécie bivalve bentônica infaunal (GIANUCA, 1987), pode ser mais bem adaptado para alimentação de partículas orgânicas não vivas, como CAS, em comparação com mexilhões. Além disso, as partículas minerais ingeridas, que foram observadas nos filamentos fecais dos moluscos, podem ter facilitado a decomposição e a digestão do CAS. No molusco *Macoma balthica*, a presença de grãos de areia no trato digestivo mostrou ajudar a reduzir o tamanho das partículas ingeridas de 320 µm para 80 µm (KRINTENSEN, 1972).

Em geral, *V. philippinarum* cresceu mais quando CAS foi fornecido como um suplemento para cada uma das alimentações parciais de algas, do que aqueles alimentados com alimentações reduzidas de MV. No entanto, ao considerar todas as métricas de crescimento, apenas 25% de substituição com CAS (75/25) resultou em tamanhos de animais semelhantes no final do ensaio ao dos moluscos alimentados com 100% de MV. Esses resultados sugerem que o CAS fornece nutrição para *V. philippinarum*, mas é nutricionalmente inferior a MV. Há uma variedade de diferenças entre MV e CAS que podem explicar seus diferentes valores nutricionais, incluindo tamanho de partícula, taxa de decantação e composição de nutrientes.

A seleção do tamanho de partícula em moluscos bivalves foi descrita por muitos pesquisadores (por exemplo, WARD; SHUMWAY, 2004); por exemplo, partículas de 0,5 a 12 µm de tamanho foram preferencialmente ingeridas por larvas de *Crassostrea virginica* (BALDWIN; NEWELL, 1995) e partículas de 1,0 a 4,0 µm de tamanho foram selecionadas por *Mytilus edulis* adulto (ROSA et al., 2015). Raby et al. (1997) observaram partículas de 5 a 15 µm ingeridas pela vieira *Placopecten magellicanus* e o molusco *Mya arenaria*. Noventa e sete por cento das partículas dos cloroplastos de alfafa seco (Virentia Inc.) eram menores que 10 µm e, com base na literatura, deveriam ter um tamanho de partícula adequado para ingestão por mexilhões juvenis *P. perna* e moluscos de areia *M. mactroides* e *V. philippinarum*. Com a análise de filamentos fecais coletados de animais alimentados com dietas contendo CAS, indicou que os mexilhões e moluscos de areia ingeriram e digeriram parcialmente essas partículas. No entanto, o CAS estava sujeito a perdas, em grande parte atribuídas ao assentamento no fundo dos tanques, e apenas 50% das partículas permaneceram após 24 horas de suspensão. Essas perdas podem ter contribuído para as menores taxas de crescimento observadas em moluscos de areia e mexilhões que receberam substituições de CAS em comparação com a ração 100% MV.

Embora a utilização de produtos de alfafa não tenha sido relatada em dietas de bivalves, a farinha de alfafa foi testada como uma fonte de proteína na dieta de algumas espécies de peixes (Ali et al., 2003; CHATZIFOTIS; ESTEBAN; DIVANACH, 2006; OLVERA-NOVOA, et al., 1990; YANAR et al., 2008) e como fonte de carotenóides para melhorar a pigmentação do lagostim *Cherax quadricarinatus* (HARPAZ et al., 2002). Foi relatado que a alfafa possui uma composição de aminoácidos bem balanceada e é rica em carotenóides e carboidratos (FIORENTINI; GALOPPINI, 1981), proteína (19,80%), cálcio (17,9%), vitamina A (123 UI UI.g<sup>-1</sup>) e vitamina E (120 mg.Kg<sup>-1</sup>) (MOREIRA et al., 2007). Neste estudo, descobrimos que o CAS continha mais proteínas (43,4%) do que carboidratos (27,1%) e lipídios (20,7%). A composição total de aminoácidos foi bem balanceada e semelhante à de *I. galbana* e *C. gracilis*.

Com relação aos ácidos graxos essenciais, foi relatado que as espécies de bivalves requerem fontes dietéticas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), como o ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6n3) (CHENG et. al., 2020; FARÍAS; URIARTE, 2006; LANGDON; WALDOCK, 1981; SÜHNEL et al., 2012), ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5n3) (FARÍAS et al., 2003; SÜHNEL et al., 2012), ácido araquidônico (ARA; 20: 4n6) (PERNET; TREMBLAY, 2004) e ácido docosapentaenóico (DPA = 22: 5n6) (MILKE; BRICELJ; PARRISH, 2006; PERNET; BRICELJ; PARRISH, 2005). Além de promover o

crescimento, os PUFAs são uma fonte de energia, um componente das membranas celulares e atuam como precursores de bioquímicos envolvidos na resposta imune (FRITSCHÉ, 2006). Este é especialmente o caso dos ácidos graxos n3 EPA e DHA, cujas atividades biológicas incluem a redução da resposta inflamatória (AL-NOURI; AL-KHALIFA; SHAHIDI, 2012; CUMMING; MACFARLANE; ENGLYST, 2001; KOMPRDA, 2012).

Neste estudo, *I. galbana* foi utilizada em dietas para *P. perna* e *M. mactroides* e *C. gracilis* foi adicionada às dietas para Manila clam e ambas as algas foram combinadas com CAS. Alguns estudos mostraram que *I. galbana* é uma das melhores dietas de microalgas mono-específicas para a produção de moluscos em laboratório (ENRIGHT et al., 1986; HELM, BOURNE; LOVATELLI, 2004; RIVERO-RODRÍGUEZ; BEAUMONT; LORA - VILCHIS, 2007; TAYLOR et al., 1997). Foi relatado que *I. galbana* e *C. gracilis* são ricas em lipídios (KIM et al., 2012) e n3 PUFAs (ADARME-VEGA et al., 2012; DEVOSSET al., 2006). Neste estudo, observamos que *I. galbana* apresentou cerca de 12% de DHA e *C. gracilis* 23% de EPA (Tabela 4). Além disso, observamos que o CAS não possui esses PUFAs essenciais (PEOPLES; KOCH; SMITH, 1978) e o crescimento pobre ou inconsistente de mexilhões e moluscos de areia alimentados com alfafa pode ter sido devido a essa deficiência e além disso, o PUFAs originários das microalgas podem não ter sido suficientes para superar as deficiências do CAS.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o produto cloroplasto seco de alfafa (CAS) pode ser usado com sucesso como substituto parcial ou total de microalgas vivas na dieta de juvenis de *P. perna*, *M. mactroides* e *V. philippinarum*. No geral, encontramos pesos finais secos e orgânicos mais altos estatisticamente significativos de mexilhões e moluscos de areia juvenis quando o CAS foi adicionado a dietas parciais de MV. Esses resultados indicam que os suplementos de CAS podem ser úteis na manutenção de mexilhões e moluscos de areia juvenis quando a alimentação de microalgas é limitada ou não estão disponíveis. A utilização de CAS como um substituto parcial para MV pode fornecer um benefício econômico para cultivos em laboratório, reduzindo os custos gerais de alimentação ou aumentando a capacidade de produção, com investimentos mínimos para atender às necessidades de alimentação mais elevadas.

### 2.1.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Grant Vandenberg, Universidade Laval, Canadá, por facilitar o projeto. Além disso, agradeço a Greg Jakobs e outros da Taylor Shellfish por

fornecerem os mexilhões de Manila usados neste estudo e a Austin Williams por ajudar no experimento dos mexilhões na Oregon State University. Também gostaríamos de agradecer a Louise Coopman que realizou as análises de lipídios e ácidos graxos. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 e pela Oregon State University.

## DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Bivalves estão incluídos no filo Mollusca, e este filo não está incluído na Declaração de Ética de acordo com a legislação brasileira e internacional.

### 2.1.6 REFERÊNCIAS

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. p. 9-19. 16th ed.36, Gaithersburg, Md., USA.

ADAMS, S. L.; SALINAS-FLORES, L.; LIM, M. H. Conditioning diet of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, broodstock to improve the success of cryopreservation of oocytes. **Journal of Shellfish Research**. v. 32, p. 391-399. 2013.

ADARME-VEJA et al. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell**. 11. P. 96. 2012.

Ali, A. et al. Effect of feeding different levels of alfalfa meal on the growth performance and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings. **Asian Fisheries Science**. v. 16. p. 59-67. 2003.

AL-NOURI, D. M.; AL-KHALIFA, A. S.; SHAHIDI, F. Long-term supplementation of dietary omega-6/omega-3 ratios alters bone marrow fatty acid and biomarkers of bone metabolism in growing rabbits. **Journal of Functional Foods**. 4. p. 84-93. 2012.

BACON, G. S.; MACDONALD, B. A.; WARD, J. E. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles I. Feeding activity and selection. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 219. p. 105-125. 1998.

Bayne B. L. Feeding - Chapter 5. **Biology of Oysters: Development in Aquaculture and Fisheries Science**. Elsevier, London, UK. p. 209-329. 2017.

Baldwin, B. S.; Newell, R. I. E. Relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*). **Marine Ecology Progress Series**. v. 120. p. 135-145. 1995.

BRAZEIRO, A.; DEFEO, O. Effects of harvesting and density dependence on the demography of sandy beach populations: The yellow clam *Mesodesma mactroides* of Uruguay. **Marine Ecology Progress Series**. v.182. p. 127-135. 1999.

Brown et. al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**. v. 151. p. 315-331. 1997.

CHATZIFOTIS, S.; ESTEBAN, A. G.; DIVANACH, P. Fishmeal replacent by alfalfa protein concentrate in sharp snout sea bream *Diplodus puntazzo*. **Fisheries Science**. v. 72. p. 1313-1315. 2006.

CHENG et al. Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. **Algal Research**. v. 51. p. 102076. 2020.

COPEMAN et al. Ontogenetic patterns in lipid and fatty acid biomarkers of juvenile polar cod (*Boreogadus saida*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*) from across the Alaska Arctic. **Polar Biology**. v. 43. p. 1121–1140. 2020.

CORDERO et al. Population genetics of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) introduced in North America and Europe. **Scientific Reports**. v. 7. 39745. 2017.

CUMMING, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73. p. 415-420. 2001.

DEFEO, O.; JARAMILLO, E.; LYONNET A. Community structure and intertidal zonation of the macroinfauna on the Atlantic Coast of Uruguay. **The Journal of Coastal Research**. v. 8. p. 830-839. 1992.

DEVOS et al. Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39. p. 548-554. 2006.

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), BR, **Síntese Informativa da Maricultura 2018**. 2018.

ENRIGHT et al. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 96. p. 1–13. 1986.

FAO (2018). **The Food and Agriculture Organization (FAO)**. The state of world fisheries and aquaculture - Meeting the sustainable development goals. Rome.

FAO (2020). **The Food and Agriculture Organization (FAO)**. The state of Word Fisheries and Aquaculture - Sustainability in action. Rome.

FARÍAS et al. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. **Aquaculture**. v. 228. p. 289–305. 2003.

- FARÍAS, A.; URIARTE I. Nutrition in pectinids. In: Shumway S. E., & G. J. Parsons. **Scallops: biology, ecology and aquaculture**. Elsevier, Amsterdam. 40 - 2 ed, p. 521–542. 2006.
- FIORENTINI, R.; GALOPPINI, C. Pilot plant production of an edible alfalfa protein concentrate. **The Journal of Food Science**. v. 46. p. 1514-1520. 1981.
- FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 22. p. 497–509. 1956.
- FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annual Review of Nutrition**. v. 26. p. 45-7. 2006.
- GIANUCA, N. M. Zonação e produção nas praias arenosas do litoral sul e sudeste do Brasil: síntese dos conhecimentos. **Simpósio sobre ecossistemas da costa Sul e Sudeste Brasileiro - Academia de Ciências de São Paulo**. ed. 1. p. 313-332. 1987.
- HARPAZ et al. The effect of three carotenoid sources on growth and pigmentation of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Aquaculture Nutrition**. v. 4. p. 201-208. 2002.
- HAWKINS, A. J. S.; NAVARRO, E.; IGLESIAS, J. I. P. Comparative allometries of gut-passage time, gut content and metabolic faecal loss in *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule*. **Marine Biology**. v. 105. p. 197-204. 1980.
- HELM, M. M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. Hatchery culture of bivalves, a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization of the in the laboratory. **Marine Biology**. v. 15. p. 350-355. 2004.
- HERRMANN et al. Population structure, growth and production of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy, temperate beach in northern Argentina. **Helgoland Marine Research**. v. 65. p. 285-297. 2011.
- IHERING, H. V. A ilha de São Sebastião. *Revista do Museu Paulista*. v. 2. p. 129-216. 1897.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**. Produção Pecuária Municipal 2017. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas> (accessed 15 January 2020). 2018.
- KIM et al. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: characterization of extraction for commercial application. **Journal of the Korean society for Applied Biological Chemistry**. v. 55. p.477–483. 2018.
- KOMPRDA, T. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. **Journal of Functional Foods**. v.4. p. 25-38. 2012.
- KRISTENSEN, J. H. Structure and function of crystalline styles of bivalves. **Ophelia**. v. 10. p. 91-108. 1972.

- LANGDON, C. J.; WALDOCK, M. J. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 61. p. 431-448. 1981.
- LANGDON, C.; ÖNAL, E. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquaculture**. v. 180. p. 283-294. 1999.
- LU et al. Comparison of three microquantity techniques for measuring total lipids in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 65. p. 2233-2241. 2008.
- LUZARDO-ALVAREZ, A.; OTERO-ESPINAR, F. J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Microencapsulation of diets and vaccines for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 20. p. 277-288. 2010.
- MILKE, L. M.; BRICELJ, V. M.; PARRISH, C. C. Comparison of early life history stages of the bay scallop, *Argopecten irradians*: Effects of microalgal diets on growth and biochemical composition. **Aquaculture**. v. 260. p. 272-289. 2006.
- MOREIRA et al. Fertilidade do solo e estado nutricional da alfafa cultivada nos trópicos. **EMBRAPA Pecuária Sudeste**. São Paulo. Documentos 67. 2007.
- MULLER-FEUGA, A.; GUÉDES, R.; PRUVOST, J. Benefits and limitations of modeling for optimization of *Porphyridium cruentum* cultures in an annular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**. v. 103. p. 153-63. 2003.
- OLVERA-NOVOA, M. A.; CAMPOS, S. G.; SABIDO, M. G.; MARTÍNEZ-PALACIOS, C. A. The use of alfalfa leaf protein concentrates as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquaculture**. v. 90. p. 291-302. 1990.
- PEOPLES, T. R.; KOCH D. W.; SMITH. S. C. Relationship between chloroplast membrane fatty acid composition and photosynthetic response to a chilling temperature in four alfalfa cultivars. **Plant Physiology**. v. 61. p. 472-473. 1978.
- PÉREZ-CAMACHO et al. Effect of microalgal and inert (cornmeal and cornstach) diets on the growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L., 1767). **Aquaculture**. v. 160. p. 89-102. 1998.
- PERNET, F.; TREMBLAY, R. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 310. p. 73-86. 2004.
- PERNET, F.; BRICELJ; V. M.; PARRISH, C. C. Effect of varying dietary levels of  $\omega 6$  polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 327. p. 115-133. 2005.
- PRINS, T. C.; SMAAL, A. C. Carbon and nitrogen budgets of the mussel *Mytilus edulis* (L.) and the cockle *Cerastoderma edule* (L.) in relation to food quality. In: ROS, JD (ed.). **Topics in Marine Biology**. v. 53. P. 477-482. 1989.



PRINS, T. C.; SMAAL, A. C.; POWWER, A. J. Selective ingestion of phytoplankton by the bivalves *Mytilus edulis* (L.) and *Cerastoderma edule* (L.). **Hydrobiological Bulletin**. v. 25. p. 93-100. 1991.

PROVERBIO, C. Herramientas para el manejo de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* em condiciones experimentales. Trabajo de Conclusão de Curso – **Universidad de la República Uruguay**. 63 p. 2017.

Rabyet et al. Food-particle size and selection by bivalve larvae in a temperate embayment. **Marine Biology**. v. 127. p. 665–672. 2006.

RIVERO-RODRÍGUEZ, S.; BEAUMONT, A. R.; LORA-VILCHIS, M. C. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. **Aquaculture**. v. 263. p. 199–210. 2007.

ROSA et al. Examining the physiological plasticity of particle capture by the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.): confounding factors and potential artifacts with studies utilizing natural seston. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 473. p. 207–217. 2015.

SANTOS et al. Embryo and larval development of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854) (Mesodesmatidae) in laboratory. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 92 (suppl.1). 2020a.

SANTOS et al. Effect of salinity on embryo-larval development of yellow clam *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854) in laboratory. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 92. (2020b).

SHOEMAN, D. S.; SCHLACHER, T. A.; DEFEO, O. Climate-change impacts on sandy-beach biota: crossing a line in the sand. **Global Change Biology**. v. 20. p. 2379-2698. 2013.

SMAAL, A. C.; VONCK A. P. M. A.; BAKKER, M. Seasonal variation in physiological energetics of *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule* of different size classes. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 77. p. 817-838. 1997.

SÜHNEL et al. Effect of the fatty acid EPA and DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). **Aquaculture**. 330-333. p. 167-171. 2012.

SÜHNEL et al. Effects of astaxanthin on reproductive success in the tropical scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Shellfish Research**. v. 33. p. 89-98. 2014.

SÜHNEL et al. Effects of astaxanthin on spawning performance of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1759). **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 41. p. 345-354. 2015.

TAYLOR et al. The nutritional value of five species of microalgae for spat of the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson) (Mollusca: Pteriidae). **Asian fisheries Science**. v. 10. p. 1-8. 1997.

VHANALAKAR, S. A.; MULEY, D.V. Evaluation of *Medicago sativa* leaf powder as supplementary feed for the growth of Fish, *Cirrhinus mrigala*. **Bioscience Discovery**. 6 (1-I). 2015.

WARD, E; SHUMWAY, S. E. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 300. p. 83-130. 2004.

YANAR et al. The use of alfalfa, *Medicago sativa* as a natural carotenoid source in diets of goldfish, *Carassius auratus*. **Aquaculture**. v. 284. p. 196-200. 2008.

## 2.2 ARTIGO 2

### **Substituição de microalgas vivas por um produto de cloroplasto de alfafa seco e suplementação com óleo de peixe na dieta de ostras do gênero *Crassostrea***

**Graziela Cleuza Vieira<sup>a</sup>, Simone Sühnel<sup>a</sup>, Chris Langdon<sup>b</sup>, Matt Hawkyard<sup>b</sup>,  
Bianca Maria Scaranto<sup>a</sup>, João Paulo Ramos Ferreira<sup>a</sup>, Carlos Henrique Miranda  
Gomes<sup>a</sup>, Claudio Manoel Rodrigues De Melo<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Laboratory of Marine Mollusks, Department of Aquaculture, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88061-600, Brazil

<sup>b</sup> Department of Fisheries and Wildlife, Coastal Oregon Marine Experiment Station, Hatfield Marine Science Center, Oregon State University, 2030 SE Marine Science Drive, Newport, OR 97365, USA

\* Corresponding author e-mail address: claudio.melo@ufsc.br (C.M.R. de Melo)

## **RESUMO**

Entre os principais gargalos na produção de juvenis de moluscos bivalves estão o tempo de permanência destes no laboratório e a dependência de microalgas em sua alimentação. A produção de microalgas exige um grande esforço e alto custo de produção. Alguns ingredientes alternativos podem ser utilizados em dietas de bivalves, entre eles estão a alfafa (*Medicago sativa*) e o óleo de peixe. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das substituições parciais e totais de microalgas vivas por alfafa em pó e a suplementação com óleo de peixe em dietas tradicionais oferecidas em laboratório para juvenis ostras *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar*. Para isso, foram realizados dois experimentos, no primeiro nove dietas contendo diferentes proporções (com base no peso seco) de microalgas vivas (*Isochrysis galbana*) e cloroplasto de alfafa seco (CAS) foram avaliadas. Enquanto no segundo experimento, dezoito dietas contendo diferentes proporções (com base no peso seco) de microalgas vivas (*Isochrysis galbana*) foram substituídas por CAS e suplementadas com óleo de peixe. Observou-se que as adições de CAS às dietas contribuíram para os maiores pesos orgânicos finais para ambas as espécies e que a suplementação com óleo de peixe contribuiu para o crescimento das juvenis de ambas as espécies. No geral, os resultados deste estudo indicam que as substituições microalgas vivas por CAS e a suplementação com óleo de peixe podem ser úteis na assistência ao crescimento de ostras, quando a disponibilidade de microalgas vivas é limitada ou indisponível.

**Palavras-chave:** alimentação sem algas; ostras; bivalve; molusco; alfafa; óleo de peixe; alimento alternativo.

### 2.2.1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de moluscos com conchas no ano de 2019 foi de 17,3 milhões de toneladas, gerando uma receita de 34.600 milhões de dólares e representando 56,3% da produção marinha costeira do mundo (FAO, 2020). A ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, é uma das espécies de moluscos bivalves cultivados mais importantes mundialmente (CORPOREAU et al., 2012), tendo sido introduzida em vários países (DIEDERICH et al., 2005; MIOSSEC et al., 2009) para o cultivo, principalmente devido ao seu desempenho zootécnico.

O Brasil possui uma grande extensão litorânea, de 7.367 km (Ministério do Meio Ambiente, 2018), com regiões favoráveis para o cultivo de moluscos bivalves, sendo a ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, a espécie de ostra mais cultivada no Brasil. No ano de 2018, o estado de Santa Catarina produziu 2,2 mil toneladas dessa espécie, gerando uma receita de cerca de 6,2 milhões de dólares (EPAGRI, 2020). Além da ostra do Pacífico, a ostra nativa do mangue, *Crassostrea gasar*, vem sendo inserida gradativamente nos cultivos em áreas estuarinas brasileiras (PIE et al., 2006), principalmente nos estados do norte e nordeste do país.

O sucesso do cultivo de moluscos bivalves, depende da produção de juvenis em laboratório (*hatchery*) (HELM; BOURNE, 2004), principalmente para aquelas espécies em que a captura de juvenis no ambiente é baixa ou inexistente. No Brasil, a produção de juvenis da ostra do Pacífico é realizada exclusivamente em laboratório, enquanto juvenis de *C. gasar* podem, além de ser produzidos em laboratório, ser obtidas através da captura com coletores artificiais (TUREK et al., 2020) ou pela extração de juvenis em estoques naturais. Entretanto, para a manutenção de uma constância no cultivo dessa espécie, é importante a produção de juvenis em laboratório.

Os moluscos bivalves necessitam para seu desenvolvimento de dietas adequadas que proporcionem um bom balanceamento de nutrientes. Embora as exigências nutricionais dos moluscos bivalves sejam pouco conhecidas, sabe-se que os ácidos graxos insaturados são importantes para esses animais (KNAUER; SOUTHGATE, 1997). Entre os ácidos graxos insaturados da família n-3 (HUFA), podemos destacar para ostras, o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) e ácido docosa-hexaenóico (DHA, 22:6 n-3) (LANGDON; WALDOCK, 1981).

Diversos estudos já foram realizados com o intuito de suplementar as dietas de moluscos bivalves com ácidos graxos. Por exemplo, Langdon e Waldock (1981)

demonstraram que a deficiência de ácidos graxos insaturados (20:5 n-3 e 22:6 n-3) na alimentação de juvenis de *C. gigas*, limitou o crescimento destes. Fêmeas de *Macoma balthica* alimentadas com dietas suplementadas com PUFA apresentaram maior número e tamanho de oócitos quando comparadas aos animais com dieta sem suplementação de PUFA (HENDRIKS et al., 2003). Dietas de microalgas suplementadas com ácidos graxos favoreceram a maturação de reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* e posterior sobrevivência das larvas e juvenis (SÜHNEL et al., 2012). O óleo de peixe é uma fonte de ácidos graxos, rico em poli-insaturados n-3 LC-PUFA (TOCHER, 2015) largamente utilizada na alimentação de animais aquáticos na aquicultura.

A substituição total ou parcial das microalgas vivas por uma alternativa inerte e/ou de baixo custo, pode acarretar na diminuição dos custos de produção de juvenis em laboratório, permitindo assim que uma maior quantidade destes seja produzida. A substituição de 50% de microalgas vivas por farinha de milho, na dieta de juvenis do molusco de areia *Ruditapes decussatus* proporcionou resultados positivos em seu crescimento (PÉREZ-CAMACHO et al., 1998). Para juvenis de mexilhão, *Mytilus galloprovincialis*, Langdon e Önal (1999), verificaram que animais alimentados com a mistura de 25% de microalgas vivas e microalgas secas e 75% de microalgas secas (50:50% de *Schizochytrium* sp.: *Spirulina platensis*) cresceram mais rápido em relação aos mexilhões alimentados com uma alimentação de 100% de microalgas vivas. Carboni et al (2016) observaram que a substituição de 50% de microalgas vivas por resíduo de biodiesel, para a alimentação de juvenis de *C. gigas*, levou ao crescimento rápido e significativo, em comparação aos tratamentos controles.

O desenvolvimento de dietas artificiais para espécies aquáticas comerciais é um tema de pesquisa de grande relevância devido ao impacto sanitário e econômico na aquicultura (JONES, 1998; BUJAN-LÓPEZ, 2003). Segundo Laing (1989), uma dieta alternativa adequada para bivalves deve atender alguns requisitos importantes como o tamanho de partícula adequado, estabilidade no sistema de cultivo, digestibilidade, toxicidade nula e uma composição bioquímica que atenda às necessidades nutricionais de cada espécie. Entre os ingredientes com potencial para a nutrição de animais aquáticos estão a alfafa (*Medicago sativa*) e o óleo de peixe.

A alfafa *M. sativa* (Linnaeus 1753) é uma planta leguminosa que possui interesse na alimentação de animais na aquicultura, principalmente devido a alto valor nutricional, rica em proteínas com perfil equilibrado de aminoácidos, vitaminas e carotenoides (VHANALAKAR; MULEY, 2015) e ácidos graxos. A alfafa já foi testada na alimentação de peixes, *Oreochromis niloticus* (OLVERA-NOVOA et al., 1990) e de *Oreochromis mossambicus*

(ALI et al., 2003), proporcionando bom desempenho no crescimento de alevinos. Em moluscos, a utilização de produto de alfafa já foi testada em juvenis de mexilhão *P. perna* e dos moluscos de areia *V. philippinarum* e *Mesodesma mactroides*, os quais puderam ser cultivados com até 50%, 25% e 100% de substituição de microalgas vivas por cloroplasto de alfafa seco, respectivamente, sem reduções significativas no crescimento quando comparadas às alimentações completas de microalgas vivas (VIEIRA et al., 2021).

A suplementação e/ou substituição da dieta de microalgas de juvenis de *C. gasar*, *C. gigas* com alfafa e óleo de peixe na alimentação, ainda não foi avaliada, e pode ser uma alternativa para o enriquecimento com fontes de lipídeos na alimentação desses animais em condições controladas. Neste sentido, neste estudo foram avaliadas diferentes porcentagens de substituição da dieta de microalgas vivas com cloroplasto de alfafa seco e e adição de óleo de peixe, na forma de emulsão de lipídeos.

## 2.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DIETAS

Foram realizados dois experimentos, o primeiro para avaliar a substituição do peso seco da microalga viva (MV) com cloroplasto de alfafa seco (CAS), em quatro porcentagens (25%, 50%, 75% e 100%) e o segundo, para avaliar a substituição do peso seco da MV por CAS e a adição de óleo de peixe (OP) em três porcentagens (10%, 20% e 40%). Em ambos os experimentos foram incluídos um grupo controle com bivalves alimentados com 100% de MV e um grupo controle de animais sem alimentação. No total, foram avaliados, respectivamente, nove e dezoito tratamentos dietéticos no primeiro e segundo experimento. A cada tratamento foi atribuído um código referente à proporção de peso seco de LM para CAS e OP na dieta (Tabela 1).

Quinze juvenis de *C. gigas* e *C. gasar* foram marcados e alocados aleatoriamente em baldes de plástico de 15 L (unidade experimental UE). Os tratamentos dietéticos foram distribuídos aleatoriamente aos baldes testados em triplicata. Os experimentos duraram 21 dias (T21). As trocas de 100% de água foram realizadas a cada 48h. A salinidade da água do mar foi de 35 em ambos experimentos e a temperatura média foi  $23,7 \pm 0,8$  e  $22,1 \pm 1,1$  °C, respectivamente, no primeiro e no segundo experimento.

O cloroplasto de alfafa seco (CAS; Virentia Inc.) utilizado neste estudo foi armazenado conforme descrito por Vieira et al. (2021). O óleo de peixe (OP; Gomes da Costa) foi

fornecido as juvenis na forma de emulsão lipídica, preparada diariamente com solução de 2% goma de acácia pura em pó (Dinâmica®), homogeneizada com o óleo de peixe.

A microalga *Isochrysis aff. galbana* (ISO) utilizada para o componente algal das dietas foi cultivada em sistema semi-contínuo com meio de Conway (1 mL.L<sup>-1</sup>) (Walne, 1966). Para o tratamento 100% LM (100/00), a concentração diária adicionada de ISO foi fixada em 100.000 células mL<sup>-1</sup>. Para o tratamento 100% CAS (00/100), a concentração de alfafa foi ajustada para 2 mg L<sup>-1</sup>, que equivale ao peso seco de 100.000 células de ISO mL<sup>-1</sup> (LANGDON; ONAL, 1999). As outras concentrações dos tratamentos foram formuladas como proporções dessas quantidades. No segundo experimento, além da substituição da dieta base de juvenis de *C. gigas* e *C. gasar* por CAS, foi avaliada a suplementação de 10%, 20% e 40% com OP. A quantidade de OP foi baseada no peso seco da MV da dieta 100% MV (100/00).

**Tabela 1.** Lista de tratamentos dietéticos avaliados para cada espécie. A cada tratamento, para ambos os experimentos, foi atribuído um código referente à razão percentual do peso seco de microalgas vivas (MV) para cloroplasto de alfafa seco (CAS) e óleo de peixe (OP) na dieta.

Experimento	Tratamento	% Microalga viva (MV)	% Cloroplasto de alfafa seco (CAS)	% Óleo de peixe (OP)
Primeiro (dietas com CAS)	100/00	100	00	-
	75/00	75	00	-
	50/00	50	00	-
	25/00	25	00	-
	00/100	00	100	-
	25/75	25	75	-
	50/50	50	50	-
	75/25	75	25	-
	00/00	00	00	-
Segundo (dietas com CAS e óleo de peixe)	75/25/40	75	25	40
	75/25/20	75	25	20
	75/25/10	75	25	10
	50/50/40	50	50	40
	50/50/20	50	50	20
	50/50/10	50	50	10
	25/75/40	25	75	40
	25/75/20	25	75	20
	25/75/10	25	75	10
	100/00/40	100	00	40
	100/00/20	100	00	20
	100/00/10	100	00	10
	100/00/00	100	00	00
	00/100/40	00	100	40
	00/100/20	00	100	20
	00/100/10	00	100	10
00/100/00	00	100	00	
	00/00/00	00	00	00

## ORIGEM DOS JUVENIS

No presente estudo os juvenis de *C. gigas* e *C. gasar* foram produzidos pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os juvenis de *C. gigas* (n=405) e *C. gasar* (n=405), no início (T0) do experimento de substituição de MV por CAS (primeiro experimento), apresentaram peso fresco médio (n=15)  $37,4 \pm 0,5$  e  $52,0 \pm 3,5$  mg, respectivamente, e ambas as espécies tinham altura média de  $2,0 \pm 0,1$  mm.



No início do experimento de suplementação de dietas com óleo de peixe (segundo experimento), os juvenis apresentaram peso fresco médio (n=20) de  $23,4 \pm 0,3$  e  $29,4 \pm 0,3$  g, respectivamente, para *C. gigas* (n=1080) e *C. gasar* (n=1080) e ambas as espécies altura média  $2,0 \pm 0,1$  mm.

## ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA

Aos 21 dias de cultivo (T21), a sobrevivência dos juvenis em cada UE foi registrada pela contagem dos animais vivos. No final dos experimentos (T21), foram determinados os pesos vivos médios (PV), os pesos secos (PS) e os pesos orgânicos (PO) dos animais sobreviventes de cada UE. Para medições PS, juvenis vivos de cada UE foram desidratados em estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48h e em seguida, foram transferidos para uma mufla a  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h para determinar os pesos das cinzas (PC). Finalmente os PO foram calculados subtraindo PC dos valores PS para cada amostra. Todas as medidas de peso dos grupos foram obtidas pesando os grupos de animais em uma balança de precisão 0,001 g (JA3003N BioPrecisa ou Sartorius Research) e os pesos médios individuais foram obtidos dividindo os pesos dos grupos pelo número de animais em cada grupo.

Os dados de crescimento (PV, PS e PO) e de sobrevivência dos juvenis, foram analisados por ANOVA de um fator após verificação das pressuposições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos erros, seguida pela comparação das médias dos tratamentos usando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados foram testados para pressupostos básicos para análise de variância (ANOVA) usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene para normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, respectivamente.

### 2.2.3 RESULTADOS

#### SOBREVIVÊNCIA E PESO DA OSTRA *Crassostrea gigas* EM DIETAS COM CAS

A sobrevivência de *C. gigas* ao final do período experimental (T21) variou de  $89 \pm 1,15$  a 100%, sem diferença significativa entre as dietas testadas.

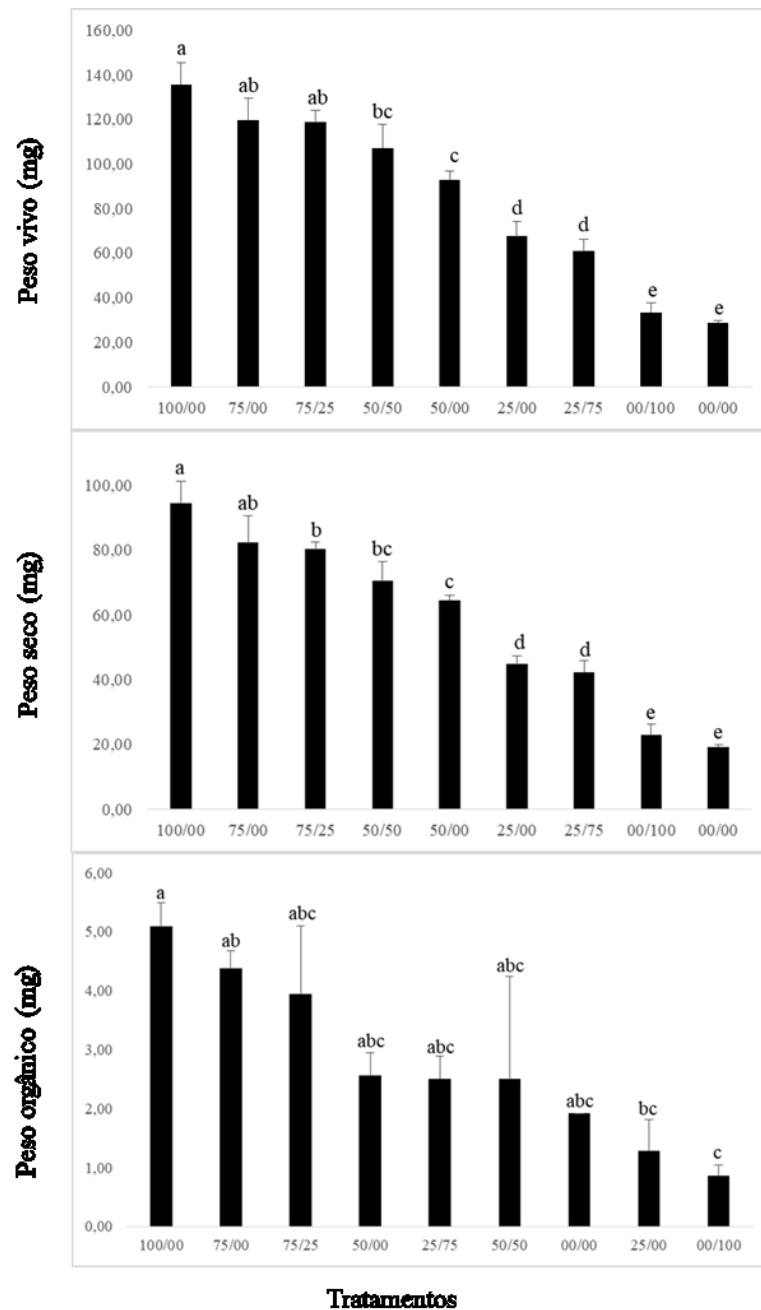
O peso vivo (PV) dos juvenis em T21, variou entre  $135,68 \pm 9,87$  e  $28,87 \pm 0,87$  mg entre os tratamentos (Fig. 1). O PV das ostras alimentadas com uma dieta com 100% de microalgas (100/00) ( $135,69 \pm 9,87$  mg), foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que daquelas alimentadas com as dietas 50/50 ( $107,29 \pm 10,31$  mg), 50/00 ( $93,02 \pm 3,91$  mg), 25/00 ( $67,54 \pm 6,69$  mg) e 25/75 ( $60,93 \pm 5,42$  mg). Os valores de PV dos animais alimentados com 100%

de CAS (00/100) ( $33,37 \pm 4,54$  mg) não diferiu do grupo controle dos animais não alimentados (00/00) ( $28,87 \pm 0,88$  mg), sendo no tratamento controle (00/00) observado o menor PV ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros tratamentos (Fig. 1).

Os valores médios de peso seco (PS) variaram de  $94,56 \pm 6,65$  a  $19,30 \pm 0,55$  mg entre os tratamentos em T21 (Fig. 1). O PS dos animais com a alimentação completa de microalgas (100/00;  $94,56 \pm 6,65$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que peso daqueles animais submetidos aos tratamentos: 75/25 ( $80,29 \pm 2,23$  mg), 50/50 ( $70,50 \pm 6,07$  mg), 50/00 ( $64,60 \pm 1,36$  mg), 25/00 ( $44,79 \pm 2,56$  mg) e 25/75 ( $42,37 \pm 3,39$  mg). Os valores de PS dos animais alimentados com 100% CAS (00/100) ( $22,99 \pm 3,21$  mg) não diferiu do grupo controle dos animais não alimentados (00/00) ( $19,30 \pm 0,55$  mg), sendo no tratamento controle (00/00) observado o menor PV ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros tratamentos (Fig. 1).

Os valores médios de peso orgânico (PO) variaram de  $50,89 \pm 4,02$  a  $8,65 \pm 1,76$  mg entre os tratamentos (Fig. 1). Os animais no tratamento com 100% CAS (00/100), apresentaram o menor valor de PO e o PO dos animais alimentados com dieta de 100% de MV (100/00) foram maiores ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos dos animais dos tratamentos 25/00 ( $12,86 \pm 5,22$  mg) e 00/100 ( $8,65 \pm 1,76$  mg) (Fig. 1). O PO dos animais do tratamento controle com animais não alimentados (00/00) não diferiram entre si e foram menores ( $p < 0,05$ ) do que os PV dos animais dos tratamentos 75/00, 75/25, 50/00, 25/75, 50/50 e 25/00 (Fig. 1).

**Figura 1.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gigas* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1.



SOBREVIVÊNCIA E PESO DA OSTRAS *Crassostrea gasar*

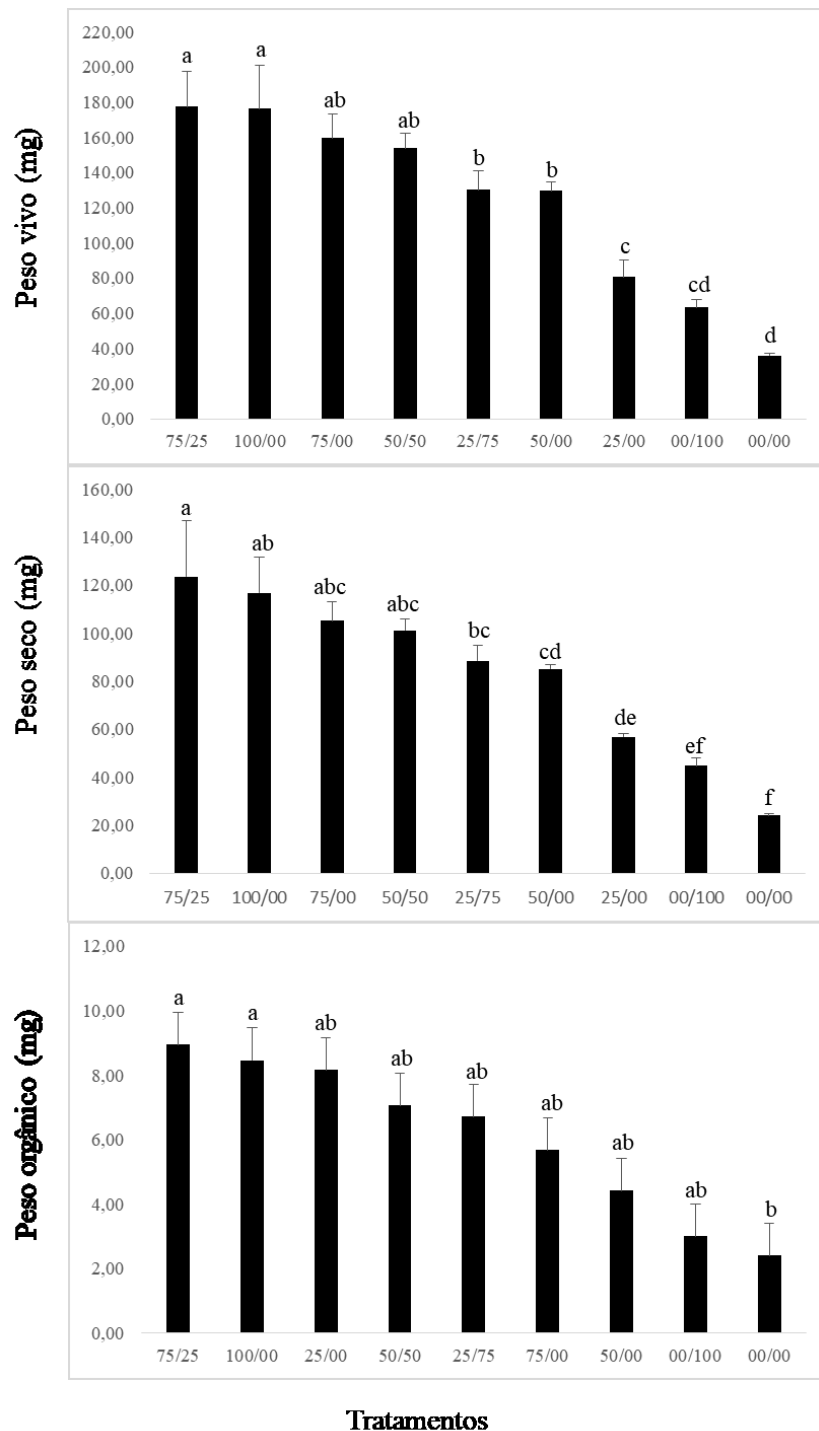
A sobrevivência de *C. gasar* ao final do período experimental (T21) variou de  $93 \pm 1,73$  a  $100 \pm 00\%$ , sem diferença significativa entre as dietas testadas.

O peso vivo (PV) dos juvenis em T21, variou entre  $177,29 \pm 20,25$  a  $35,79 \pm 13,11$  mg entre os tratamentos (Fig. 2). O PV das ostras alimentadas com a dieta 75/25 ( $177,29 \pm 20,25$  mg) e com a dieta 100/00 ( $176,37 \pm 24,73$  mg), foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aqueles alimentados com as dietas 25/75 ( $130,26 \pm 10,85$  mg), 50/00 ( $129,60 \pm 48,64$  mg) e 25/00 ( $80,63 \pm 9,89$  mg). Os valores de PV dos animais alimentados com 100% CAS (00/100) ( $63,23 \pm 4,71$  mg) e o grupo controle dos animais não alimentados (00/00) ( $35,79 \pm 4,71$  mg) foram significativamente iguais entre si e menores do que os animais de todos os outros tratamentos alimentares (Fig. 2).

Os valores médios de PS variaram de  $123,46 \pm 23,32$  a  $23,96 \pm 1,02$  mg entre os tratamentos (Fig. 1). O PS das ostras alimentadas com uma alimentação de 75% de microalgas vivas e 25% de CAS (75/25;  $123,46 \pm 23,32$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que aqueles animais alimentados com os tratamentos 25/75 ( $88,56 \pm 6,34$  mg), 50/00 ( $85,13 \pm 1,62$  mg), 25/00 ( $56,75 \pm 1,22$  mg) e 00/100 ( $44,77 \pm 3,05$  mg) (Fig. 2). Os valores de PS dos animais do grupo controle não alimentados (00/00;  $23,96 \pm 1,02$  mg) foram significativamente ( $p < 0,05$ ) menores do que os animais de todos os outros tratamentos alimentares (Fig. 2), com exceção do tratamento 100% CAS (00/100).

Os valores médios de PO variaram de  $8,95 \pm 1,72$  a  $2,41 \pm 2,15$  mg entre os tratamentos (Fig. 1). O PO de animais alimentados com 75% de MV e 25% CAS (75/25;  $8,95 \pm 1,72$  mg) e 100% MV (100/00;  $8,47 \pm 2,37$  mg) foram maiores ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos dos animais não alimentados do tratamento controle (00/00;  $2,41 \pm 2,15$ ) (Fig. 1). Os valores de PO não diferiram entre os tratamentos 25/00 ( $8,16 \pm 4,48$  mg), 50/50 ( $7,06 \pm 0,36$  mg), 25/75 ( $6,71 \pm 1,46$  mg), 75/00 ( $5,68 \pm 1,91$  mg) e 50/00 ( $4,42 \pm 0,10$  mg) (Fig. 2).

**Figura 2.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gasar* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1.



## SOBREVIVÊNCIA E PESO DA OSTRA *Crassostrea gigas* em DIETAS COM CAS E ÓLEO DE PEIXE

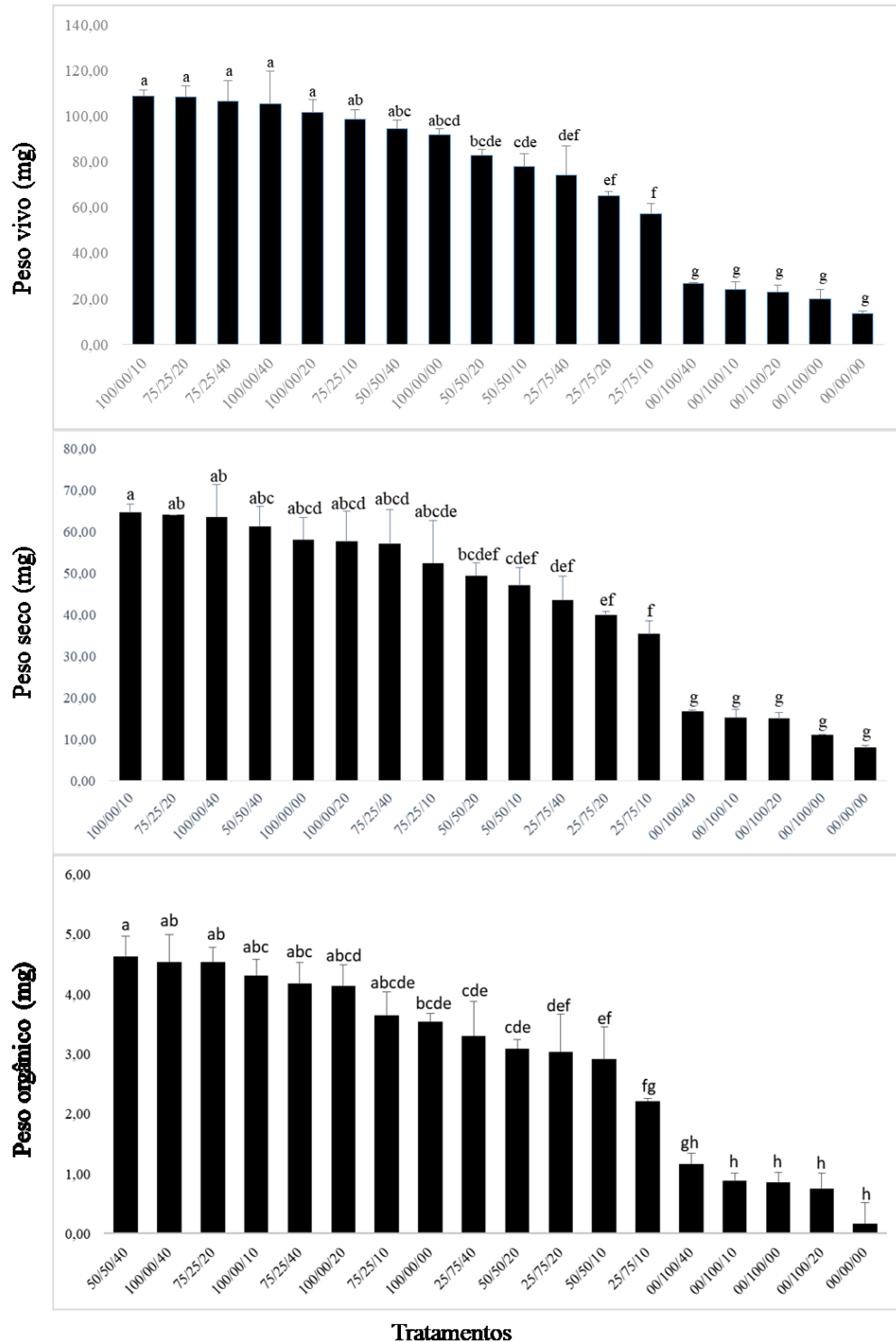
A sobrevivência de *C. gigas* ao final do período experimental (T21) variou de  $93 \pm 2,89$  a  $100 \pm 00\%$ , sem diferença significativa entre as dietas testadas.

O peso vivo (PV) dos juvenis em T21, variou entre  $108,86 \pm 26,83$  a  $13,58 \pm 12,43$  mg entre os tratamentos (Fig. 3). O PV das ostras alimentadas com uma alimentação com os tratamentos 100/00/10 ( $108,86 \pm 26,83$ ), 75/25/20 ( $108,50 \pm 46,69$ ), 75/25/40 ( $106,65 \pm 90,32$ ), 100/00/40 ( $105,58 \pm 14,33$ ) e 100/00/20 ( $101,68 \pm 5,80$ ) foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aqueles alimentados com as dietas 00/100/40 ( $26,76 \pm 0,48$ ), 00/100/10 ( $24,24 \pm 3,33$ ), 00/100/20 ( $23,19 \pm 2,87$ ), 00/100/00 ( $20,05 \pm 4,10$ ) e o grupo controle dos animais não alimentados (00/00) ( $13,58 \pm 1,24$  mg).

Os valores médios de PS variaram de  $64,63 \pm 2,04$  a  $7,96 \pm 0,61$  mg entre os tratamentos em T21 (Fig. 3). O PS dos animais com a alimentação completa de microalgas e com a adição de 10% de óleo de peixe (100/00/10;  $64,63 \pm 2,04$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que aquelas aqueles animais submetidos aos tratamentos 50/50/20 ( $49,43 \pm 2,97$  mg), 50/50/10 ( $47,04 \pm 4,33$  mg), 25/75/40 ( $43,57 \pm 5,73$  mg), 25/75/20 ( $39,85 \pm 0,98$  mg), 25/75/10 ( $35,34 \pm 3,18$  mg), 00/100/40 ( $16,67 \pm 0,37$  mg), 00/100/10 ( $15,19 \pm 2,09$  mg), 00/100/20 ( $14,97 \pm 1,53$  mg), 00/100/00 ( $11,05 \pm 0,18$  mg) e o grupo controle dos animais não alimentados (00/00/00) ( $7,96 \pm 0,61$  mg) (Fig. 3).

Os valores médios de PO variaram de  $4,62 \pm 0,33$  a  $0,17 \pm 0,34$  mg entre os tratamentos (Fig. 3). O PO das ostras alimentadas com uma alimentação de 50% de microalgas vivas, 50% de CAS e 40% de óleo de peixe (50/50/40;  $4,62 \pm 0,33$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que aqueles animais alimentados com os tratamentos 100/00/00 ( $3,53 \pm 0,14$  mg), 25/75/40 ( $3,30 \pm 0,57$  mg), 50/50/20 ( $3,08 \pm 0,15$  mg), 25/75/20 ( $3,03 \pm 0,64$  mg), 50/50/10 ( $2,91 \pm 0,05$  mg), 25/75/10 ( $2,21 \pm 0,05$  mg), 00/100/40 ( $1,16 \pm 0,18$  mg), 00/100/10 ( $0,88 \pm 0,13$  mg), 00/100/00 ( $0,85 \pm 0,18$  mg), 00/100/20 ( $0,75 \pm 0,25$  mg) e 00/00/00 ( $0,17 \pm 0,34$  mg) (Fig. 3). Os valores de PO dos animais do grupo controle não alimentado 00/00/00 e dos grupos 00/100/40, 00/100/10, 00/100/00 e 00/100/20, os quais não receberam MV, são iguais entre si e significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os animais de todos os outros tratamentos alimentares (Fig. 3).

**Figura 3.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gigas* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1.



SOBREVIVÊNCIA E PESO DA OSTRA *Crassostrea gasar*

A sobrevivência de *C. gasar* ao final do período experimental (T21) variou de  $93,33 \pm 7,63$  a  $100 \pm 00\%$ , sem diferença significativa entre as dietas testadas.

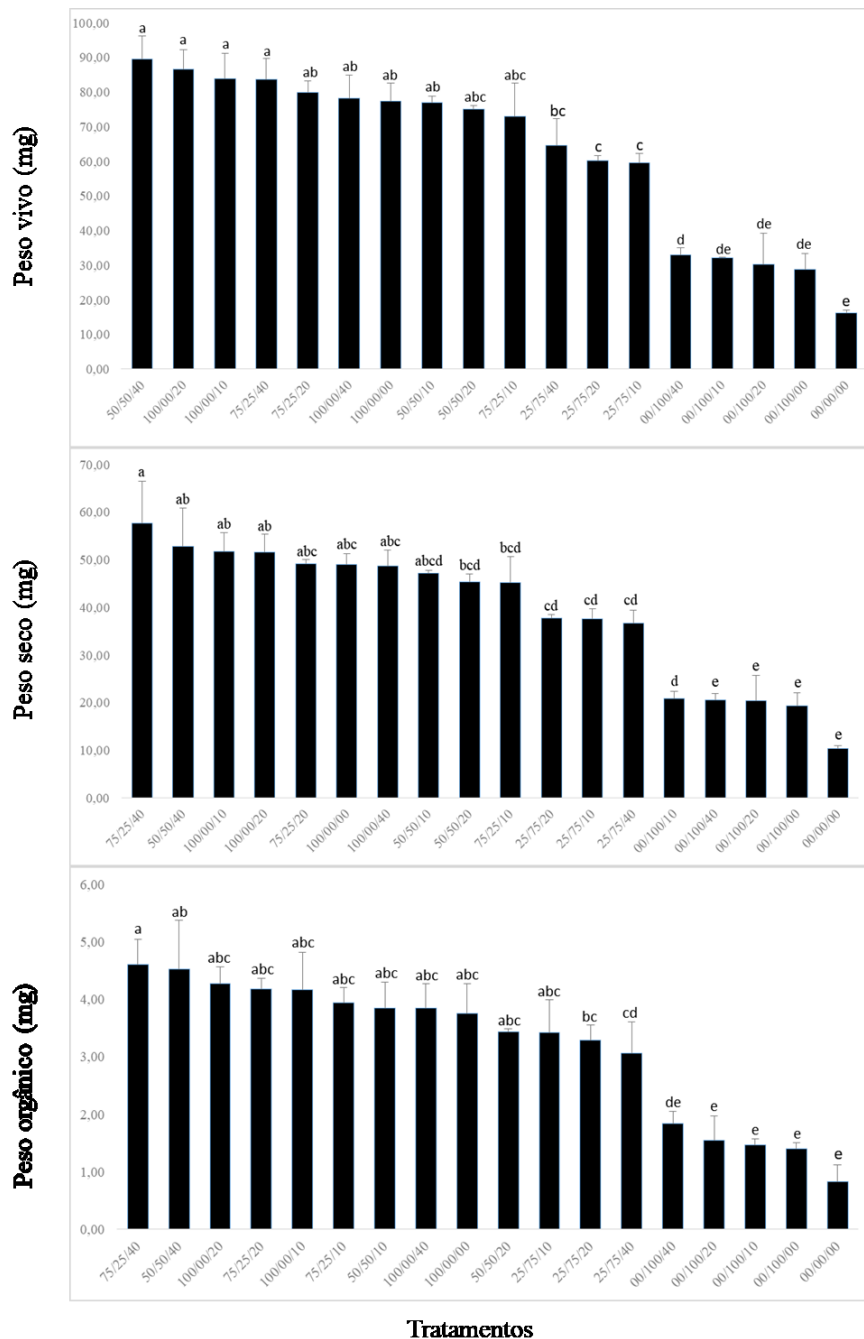
O peso vivo (PV) dos juvenis em T21, variou entre  $89,61 \pm 6,52$  e  $16,25 \pm 7,86$  mg entre os tratamentos (Fig. 4). O PV dos juvenis alimentadas com uma alimentação com os tratamentos 50/50/40 ( $89,61 \pm 6,52$  mg), 100/00/20 ( $86,58 \pm 5,72$  mg), 100/00/10 ( $83,92 \pm 7,36$  mg) e 75/25/40 ( $83,56 \pm 6,10$  mg) foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aqueles alimentados com as dietas 25/75/40 ( $64,63 \pm 7,72$  mg), 25/75/20 ( $60,12 \pm 1,59$  mg), 25/75/10 ( $59,64 \pm 26,10$  mg), 00/100/40 ( $20,05 \pm 4,10$  mg), 00/100/10 ( $32,23 \pm 28,80$  mg), 00/100/20 ( $30,21 \pm 91,24$  mg), 00/100/00 ( $28,84 \pm 4,45$  mg) e 00/00/00 ( $16,25 \pm 7,86$  mg) (Fig. 4). Os valores de PV dos animais do grupo controle não alimentado 00/00/00, e dos grupos 00/100/10, 00/100/20 e 00/100/00 são iguais entre si e significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os animais de todos os outros tratamentos alimentares (Fig. 4).

Os valores finais de PS variaram de  $57,66 \pm 8,75$  a  $10,34 \pm 0,69$  mg entre os tratamentos (Fig. 4). O PS dos juvenis submetidas ao tratamento 75/25/40 ( $57,66 \pm 8,75$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que aqueles alimentados com as dietas 50/50/20 ( $45,36 \pm 15,78$  mg), 75/25/10 ( $45,16 \pm 5,46$  mg), 25/75/20 ( $37,71 \pm 0,75$  mg), 25/75/10 ( $37,60 \pm 2,04$  mg), 25/75/40 ( $36,70 \pm 2,77$  mg), 00/100/10 ( $20,87 \pm 1,57$  mg), 00/100/40 ( $20,57 \pm 1,41$  mg), 00/100/20 ( $20,36 \pm 5,39$  mg), 00/100/00 ( $19,40 \pm 2,59$  mg) e o grupo controle dos animais não alimentados (00/00) ( $10,34 \pm 0,69$  mg). Os valores de PV dos animais do grupo controle (00/00/00) dos animais não alimentados com MV, (00/100/10, 00/100/40, 00/100/20 e 00/100/00) são iguais entre si e significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os animais de todos os outros tratamentos alimentares (Fig. 4).

Os valores médios de PO variaram de  $4,60 \pm 0,44$  a  $0,83 \pm 0,29$  mg entre os tratamentos (Fig. 4). O PO das ostras alimentadas com uma alimentação de 75% de microalga viva, 25% de CAS e 40% de óleo de peixe (75/25/40;  $4,60 \pm 0,33$  mg) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que aqueles animais alimentados com os tratamentos 25/75/20 ( $3,28 \pm 0,27$  mg), 25/75/40 ( $3,06 \pm 0,05$  mg), 00/100/40 ( $1,83 \pm 0,22$  mg), 00/100/40 ( $1,83 \pm 0,22$  mg), 00/100/20 ( $1,54 \pm 0,43$  mg), 00/100/10 ( $1,46 \pm 0,10$  mg), 00/100/00 ( $1,40 \pm 0,10$  mg) e 00/00/00 ( $0,83 \pm 0,29$  mg) (Fig. 4). Os valores de PO dos animais do grupo controle dos animais não alimentados com MV (00/00/00 e 00/100/20, 00/100/10 e 00/100/00, respectivamente) são iguais entre si e significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os animais de todos os outros tratamentos alimentares (Fig. 4).



**Figura 4.** Média dos pesos individuais vivos, secos e orgânicos finais ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos juvenis da ostra *Crassostrea gasar* para cada tratamento. O eixo X representa a porcentagem de uma alimentação diária completa que foi fornecida aos juvenis como microalgas vivas e é expresso como a “adição de microalgas vivas como uma porcentagem da alimentação completa (%)”. As letras acima das barras do histograma que não são compartilhadas indicam tratamentos que são significativamente diferentes em cada gráfico (Tukey-HSD; ANOVA unifatorial;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos são definidos na Tabela 1.



## 2.2.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o cloroplasto de alfafa seco (CAS) pode ser uma alternativa para a substituição parcial de microalgas vivas e o óleo de peixe uma interessante

opção para suplementar a dieta de ostras juvenis das espécies *C. gigas* e *C. gasar*. Observou-se que a oferta de CAS como substituto parcial de microalgas vivas nas dietas possibilitou o crescimento em termos de peso seco e orgânico dos juvenis das ostras. Além disso, a adição de óleo de peixe, em algumas dietas, demonstrou que os pesos secos e orgânicos de ambas as espécies foram semelhantes aos animais alimentados com a dieta tradicional de 100% de microalgas vivas (MV). Essas observações sugerem que, aparentemente, os juvenis de *C. gigas* e *C. gasar* apresentaram a capacidade de utilizar o CAS e o óleo de peixe como nutrientes em sua dieta.

O CAS pode ser utilizado como um substituto para uma alimentação baseada em 100% MV, sem afetar significativamente os pesos secos ou orgânicos. Os juvenis de *C. gigas* e *C. gasar* puderam ser mantidos com até 50% e 25% de substituição de MV por CAS, respectivamente, sem reduções significativas no crescimento quando comparadas às alimentações completas de MV, como foi observado também por Vieira et al. (2021) para as espécies de moluscos bivalves *Perna perna*, *Venerupis philippinarum* e *Mesodesma mactroides*. Os animais de ambas as espécies que receberam a suplementação com óleo de peixe apresentaram os maiores pesos secos e orgânicos finais. A adição de óleo de peixe nas dietas contendo 50% e 25% de CAS influenciou no aumento dos pesos vivos, secos e orgânicos dos juvenis de *C. gasar*, indicando que o óleo de peixe contribuiu com a produção de concha.

Foi possível observar, por exemplo, que animais alimentados com maiores concentrações de MV (100/00 e 75/00) no primeiro experimento apresentaram os maiores pesos secos. Enquanto no segundo experimento o acréscimo do óleo de peixe na dieta com 50% de CAS (50/50/40) e 25% (75/25/20), permitiu que os pesos secos dos juvenis de *C. gigas* fossem significativamente iguais aos de animais alimentados com 100% de MV. Esses resultados demonstram que a dieta alternativa, com substituição de MV por CAS em conjunto com suplementação com óleo de peixe, influenciou no crescimento da concha dos juvenis de *C. gigas* no período de 21 dias. Assim como *C. gigas*, *C. gasar* também pode ser alimentada com 25% e 50% CAS sem reduções significativas em seus pesos secos e orgânicos. A adição de óleo de peixe na dieta de juvenis de *C. gasar* não influenciou em seu crescimento quando comparados aos tratamentos sem suplementação. *Crassostrea gasar* possui o habitat típico de regiões de manguezais (VARELA et al., 2007) e essa zona possui uma grande diversidade de alimentos, essa prerrogativa pode explicar a boa aceitação de 50% de substituição MV por CAS que manteve os pesos secos e orgânicos iguais significativamente aos animais

alimentados com 100% MV. Esses resultados sugerem que a dieta alternativa, substituição de MV por CAS, foi eficaz no crescimento dos juvenis de *C. gasar* durante o período de 21 dias.

A farinha de alfafa foi testada como uma fonte de proteína na dieta de algumas espécies de peixes (ALI et al., 2003; CHATZIFOTIS; ESTEBAN; DIVANACH, 2006; OLVERA-NOVOA et al., 1990; YANAR et al., 2008) e como fonte de carotenóides para melhorar a pigmentação do lagostim *Cherax quadricarinatus* (HARPAZ et al., 2002). Além disso, a utilização de alfafa foi relatada por Vieira et al. (2021) para moluscos bivalves e observou-se que esse ingrediente alternativo pode ser utilizado com sucesso como substituto parcial ou total de microalgas vivas na dieta de juvenis de *P. perna*, *M. mactroides* e *V. philippinarum*. A alfafa possui uma composição de aminoácidos bem balanceada e é rica em carotenóides e carboidratos (FIORENTINI; GALOPPINI, 1981), proteína (19,80%), cálcio (17,9%), vitamina A (123 UI UI.g<sup>-1</sup>) e vitamina E (120 mg.Kg<sup>-1</sup>) (MOREIRA, et al., 2007). O CAS utilizado nesse estudo, continha mais proteínas (43,4%) do que carboidratos (27,1%) e lipídios (20,7%) e a composição total de aminoácidos foi bem balanceada e semelhante à de *I. galbana* (VIEIRA et al., 2021).

A microalga *I. galbana* foi utilizada em dietas para *C. gigas* e *C. gasar* foi adicionada às dietas combinada com CAS. Alguns estudos mostraram que *I. galbana* é uma das melhores dietas de microalgas monoespecíficas para a produção de moluscos em laboratório (ENRIGHT et al., 1986; HELM; BOURNE; LOVATELLI, 2004; RIVERO-RODRÍGUEZ; BEAUMONT; LORA -VILCHIS, 2007; TAYLOR et al., 1997). Foi relatado que *I. galbana* é rica em lipídios (KIM et al., 2012) e n3 PUFAs (ADARME-VEGA et al., 2012; DEVOS, et al., 2006). Vieira et al. (2021) observou-se que *I. galbana* apresenta cerca de 12% de DHA. Além disso, foi relatado que o CAS não possui esses PUFAs essenciais (VIEIRA et al., 2021). Assim o crescimento pobre ou inconsistente das espécies *C. gigas* e *C. gasar* com 100% de CAS pode ter sido devido a essa deficiência.

Os moluscos bivalves necessitam de fontes dietéticas contendo ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) essenciais, como o ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6n3) (CHENG et al., 2020; FARÍAS; URIARTE, 2006; LANGDON; WALDOCK, 1981; SÜHNEL et al., 2012), ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5n3) (FARÍAS et al., 2003; SÜHNEL et al., 2012), ácido araquidônico (ARA; 20: 4n6) (PERNET; TREMBLAY, 2004) e ácido docosapentaenóico (DPA = 22: 5n6) (MILKE; BRICELJ; PARRISH, 2006; PERNET; BRICELJ; PARRISH, 2005). Além de promover o crescimento, os PUFAs são uma fonte de energia, um componente das membranas celulares e atuam como precursores de bioquímicos envolvidos na resposta imune (FRITSCHÉ, 2006). O óleo de peixe (OP) é rico em EPA

(ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosapentaenóico) (BOWYER *et al.*, 2013) e a adição de 50% (50/50/40) e 25% (75/25/20) pode ter contribuído para que os pesos secos dos juvenis de *C. gigas* fossem significativamente iguais aos de animais alimentados com 100% de MV.

Os pesos finais secos e orgânicos mais altos foram observados nos juvenis que receberam dietas com adição de CAS, demonstrando que o CAS pode ser usado como substituto parcial de microalgas vivas na dieta de juvenis de *C. gigas* e *C. gasar*. Esses resultados indicam o CAS podem ser úteis na manutenção de ostras juvenis em laboratório quando a alimentação de microalgas é limitada ou não estão disponíveis. Contudo, a adição de OP na dieta composta apenas por MV não demonstraram benefício, pois as dietas suplementadas com 10 (100/00/10), 20 (100/00/20) ou 40% de OP (100/00/40) foram significativamente iguais as dietas tradicionais com apenas MV (100/00/00). A utilização de CAS como um substituto parcial para MV pode fornecer um benefício econômico para cultivos em laboratório, reduzindo os custos gerais de alimentação ou aumentando a capacidade de produção, com investimentos mínimos para atender às necessidades de alimentação mais elevadas.

### 2.2.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Grant Vandenberg, Universidade Laval, Canadá, por fornecer o CAS para o projeto. Este estudo foi financiado, em parte, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 00, pela Universidade Federal de Santa Catarina e pela Oregon State University.

### DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Bivalves estão incluídos no filo Mollusca, e este filo não está incluído na Declaração de Ética de acordo com a legislação brasileira e internacional.

### 2.2.6 REFERÊNCIAS

ADARME-VEJA *et al.* Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell**. v. 11. p. 96. 2012.

ALI *et al.* Effect of Feeding Different Levels of Alfalfa Meal on the Growth Performance and Body Composition of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings. **Asian Fisheries Science**. v. 16. p. 59 – 67. 2003.

- BOWYER, J.N.; QIN, J.G.; STONE, D.A.J. Protein, lipid and energy requirements of cultured marine fish in cold, temperate and warm water. **Reviews in Aquaculture**. v. 5. p. 10-32. 2013.
- BUJAN-LÓPEZ, M.J. Incorporación de sustancia bioactivas en sistemas microparticulares: Aplicación en acuicultura. Doctoral thesis. Faculty of Pharmacy. **University of Santiago de Compostela**. Spain. 2003.
- CARBONI, S.; CLEGG S. H.; HUGHES A. D. The use of biorefinery by-products and natural detritus as feed sources for oysters (*Crassostrea gigas*) juveniles. **Aquaculture**. v. 464. p. 392-398. 2016.
- CHATZIFOTIS, S.; ESTEBAN, A. G.; DIVANACH, P. Fishmeal replacent by alfalfa protein concentrate in sharp snout sea bream *Diplodus puntazzo*. **Fisheries Science**. 72. p. 1313-1315. 2006.
- CHENG et al. Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. **Algal Research**. v. 51. p. 102076. 2020.
- CORPOREAU et al. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Proteomics**. v. 75. p. 5554-5563. 2012.
- DEVOS et al. Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39. p. 548-554. 2006.
- DIEDERICH et al. Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers? **Helgoland Marine Research**.v. 59, p. 97-106. 2005.
- ENRIGHT et al. (1986). Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. The **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 96. p. 1–13. 1986.
- EPAGRI, 2020. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2019-2020**. Disponível em: [https://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepaa/publicacoes/Sintese\\_2019\\_20.pdf](https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepaa/publicacoes/Sintese_2019_20.pdf)
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. [s.l: s.n.].
- FIorentini, R.; GALOPPINI, C. Pilot plant production of an edible alfalfa protein concentrate. **The Journal of Food Science**. v. 46. p. 1514-1520. 1981.
- FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annual Review of Nutrition**. v. 26. P. 45-7. 1999.
- HARPAZ et al. The effect of three carotenoid sources on growth and pigmentation of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Aquaculture Nutrition**. v. 4. p. 201-208. 2002.

HELM, M. M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. Hatchery culture of bivalves, a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization of the in the laboratory. **Marine Biology**. v. 15. p. 350-355. 2004.

HENDRIKS, I. E.; VAN DUREN L. A.; HERMAN M. J. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 296. p. 199-213. 2003.

KNAUER, J.; SOUTHGATE, P. C. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. **Aquaculture**. v. 154. p. 293-303. 1997.

JONES, D. A. Crustacean larval microparticulate diets. **Reviews in Fisheries Science**. v. 6. p. 41-54. 1998.

KIMET al. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: characterization of extraction for commercial application. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**. v. 55. p. 477-483. 2012.

LAING, I. Dried algae-An alternative diet for bivalves?. **Fish Farmer**. January-February. p. 68-69. 1989.

LANGDON, C. J.; WALDOCK, M. J. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 61. p. 431-448. 1981.

LANGDON, C.; ÖNAL, E. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquaculture**. v. 180. p. 283 – 294. 1999.

MILKE, L. M.; BRICELJ, V. M.; PARRISH, C. C. Comparison of early life history stages of the bay scallop, *Argopecten irradians*: Effects of microalgal diets on growth and biochemical composition. **Aquaculture**. v. 260. p. 272-289. 2006.

MIOSSEC, L.; DEUFF, R. M., GOULLETQUER. P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). **ICES Cooperative Research Report**. v. 299. p. 42. 2009.

**Ministério do Meio Ambiente**. Brasília. Disponível em:<<https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias/noticia-acom-2018-03-2912>>. Acesso em: 15 de Setembro de 2021. BRASIL.

MOREIRA et al. Fertilidade do solo e estado nutricional da alfafa cultivada nos trópicos. **EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Paulo**, documentos 67. 2007.

OLVERA-NOVOA et al. The use of alfalfa leaf protein concentrates as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquaculture**. v. 90. p.291-302. 1990.

PEOPLES, T. R.; KOCH D. W; SMITH. S. C. Relationship between chloroplast membrane fatty acid composition and photosynthetic response to a chilling temperature in four alfalfa cultivars. **Plant Physiology**. v. 61. p. 472-473. 1978.

PÉREZ-CAMACHO et al. Effect of microalgal and inert (cornmeal and cornstach) diets on the growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L., 1767). **Aquaculture**. v. 160. p. 89–102. 1998.

PERNET, F.; TREMBLAY, R. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 310. p.73–86. 2004.

PERNET, F.; BRICELJ, V. M.; PARRISH, C. C. Effect of varying dietary levels of  $\omega 6$  polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.327. p. 115–133. 2005.

PIE et al. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rizhophorae* and *C. gigas*: Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**. v. 37. p. 1598-1600. 2006.

RIVERO-RODRÍGUEZ, S.; BEAUMONT, A. R.; LORA-VILCHIS, M. C. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. **Aquaculture**.v. 263. p. 199–210. 2007.

SÜHNEL et al. Effect of the fatty acid EPA and DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). **Aquaculture**. v.330-333. p.167-171. 2012.

TAYLOR et al. The nutritional value of five species of microalgae for spat of the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson) (Mollusca: Pteriidae). **Asian Fisheries Science**. v. 10. p. 1-8. 1997.

TURECK et al. Use of artificial collectors to obtain oyster seeds in babitonga bay, santa catarina, Brazil. **Boletim Instituto de Pesca**. v.46 (1). 1-11. 2020.

TOCHER, D. R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. **Aquaculture**. v. 449. p. 94-107. 2015.

VARELA et al. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**. v. 73(3), p. 229-234, 2007.

VHANALAKAR, S. A.; MULEY, D.V. Evaluation of *Medicago sativa* leaf powder as supplementary feed for the growth of Fish, *Cirrhinus mrigala*. **Bioscience Discovery**, 6. (1-I). 2015.

VIEIRA et al. Replacement of living microalgae with a dried alfalfa chloroplast product in diets for the Brown mussel (*Perna perna*), Yellow clam (*Mesodesma mactroides*) and Manila clam (*Venerupis philippinarum*). **Aquaculture Nutrition**. v.1-13. 2021.

WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**. v. 2. p. 1-53. 1966.

YANARET al. The use of alfalfa, *Medicago sativa* as a natural carotenoid source in diets of goldfish, *Carassius auratus*. **Aquaculture**. v. 284. p. 196-200. 2008.

### 3. CONCLUSÃO GERAL

No primeiro artigo da presente tese foi possível observar que o produto cloroplasto seco de alfafa (CAS) pode ser usado com sucesso como substituto parcial ou total de microalgas vivas na dieta de juvenis de *P. perna*, *M. mactroides* e *V. philippinarum*.

No segundo artigo foi demonstrado que o cloroplasto seco de alfafa (CAS) pode ser usado como substituto parcial de microalgas vivas na dieta de juvenis de *C. gigas* e *C. gasar*, visto que juvenis que apresentaram pesos finais secos e orgânicos mais altos foram aqueles os quais o CAS foi adicionado a dietas parciais de MV. Além disso, a adição de OP na dieta composta apenas por MV não demonstraram benefício, pois as dietas suplementadas com 10, 20 ou 40% de OP foram significativamente iguais as dietas tradicionais com apenas MV.

Esses resultados indicam que os suplementos de CAS podem ser úteis na manutenção de moluscos bivalves quando a alimentação de microalgas é limitada ou não estão disponíveis. A utilização de CAS como um substituto parcial para MV pode fornecer um benefício econômico para cultivos em laboratório, reduzindo os custos gerais de alimentação ou aumentando a capacidade de produção, com investimentos mínimos para atender às necessidades de alimentação mais elevadas.



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ADAMS, S. L.; SALINAS-FLORES, L.; LIM, M. Diet Conditioning of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Broodstock to Improve Oocyte Cryopreservation Success. **Journal of Shellfish Research**. v.32 (2). p. 391-399, 2013.
- AFINOWI, A.M. The mangrove oyster, *Crassostrea gasar* culture and potential in the Niger delta (Nigeria). Technical Paper 14. **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**, Lagos, Nigeria. 13p. 1984.
- ALBENTOSA M.; FERNANDEZ-REIRIZ M.J.; PÉREZ-CAMACHO A.; LABARTA U. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. **Journal of Marine Biology and Ecology**. v. 232 p. 23-37, 1999.
- ALI et al. Effect of Feeding Different Levels of Alfalfa Meal on the Growth Performance and Body Composition of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings. **Asian Fisheries Science**. v. 16. p. 59 – 67, 2003.
- BAYNE, B. L. **Biology of oysters**. Academic Press, 2017.
- BAPTISTA M. T. et al. Temporal dynamics of amino and fatty acid composition in the razor clam *Ensis siliqua* (Mollusca: Bivalvia). 2014. **Helgoland Marine Research**. v. 68. p. 465–482, 2014.
- BECKER, W. Microalgae in Human and Animal nutrition, in: A. Richmond (Ed), Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Blackwell Science Ltd**. p. 312-351, 2004.
- BACON, G.S.; MACDONALD, B. A, WARD, J.E. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles I. Feeding activity and selection. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 219. p. 105–125, 1998.
- BENINGER, P.G.; LE PENNEC, M. Functional anatomy of scallops. **Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture** (ed. S.E. Shumway). p. 133–223, 1991.
- BARILLÉ, L.; PROU, J.; HÉRAL, B.; RAZET, D. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 212. p. 149-172, 1997.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. v.70, p. 313-321, 1999.
- BRAD S. B.; NEWELL R.I.E. Feeding rate responses of oyster larvae (*Crassostrea virginica*) to seston quantity and composition. v. 189. p. 77-91, 1995.

- BRAZEIRO, A.; DEFEO, O. Effects of harvesting and density dependence on the demography of sandy beach populations: the yellow clam *Mesodesma mactroides* of Uruguay. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe. v. 182, p. 127-135, 1999.
- BROWN, M.R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.145, p.79- 99, 1991.
- BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**. v. 151, p. 315–331, 1997.
- BROWN, M.R.; MCCAUSLAND, M.A. Increasing the growth of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* by supplementary feeding with microalgal and dried diets. **Aquaculture Research**, v.31, p. 671-682, 2000.
- BRUNETTO et al. Efeito da densidade no cultivo da ostra nativa de mangue *Crassostrea tulipa* (Lamarck, 1819). **Latin American Journal of Aquatic Research**. v. 48. p. 855-868, 2020.
- BUJAN-LÓPEZ, M.J. Incorporación de sustancia bioactivas en sistemas microparticulares: Aplicación en acuicultura. **Tese de doutorado**. Faculdade de Farmácia. Universidade de Santiago de Compostela. Espanha, 2003.
- CAILL-MILLY et al. 2014. Morphological trends of four manila clam populations (*Venerupis philippinarum*) on the French Atlantic Coast: identified spatial patterns and their relationship to environmental variability. **Journal of Shellfish Research**. v. 33 (2). p. 355–372, 2014.
- CARBONI S.; CLEGG S. H.; HUGHES A. D. The use of biorefinery by-products and natural detritus as feed sources for oysters (*Crassostrea gigas*) juveniles. **Aquaculture**. v. 464. p. 392-398, 2016.
- CHENG et al. Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. **Algal Research**. v. 51. P. 1-10, 2020.
- CHIESA, L. M. et al. Mussels and clams from the italian fish market. is there a human exposition risk to metals and arsenic? **Chemosphere**, v. 194, p. 644-649, 2018.
- CORDERO et al. Population genetics of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) introduced in North America and Europe. **Scientific Reports**. v. 7. P. 39745, 2017.
- COSTA, P.F. Cultivo de ostras: biologia e tecnologia para o cultivo de ostras. **Manual de maricultura**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa da Marinha. p.1B-40B, 1983.
- CHRISTO, S.W.; ABSHER, T.M. Reproductive period of *Crassostrea rizophorae* (Guilding, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Paraná, Brazil. **The Journal of Coastal Research**.v.2. p.1215-1218, 2006.

DEFEO, O.; ARREGUÍN-SÁNCHEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Growth study of the yellow clam *Mesodesma mactroides*: a comparative analysis of three length-based methods. **Journal of Marine Science**. v. 56. p. 53–59, 1992a.

DEFEO, O.; JARAMILLO, E.; LYONNET, A. Community structure and intertidal zonation of the macroinfauna on the Atlantic coast of Uruguay. **The Journal of Coastal Research**. v. 8. p. 830–839, 1992b.

DELAUNAY et al. The effect of monospecific algal diet on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 173, p. 163-179, 1993.

DE PAUW N.; VERBOVEN J.; CLAUS C. LARGE-SCALE. Microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. **Aquacultural engineering**. v. 2. p. 27 – 47, 1983.

DRIDI, S., ROMDHANE M.S., ELCAFSI M. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. **Aquaculture**. v. 263. p. 238–248, 2007.

EPAGRI, 2016. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese Informativa da Maricultura 2016**.

EPAGRI, 2018. **Síntese Informativa da Maricultura 2017**. Relatório. 2018. Disponível em: <https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/comunidade-cientifica/producao-tecnico-cientifica/>

EPAGRI, 2020. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2019-2020**. Disponível em: [https://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepa/publicacoes/Sintese\\_2019\\_20.pdf](https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2019_20.pdf)

ESPINOSA, E.P. et al. Lectins associated with the feeding organs of the oyster *Crassostrea virginica* can mediate particle selection. **Biology Bulletin** v. 217. p. 130-141, 2009.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. [s.l: s.n.].

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. [s.l: s.n.].

FARIAS, A.; BELL, J.; URIARTE, I.; SARGENT J. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. **Aquaculture**. v.228, p. 289–305, 2003.

FERDOSH, S., et al. Quality of Tuna Fish Oils Extracted from Processing the By-Products of Three Species of Neritic Tuna Using Supercritical Carbon Dioxide., **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39 (4). p. 432-441, 2015.

FERREIRA, J. F. Repensando o mar para o século XXI – Maricultura. **II workshop regional sul sobre o mar**. Florianópolis, p. 83-89, 1998.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. Cultivo de mexilhões. In: orgs: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; Andreatta, E.; Beltrame, E. **Aqüicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis, Multifatorial editora, p. 221-250. 2004.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M.; SILVESTRI, F. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. **Infopesca Internacional**. v. 28, p. 34-41, 2006.

FERREIRA, J.F.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; FERREIRA, F.M. Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 35. p. 192-197, 2011.

FIDALGO, J. P. et al. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 166, n. 1-2, p.105-116, 1998.

FLASSCH, J.P., LEBORGNE, Y. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. **ICES marine science symposia**. v. 194. p. 92-96, 1992.

FIorentini R.; GALORRINI C. Pilot plant production of an edible alfafa protein concentrate. **Journal of food Science**. v. 46. p. 1514- 1520, 1981.

FREITAS M. O.; VELASTIN R. Ictiofauna associada a um cultivo de mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) Norte Catarinense, Sul do Brasil. **Acta Scientiarum**. p. 31-37, v. 32, n. 1, 2010.

FONTANA, C.S.; BENCKE, G.A.; REIS, R.E. **Livro da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

FUNO, I.C.D.S.; ANTONIO, I.G.; MARINHO, Y.F.; GÁLVEZ, A.O. Influence of salinity on survival and growth of *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo. v. 41, p. 837-847, 2015.

GALLAGER S. M.; MANN R. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. **Aquaculture**. v. 56. p. 105–121, 1986.

GALTSOFF, P.S. **The American Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)**. Fish Bull. U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Serv. USA. 480 p., 1964.

GOMES et al. The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology**. v. 74. p. 967- 976, 2014.

GOMES et al. Estimates of genetic parameters for growth and survival in pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 44. p. 337-337, 2018.

OSLING, E. Bivalves Molluscs: biology, ecology and culture. **Oxford: fishing new books. Blackwell publishing company**. 455p. 2004.

HAWKINS, A. J. S.; NAVARRO, E.; IGLESIAS, J. I. P. Comparative allometries of gut-passage time, gut content and metabolic faecal loss in *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule*. **Marine Biology**. v. 105. p. 197-204, 1980.

HASHIM N.A. et al. Nutritional values and microencapsulation techniques of fish oil from different sources: A mini review, **Materialstoday: Proceedings**, v. 42 (1), p. 222-228, 2021.

HENDRIKS I. E. et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 296. p. 199–213, 2003.

IMAI, T. **Aquaculture in shallow seas; Progress in shallow sea culture**. Balkema/Rotterdam, Part II. P. 115-181, 1982.

JONES D.A. Crustacean larval microparticulate diets. **Reviews in Fisheries Science**. v. 6. p. 41-54, 1998.

KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños con claves para su determinación y notas sobre su distribución. **Anais Academia Brasileira de Ciências**.v. 37, p. 327-352, 1964.

KNAUER, J.; SOUTHGATE, P. C. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcus excentricum*) and microencapsulated lipids. **Aquaculture**. v. 154, n. 3-4, p. 293-303, 1997.

LAING I. Dried algae — An alternative diet for bivalves? 1989. **Fish Farmer**. Janeiro-fevereiro

LAGREZE, F.J.S. et al. Sobrevivência e crescimento de larvas do molusco de área *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) em laboratório. **Boletim do Instituto Pesca**.v. 41, p.133-143, 2015.

LAGREZE, F.J.S. et al. Optimizing Broodstock Conditioning for the Tropical Clam *Anomalocardia brasiliensis*. **Journal of Shellfish Research**. v. 37 (5), p. 979-987, 2018.

LANGDON, C.J.; WALDOCK, M.J. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 61. p. 431-448, 1981.

LANGDON, C. J.; SIEGFRIED, C. A. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. **Aquaculture**. v. 39. p. 135-153, 1984.

LANGDON, C.; ÖNAL, E. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquaculture**. v. 180 p. 283 – 294, 1999.

LAPÈGUE et al. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mt DNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**. v. 20. p. 232-242, 2002.

LARAMORE, S. et al. Fatty Acid Composition of Adult and Larval Sunray Venus Clams *Macrocallista nimbosa*: Environmental and Gametogenic Impacts. **Journal of Shellfish Research** v. 36. p. 403-416, 2011.

LEGAT et al. Crescimento e sobrevivência da ostra de fundo, *Crassostrea gasar*, cultivada no nordeste e sul do Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 43, p. 172- 184, 2017a.

LE RUYET J. P.; ALEXANDRE J. C.; THÉBAUD L.; MUGNIER C. Marine Fish Larvae Feeding: Formulated Diets or Live Prey? **World Aquaculture Society**. v. 24. p. 211-224, 1993.

LOPES, G. R.; GOMES, C. H. A. M.; TURECK, C. R.; MELO, C. M. R. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 975-982, 2013.

LUZARDO-ALVAREZ, A.; OTERO-ESPINAR, F. J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Microencapsulation of diets and vaccines for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 20, p. 277-288, 2010.

MACCACCHERO, G.B.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J. Influence of stocking density and culture management on growth and mortality of the mangrove native oyster *Crassostrea sp.* in southern Brazil. **Biotemas**. v.20. p.47-53, 2007.

MARENZI, A. W. C.; BRANCO, J. O. O cultivo do mexilhão *Perna perna* no município de Penha, SC. In: BRANCO, Joaquim Olinto; MARENZI, Adriano W. C. (Org.). **Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC**. 291. Editora da UNIVALI, Itajaí, SC. p. 227-244, 2006.

MELO et al. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oyster (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**. v. 33(3); p. 564–572, 2010a.

MELO, E. M. C.; GOMES, C. H. A. M.; SILVA, F. C.; SUHNEL, S.; MELO, C. M. R. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793). **Boletim do Instituto de Pesca (Online)**. v. 41. p. 889-898, 2015.

MILKE, L.M.; BRIJELJ, V.M.; PARRISH C.C. Comparação dos primeiros estágios da história de vida da vieira, *Argopecten irradians*: efeitos de dietas de microalgas no crescimento e composição bioquímica. **Aquaculture International**. v. 260, p. 272–289, 2006.

NARVÁEZ M. et al. Food availability and reproduction affects lipid and fatty acid composition of the brown mussel, *Perna perna*, raised in suspension culture. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**. v. 149. p. 293–302, 2008.

NASCIMENTO, I. A. Cultivo De Ostras No Brasil: Problemas E Perspectivas. **Ciência e Tecnologia**. São Paulo, 35 (7), p. 871-876, 1983.

NOVAES, A. L. T. et al. **Métodos para obtenção de sementes de mexilhões alternativos à retirada de bancos naturais**. 116. ed. Florianópolis: EPAGRI, p. 48, 2016.

NUMAGUCHI, K. Preliminary experiments on the influence of water temperature, salinity and air exposure on the mortality of Manila clam larvae. **Aquaculture International**. v. 1. p. 77–81, 1998.

OLIVEIRA-NETO, F.M. Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina. **Florianópolis: EPAGRI**. 67p. (EPAGRI, Documentos, 220).

OLVERA-NOVOA et al. The use of alfalfa leaf protein concentrates as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquaculture**. v. 90, p. 291-302, 1990.

OJEA J. et al. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. **Aquaculture**. v. 238. p. 451–468, 2004.

ÖNAL, E.; LANGDON, C.; ÖNAL, U. The microalgae assesmen of dry spray in diets for manila clam Jamvena, *Tapes philippinarum*. **Journal of Shellfish Research**. v. 24, p. 1061-1065, 2005.

PAZOS, A. J. C. et al. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, NW Spain. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**. v. 114. p. 171–179, 1996.

PALACIOS, E. et al. Lipid composition of the giant lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis I. fatty acids. **Aquaculture**. v. 250. p. 270–282, 2015.

PAULA, D.P.; SILVA C.R. Necessidades hídricas, métodos de irrigação e aspectos econômicos da cultura de alfafa. **Ilha Solteira: FEIS/UNESP**, 1998.

PAZOS, A.J.C. et al. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, NW Spain. 1996. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**. v. 114. p. 171–179, 1996.

PIKE, I.H.; JACKSON, A. Fish oil: Production and use now and in the future. **Lipid Technology**, 22(3), 59-61, 2010.

PÉREZ-CAMACHO, A.; ALBENTOSA, M.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J.; LABARTA, U. Effect of microalgal and inert (cornmeal and cornstach) diets on the growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L., 1767). **Aquaculture**. v.160. p. 89–102, 1998.

PERNET, F.; TREMBLA, Y.R.; LANGDON, C.; BOURGET, E. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus sp.*) larvae. **Marine Biology**. v. 144. p. 693 – 703, 2004.

PERNET, F.; BRICELJ, V.M.; PARRISH, C.C. Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 327, p. 115–133, 2005.

PIE, M.R et al. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliensis*, *C. rizophorae* and *C. gigas*: Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**. v. 37. p. 1598-1600, 2006.

PIRT, S.J. the thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. **New Phytology**. v. 102. v. 3-37, 1986.

PRINS, T.C.; SMAAL, A.C. Carbon and nitrogen budgets of the mussel *Mytilus edulis* (L.) and the cockle *Cerastoderma edule* (L.) in relation to food quality. In: ROS, JD (ed.). **Topics in Marine Biology**. v. 53, p. 477-482, 1989.

PRINS, T.C.; SMAAL, A.C.; POUWER, A.J. Selective ingestion of phytoplankton by the bivalves *Mytilus edulis* (L.) and *Cerastoderma edule* (L.). *Hydrobiological Bulletin*. v. 25. p. 93-100, 1991.

PROVERBIO, C. Herramientas para el manejo de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* em condiciones experimentales. **Graduation monography – Universidad de la República Uruguay**, p. 63, 2017.

PUCHNICK-LEGAT et al. Anesthesia in oysters of the genus *Crassostrea* cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca (Impresso)**. v. 41. p. 785-793, 2015.

QUAYLE, D.B. Pacific oyster culture in British Columbia. **Canada: Department of Fisheries and Oceans**. 1988.

RABY et al. Food-particle size and selection by bivalve larvae in a temperate embayment. **Marine Biology**. v. 127. p. 665–672, 1997.

RAMOS et al. Maturation of the Mangrove Oyster *Crassostrea gasar* at Different Temperatures in the Laboratory. **Journal of Shellfish Research**. v. 33. p. 187-194, 2014.

RAMOS, M.I.S.; NASCIMENTO, I.A.; SILVA, J.L. The comparative growth survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg, *C. gigas* var. Kumamoto) and mangrove oyster (*C. rizophorae*) in Todos os Santos Bay, Brazil. **Ciências e Cultura**, v.34. p. 1604-1615, 1986.

RESGALLA, JR.C.; BRASIL, E.S.; SALOMÃO, L.C. Physiological rates in different classes of sizes of *Perna perna* (Linnaeus, 1758) submitted to experimental laboratory conditions. **Brazil Journal of Biology**.v.66. p. 325-336, 2006.

RICCO-VILLA et al. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**. v. 256, p. 377-388, 2006.



RIOS, E.C. Sea shell of Brazil. **Rio Grande - Fundação Universidade Rio Grande**. 368 p. 1994.

RIOS, E.C. Compendium of brazilian sea shells. **Editora Evangraf**. Rio Grande do Sul RS, p.676, 2009.

ROBBINS, H.M. et al. In vivo effects of brown tide on the feeding function of the gill of the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria* (Bivalvia: Veneridae). **Oxford: Oxford University Press on behalf of the malacological Society of London**, 2008.

ROSA et al. Examining the physiological plasticity of particle capture by the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.): Confounding factors and potential artifacts with studies utilizing natural seston. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 473. p. 207-217, 2015.

TANYAROS et al. Baker's yeast as a substitute for microalgae in the hatchery rearing of larval and juvenile tropical oyster (*Crassostrea belcheri*, Sowerby 1871). **Journal of Applied Aquaculture**. v. 28 (1). p. 35-46, 2016a.

TERMO DE AJUSTAMENTO DE CONDOTA - TAC - **Portaria IBAMA N° 69**, de 30 de outubro de 2003. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2003/p\\_ibama\\_69\\_2003\\_permitircultivomoluscossignatariodostac\\_se\\_s\\_alterada\\_in\\_ibama\\_107\\_2006.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2003/p_ibama_69_2003_permitircultivomoluscossignatariodostac_se_s_alterada_in_ibama_107_2006.pdf)

SADOVSKAYA et al. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1 → 3,1 → 6) -β-D-glucan from *Isochrysis galbana*. **Carbohydrate Polymers**. v. 111. p. 139 – 148, 2014.

SANTOS, J.J.S., et al. Embryo and larval development of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854) (Mesodesmatidae) in laboratory. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92 (suppl.1), 2020a.

SANTOS, J.J.S., et al. Effect of salinity on embryo-larval development of yellow clam *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854) in laboratory. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 92, 2020b.

SILVEIRA, R.C.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.M.; FERREIRA, J.F.; MELO, C.M.R. Larval settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) using different systems to induce metamorphosis. **Brazilian Journal of Biology (Impresso)**. v. 71, p. 557-562, 2011.

ŠIMAT, V. et al. Production and refinement of omega-3 rich oils from processing by-products of farmed fish species. **Foods**. v. 8. p. 1-14, 2019.

SMAAL, A.C.; VONCK, A.P.M. A.; BAKKER, M. Seasonal variation in physiological energetics of *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule* of different size classes. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 77. p. 817-838, 1997.

SOUDANT, P. et al. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. **Aquaculture**. v. 143. p. 361–378, 1996.

- SOUDANT, P. et al. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**. v. 123. p. 209–222, 1999.
- SÜHNEL, S. et al. Effect of the fatty acid EPA and DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). **Aquaculture**. v. 330-333. p. 167-171, 2012.
- SÜHNEL, S. et al. Effects of Astaxanthin on Reproductive Success in the Tropical Scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Shellfish Research**. v. 33. p. 89-98, 2014.
- SUKENIK, A.; WAHNON, R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, V. 97 (1). P. 61-72, 1991.
- TAMAYO, D.; IBARROLA, I.; URRUTIA M.B.; NAVARRO, E. The physiological basis for inter-individual growth variability in the spat of clams (*Ruditapes philippinarum*). **Aquaculture**. v. 321. p. 113-120, 2011.
- THOMPSON P.; GUO, M., PAUL, J.H. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **The Journal of Phycology**. v. 28(4). p.481-488, 2010.
- VARELA et al. Molecular Phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**. v. 73. p. 229–234, 2007.
- VHANALAKAR, S.A.; MULEY, D.V. Evaluation of *Medicago sativa* leaf powder as supplementary feed for the growth of Fish, *Cirrhinus mrigala*. **Bioscience Discovery**, v. 6. (1-D), 2015.
- WALLNER-KERSANACH, M.; BIANCHINI, A. Metais traço em organismos: monitoramento químico e de efeitos biológicos. In: BAPTISTA NETO, J.A. et al. **Poluição marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, c.9, p.237-283, 2008.
- WARD, J.E. et al. A new explanation of particle capture in suspension feeding bivalve molluscs. **Limnology and Oceanography**. v. 43. p. 741-752, 1998.
- WARD, J.; SHUMAWAY, S.E. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension and deposit-feeding bivalves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 293. p. 129-149, 2003.
- WILDISH, D.; KRISTMANSON, D. Benthic suspension feeders and flow. **Cambridge, UK: Cambridge University Press**. 1997.
- YAN, X.; ZHANG, G.; YANG, F. Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae, **Aquaculture**. v. 253, p. 1–4, 2006.