Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Microalgas como ingrediente e suplemento dietético para tilápia *Oreochromis niloticus*: valor biológico, desempenho e composição da carcaça

Rafael Simões Coelho Barone

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2017

Rafael Simões Coelho Barone
Bacharel em Ciências Biológicas

Microalgas como ingrediente e suplemento dietético para tilápia *Oreochromis niloticus*:
valor biológico, desempenho e composição da carcaça
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Barone, Rafael Simões Coelho

Microalgas como ingrediente e suplemento dietético para tilápia *Oreochromis niloticus*: valor biológico, desempenho e composição da carcaça / Rafael Simões Coelho Barone - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011- - Piracicaba, 2017.

87 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Chlorella sorokiniana* 2. *Schizochytrium* sp. 3. DHA 4. Nutrição peixes 5. Ômega 3 I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Bernardo e Valentim

A minha companheira de vida, a Mari

Aos meus pais Mio e Rê

Ao meu orientador Zico

Dedico

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho tem suor, dedicação, paciência e compreensão de muitas pessoas e, quaisquer palavras que eu coloque aqui, nunca serão suficientes para representar a gratidão que tenho por elas!

Obrigado professor Zico, por me ensinar tanto, abrir todas as portas que foram possíveis e por todo apoio e cuidado com o meu desenvolvimento profissional e pessoal! Sou muito grato por ter tido novamente a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e espero poder retribuir, pelo menos em parte, tudo o que me foi proporcionado.

Meus pais e exemplos de vida, Mio e Rê, pelo carinho e amor incondicional, por acreditarem sempre em mim e principalmente por me formarem nos princípios da honestidade e respeito, que tento incansavelmente passar adiante no dia a dia e na educação dos meus filhos.

Em especial à Mari, sem ela essa jornada não seria possível, por ser a pessoa mais incrível que eu já conheci, meu porto seguro e com quem junto com nossos filhos, Bernardo e Valentim, quero compartilhar muito amor e experiências nessa vida!

Ao Daniel Sonoda não só pelas oportunidades oferecidas e compreensão dos momentos de ausência, mas também pelos ensinamentos e exemplo de empreendedorismo, empenho, dedicação, perseverança e gestão do tempo (o dia dele parece ter 48h).

Às colegas Rafaela Gordo e Débora Rosche, pela amizade sincera, carga de energia extra e também por compartilharem sonhos, objetivos e ideais e começarmos a transformá-los em realidade. Também ao Gustavo Bozano pelos ensinamentos e oportunidades de crescimento profissional.

Aos meus sogros, sogras (sim, tenho mais que uma) e toda a minha família pelo carinho, apoio e compreensão aos momentos de ausência.

A todo grupo de pesquisa: Renan Donadelli, Fernando Yamamoto, Fernando Cornélio, Roselany Corrêa, Thaline Cruz, Gustavo Bozano, Rafael Sabioni, João Fernando Koch, Welliton França, Thiago Freato, Fredy Aguilar, Ligia Gonçalves e Evandro Lorenz. Esses três últimos agradeço de forma especial, pois tiveram imensas contribuições nesse trabalho, mas todos têm uma parcela de contribuição. Apreendi muito com todo o grupo, além de toda amizade e parceria!

Ao Júnior e Sérgio que não só tornam possíveis as nossas ideias de experimentos, como também contribuem com conhecimento e experiência. Assim como, agradeço a todos os estagiários que passaram pelo setor de piscicultura.

Ao Sérgio Goldemberg pelas trocas de experiências e pela oportunidade oferecida através da bolsa RHAE e fornecimento da microalga. Deixo aqui também, meu muito obrigado ao CNPQ e CAPES pelas bolsas de estudo e financiamento do projeto.

Por fim, a todos os meus irmãos de república e todos os amigos que fazem a nossa vida mais prazerosa!

Muito obrigado!

“Make everything as simple as possible, but not simpler”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. MICROALGAS	15
2.2. A PRODUÇÃO DE MICROALGAS E O USO DE SEUS DERIVADOS	16
2.3. MITIGAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS PELA PRODUÇÃO DE MICROALGAS	17
2.4. USO DAS MICROALGAS NA AQUICULTURA E NUTRIÇÃO ANIMAL	18
2.5. MICROALGAS COMO ALIMENTO FUNCIONAL	24
2.6. CONSIDERAÇÕES E RESTRIÇÕES DO USO DE MICROALGAS EM NUTRIÇÃO ANIMAL	25
2.7. <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP.	28
2.8. <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i>	30
2.9. A TILÁPIA, <i>OREOCHROMIS</i> SP.	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE DE FARINHAS DE MICROALGAS	33
3.2. DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE DAS RAÇÕES DO ENSAIO DE DESEMPENHO.....	38
3.3. DETERMINAÇÃO DO DESEMPENHO DAS TILÁPIAS ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE FARINHA DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP.	39
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. DIGESTIBILIDADE DA FARINHA DE <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i>	43
4.2. DIGESTIBILIDADE DA FARINHA DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP.	48
4.3. DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS	51
4.4. DESEMPENHO DA TILÁPIA ALIMENTADA COM DIETAS CONTENDO NÍVEIS CRESCENTES DE INCLUSÃO DA FARINHA DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP.	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

**Microalgas como ingrediente e suplemento dietético para tilápia *Oreochromis niloticus*:
valor biológico, desempenho e composição da carcaça**

Existe um grande potencial para a expansão da produção de microalgas, tanto pela variedade de usos quanto pelos produtos que delas podem ser derivados. Dentre esses usos, as características nutricionais e funcionais conferem às algas alto valor biológico para uso em nutrição humana e animal. No entanto, são poucos os estudos que avaliam seu potencial na nutrição de peixes, mais especificadamente de tilápia, um dos principais produtos da aquicultura mundial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de uso de duas espécies de microalgas e o nível ótimo de inclusão da *Schizochytrium* em dietas para a tilápia. Para tanto, foram realizados ensaios para avaliação do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de uma microalga rica em proteína, *Chlorella sorokiniana*, e outra rica em energia, a *Schizochytrium* sp., ao longo de ensaios de desempenho e digestibilidade de rações contendo níveis crescentes (0%; 1%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10%) de *Schizochytrium* sp. a fim de determinar o nível ótimo de inclusão nas dietas. As microalgas apresentaram altos coeficientes de digestibilidade para a tilápia, com CDA para a proteína de 90,51 e 97,20 % e para energia de 84,22 e 82,55 %, para a *Chlorella* e *Schizochytrium*, respectivamente. Os níveis crescentes de inclusão da *Schizochytrium* alteraram a digestibilidade das rações de forma decrescente para a proteína, passando de um CDA de 88,07 para 86,01, e energia, de um CDA de 74,19 para 67,35. No ensaio de desempenho foi registrado aumento no consumo de ração e piora na conversão alimentar aparente, sem que outros parâmetros de desempenho zootécnico fossem alterados, à medida que aumentava os níveis de inclusão da *Schizochytrium* na dieta. Não foram registradas alterações nos conteúdos de macro nutrientes na carcaça dos peixes, no entanto, os níveis crescentes de inclusão alteraram o perfil de ácidos graxos aumentando a quantidade de ácidos graxos n-3 no filé, principalmente do ácido docosaexaenoico (DHA), e redução na relação n-6/n-3. Dessa forma, é possível a utilizar *Schizochytrium* sp. como aditivo nas dietas para alteração do perfil de ácidos graxos da tilápia, enriquecendo os filés com ácidos graxos n-3, com pouco prejuízo nos parâmetros de desempenho.

Palavras-chave: *Schizochytrium*; *Chlorella*; DHA; Digestibilidade; Nutrição; Tilápia

ABSTRACT

Microalgae as a dietary supplement for tilapia (*Oreochromis niloticus*): biological value, performance and carcass composition

There is a great potential for expand the microalgae production as by the variety of it uses as for the products and processes which may derive from them. Amongst such uses, nutritional and functional characteristics provide them a high biological value for use in human and animal nutrition. Nevertheless, few studies have evaluated their potential for fish nutrition more specifically tilapia, which is one of the main aquaculture products in the world. The aim of this research was to evaluate the potential use of two microalgae and the optimal level of inclusion of *Schizochytrium* in diets for tilapia. Therefore, tests were conducted to evaluate the apparent digestibility coefficient (ADC) of microalgae with high protein content *Chlorella sorokiniana* and another with high energy, *Schizochytrium* sp. and also performance assay and feed digestibility containing inclusion levels (0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% and 10%) of *Schizochytrium* in order to determine the optimum addition level. Both species were very digestible for tilapia with ADCs for protein of 90.51 and 97.20 and for energy 84.22 and 82.55 to *Chlorella* and *Schizochytrium* respectively. The increasing levels of inclusion of *Schizochytrium* changed the digestibility of feed for the protein, through a ADC from 88.07 to 86.01 and for energy from 74.19 to 67.35 ADC. In the growth test as the inclusion of *Schizochytrium* increased there was an increase in feed intake and feed conversion ratio but any other growth parameters were changed. Regarding the carcass composition, there were no changes in macronutrients composition however, the increasing levels of *Schizochytrium* altered the fatty acid profile by increasing the amount of omega 3 mainly docosahexaenoic acid (DHA) and reduced the n-6/n-3 ratio. Thus, it is possible to use the *Schizochytrium* to modify the fatty acid profile of tilapia by incorporating omega 3, with little loss in performance parameters

Keywords: *Schizochytrium*; *Chlorella*; DHA; Digestibility; Nutrition; Tilapia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPARATIVO ENTRE A PRODUTIVIDADE DE BIODIESEL EM DAS FONTES COMUMENTE UTILIZADAS E MICROALGAS (ESTIMATIVAS COM DADOS LABORATORIAS). ADAPTADO DE CHISTI (2007).	16
FIGURA 2. SISTEMA DE INTEGRAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICROALGAS, GERAÇÃO DE ENERGIA E MITIGAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS. ADAPTADO DE PIRES (2015).	18
FIGURA 3. VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA MICROALGA <i>ISOCHRYSIS GALBANA</i> , EM TERMOS DE BIOMASSA, CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, LIPÍDIOS E PROTEÍNAS (EIXO SECUNDÁRIO) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO. ADAPTADO DE HE <i>ET AL.</i> (2016).	26
FIGURA 4. <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP.: (A) FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MICROSCOPIA DE LUZ (AUMENTO X400) E (B) FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MICROSCOPIA DE VARREDURA (AUMENTO X5.000). IMAGEM: HONG <i>ET AL.</i> (2011).	29
FIGURA 5. FOTOMICROGRAFIA DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP. ÍNTEGRA LIOFILIZADA (AUMENTO X1.000). IMAGEM: RSC BARONE.	30
FIGURA 6. FOTOMICROGRAFIA DE <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> ÍNTEGRA LIOFILIZADA (AUMENTO X20.000). IMAGEM: RSC BARONE.	31
FIGURA 7. HISTÓRICO DE PREÇOS DA FARINHA DE PEIXE E FARELO DE SOJA DE 1987 ATÉ JUNHO DE 2016 E MÉDIA DE PREÇOS DOS ÚLTIMOS CINCO ANOS DESSES INGREDIENTES. FONTE DOS DADOS: BANCO MUNDIAL.	46
FIGURA 8. REGRESSÃO LINEAR PARA OS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA E ENERGIA DAS RAÇÕES DO ENSAIO DE DESEMPENHO.	52
FIGURA 9. MODELO DE REGRESSÃO LINEAR PARA A TAXA DE INGESTÃO ALIMENTAR. LI E LS REFEREM-SE AO LIMITE SUPERIOR E INFERIOR DO INTERVALO DE CONFIANÇA, UTILIZANDO O ERRO PADRÃO. R^2 - CORRIGIDO PELA SOMA DE QUADRADOS DO ERRO PURO	55
FIGURA 10. MODELO DE REGRESSÃO LINEAR PARA A CONVERSÃO ALIMENTAR. LI E LS REFEREM-SE AO LIMITE SUPERIOR E INFERIOR DO INTERVALO DE CONFIANÇA, UTILIZANDO O ERRO PADRÃO.	56
FIGURA 11. ALTERAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA CARÇA DA TILÁPIA (BASE MATÉRIA NATURAL) EM TERMOS DE INCORPORAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS N-3, DHA E RELAÇÃO N6/N3.	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE 32 ESPÉCIES DE MICROALGAS (MATÉRIA SECA). 19	19
TABELA 2. COMPARAÇÃO ENTRE A COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DE 3 ESPÉCIES DE MICROALGAS, COM FARINHAS DE PEIXE E ALBUMINA.20	20
TABELA 3. COMPILAÇÃO DE ESTUDOS QUE UTILIZARAM MICROALGAS NA NUTRIÇÃO DE PEIXES E OS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS.21	21
TABELA 4. RELAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE SECAGEM EMPREGADO E A RAZÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE QUANTIDADE DE PROTEÍNA BRUTA FINAL / PROTEÍNA BRUTA INICIAL NO PRODUTO OBTIDO DE BIOMASSA DE ALGAS. ADAPTADO DE BECKER (2013).28	28
TABELA 5. COMPOSIÇÃO DE INGREDIENTES E NUTRICIONAL DAS DIETAS PARA OS ENSAIOS DE DIGESTIBILIDADE DAS FARINHAS DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> E <i>CHLORELLA</i>35	35
TABELA 6. ANÁLISES REALIZADAS E OS RESPECTIVOS MÉTODOS UTILIZADOS.36	36
TABELA 7. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS FARINHAS DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP. E <i>CHLORELLA</i> SP.36	36
TABELA 8. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS DIETAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE39	39
TABELA 9. COMPOSIÇÃO DE INGREDIENTES E NUTRICIONAL DAS DIETAS PARA OS ENSAIOS DE DESEMPENHO DAS FARINHAS DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP.40	40
TABELA 10. COMPARATIVO ENTRE FARINHA DE <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> , FARINHA DE PEIXE E FARELO DE SOJA, EM TERMOS DE COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA) PARA A TILÁPIA E QUANTIDADE DE NUTRIENTE DIGESTÍVEL.....43	43
TABELA 11. COMPARAÇÃO ENTRE OS DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO ATUAL TRABALHO COM A LITERATURA DE REFERÊNCIA45	45
TABELA 12. COMPARAÇÃO ENTRE COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA) ENTRE O PRESENTE ESTUDO E SARKER (2016 _A).49	49
TABELA 13. COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO UTILIZADO NA CONDUÇÃO DOS ENSAIOS DE DIGESTIBILIDADE ENTRE O PRESENTE ESTUDO E SARKER <i>ET AL.</i> (2016 _A).49	49
TABELA 14. COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DAS RAÇÕES DO ENSAIO DE DESEMPENHO.51	51
TABELA 15. PARÂMETROS DE DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM FUNÇÃO DO NÍVEL DE INCLUSÃO DA FARINHA DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP. NA DIETA (A=0,05).55	55
TABELA 16. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA CARCAÇA EM FUNÇÃO DO NÍVEL DE INCLUSÃO DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> SP. (PERFIL COMPLETO DOS ÁCIDOS GRAXOS DISPONÍVEL NO APÊNDICE C).60	60

1. INTRODUÇÃO

A indústria brasileira de produção de ração animal é a quarta maior do mundo, tendo apresentado uma média de crescimento de 5% ao ano na última década. Grande parte desta indústria atende as atividades de avicultura e suinocultura, que juntas consomem 70% de toda ração produzida no país. Entretanto, nos últimos três anos a aquicultura tem sido o segmento com as maiores taxas de crescimento, aproximadamente 10,1% frente aos 2,3% e 3% do mercado de rações para aves e suínos, respectivamente (Sindirações, 2015).

De modo geral os gastos com ração representam entre 60 a 70% dos custos de produção em piscicultura (Lovell, 1998) dos quais, dependendo da espécie, entre 70 a 80% correspondem aos custos com fontes proteicas, uma vez que a proteína oriunda da farinha de peixe, o ingrediente mais completo em termos nutricionais, é também a matéria-prima mais cara e com o maior impacto ambiental, já que é proveniente de atividade exploratória (Edwards, 2015, Kobayashi *et al.*, 2015, Naylor *et al.*, 2009). Nos últimos quinze anos a farinha e o óleo de peixes tiveram uma alta de preço da ordem de 200%. Em termos monetários, uma tonelada métrica de farinha de peixe custa cerca de US\$ 1.700,00, o que representou, em 2015, um aumento de 30,70% do valor médio registrado em 2012. Nas últimas décadas a produção anual da farinha e do óleo de peixe se mantiveram constantes, 5,0~7,0 e 0,8~1,5 t.10⁶, respectivamente. Apesar de a tilapicultura usar uma quantidade relativamente baixa de farinha de peixe, algo entre 5~15% da composição das dietas, as tilápias representam 8,8% do volume produzido pela aquicultura mundial e, no Brasil, essa espécie representa 24,63% do total, gerando um volume de 280.000 toneladas no ano de 2014, o que colocou o país entre os seis maiores produtores mundiais de tilápia (Chiu *et al.*, 2013, Ng and Romano, 2013a, Tacon and Metian, 2008). Tal fato justifica a procura por ingredientes que possam substituir ou reduzir o seu uso (Naylor *et al.*, 2009), ou seja, tanto a sustentabilidade ambiental quanto econômica da aquicultura depende da identificação, desenvolvimento e uso de sucedâneos da farinha e óleo de peixe na formulação de rações.

As microalgas apresentam características nutricionais compatíveis com a farinha e o óleo de peixe, fato que as coloca como potenciais substitutos destes ingredientes nas rações para organismos aquáticos, ou como suplemento alimentar. Portanto, considerando os diversos propósitos que justificam o aumento da

produção de microalgas, o vasto potencial de uso desses microrganismos, as vantagens de sua incorporação na nutrição animal e o mercado da piscicultura, este trabalho tem o objetivo de avaliar o potencial nutritivo das microalgas na composição e/ou suplementação de dietas para tilápia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microalgas

O termo microalga não é um termo com referência taxonômica, principalmente por não representar um grupo monofilético e assim agrupar organismos de distintas origens evolutivas e, conseqüentemente, diferentes características morfológicas, fisiológicas, reprodutivas e ecológicas (Belinger e Sigee, 2010; Bicudo e Menezes, 2006; Andersen, 2013). O grupo das microalgas é formado basicamente por protistas clorofilados e talófitos (plantas sem raízes, caules e folhas), possuem clorofila *a* como pigmento fotossintético, e carecem de uma cobertura estéril de células ou tecidos em torno das células reprodutivas. Uma série de organismos fotossintetizantes que pouco se correlacionam, e.g. as cianobactérias, que do ponto de vista evolutivo, estão mais próximas das bactérias do que das plantas, são agrupados sob essa definição (Lee, 2008; Bicudo e Menezes, 2006)

Dessa forma, existem nesse agrupamento organismos procariontes, eucariontes, unicelulares, pluricelulares, espécies de reprodução sexuada, assexuada que, além de tudo, ocorrem em uma grande diversidade de habitats, majoritariamente ambientes aquáticos, mas também presentes em solos, ligadas ao substrato, em relações simbióticas (líquens e corais) e em ambientes extremos como desertos, lagos termófilos e geleiras. Quanto à motilidade, algumas microalgas são sésseis e outras móveis, com a presença de cílios ou flagelos; em relação ao metabolismo, a maioria é autotrófica fotossintetizante, mas existem espécies heterotróficas facultativas e heterotróficas obrigatórias (Mazard *et al.*, 2016). Finalmente, as microalgas são responsáveis por mais de 50% da produção de oxigênio no planeta e do ponto de vista evolutivo foram as responsáveis pela transição da atmosfera da Terra rica em dióxido de carbono para uma atmosfera com os níveis atuais de oxigênio (Mazard *et al.*, 2016, Falkowski and Knoll, 2007, Chapman, 2013).

2.2. A produção de microalgas e o uso de seus derivados

As microalgas são a base de diversas teias alimentares e provém a energia para o funcionamento de diversos ecossistemas, algumas espécies conseguem duplicar sua biomassa entre três a cinco dias e, em função do seu rápido crescimento, são tidas como promissoras fontes de geração de energia renovável (Milledge, 2011). A produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem recebido muita atenção nas últimas décadas. Apesar de estimativas de produção em torno de 50 t de óleo ha⁻¹ se mostrarem promissoras quando comparadas às 5 t de óleo ha⁻¹ extraídos de palma (Figura1), muitas destas estimativas baseiam-se em extrapolações de ensaios laboratoriais. O que faz com que quando avaliados em escala comercial, poucos sistemas atingem essas altas produtividades. Ainda assim, o processo de produção de biodiesel a partir de microalgas não se mostra economicamente competitivo quando comparado às outras fontes, isso se deve principalmente pelos custos envolvidos na aglutinação, centrifugação, secagem, rompimento das células e extração dos lipídios (Demirbas and Demirbas, 2011, Sun *et al.*, 2011, Nascimento *et al.*, 2014, Rawat *et al.*, 2013, Chisti, 2007). Portanto, o potencial e a necessidade de investimentos em pesquisa aplicada e desenvolvimento tecnológico para esse tipo de atividade são então evidentes.

Microalga a – considerando 30% de lipídios na matéria seca

Microalga b – considerando 70% de lipídios na matéria seca

Figura 1. Comparativo entre a produtividade de biodiesel em das fontes comumente utilizadas e microalgas (estimativas com dados laboratoriais). Adaptado de Chisti (2007).

Embora o desenvolvimento tecnológico para a geração de biocombustíveis a partir de microalgas encontre-se ainda em estágio inicial, tem-se já como certo que o potencial do subproduto da atividade, a biomassa de microalgas, possui vasta gama aplicação e uso, por exemplo, na nutrição humana e animal, saúde, cosméticos, mitigação de impactos ambientais (Mazard *et al.*, 2016, Viegas *et al.*, 2015, Milledge, 2011) e outros ainda desconhecidos. Na realidade, as microalgas já são utilizadas como fontes de diversos compostos, tais como: vitaminas E, B₁₂ e biotina, ácidos graxos essenciais, ácido fólico, astaxantina e beta caroteno, todos de interesse medicinais, nutricionais, farmacológicos e cosméticos (Singh *et al.*, 2005, Shannon and Abu-Ghannam, 2016). Algumas rodófitas são utilizadas para a produção de ficobiliproteínas, compostos de coloração vermelha ou azul, já amplamente utilizados para a pigmentação de refrigerantes, doces, sorvetes, chicletes e wasabi, tradicional ingrediente utilizado da culinária japonesa (Milledge, 2011, Mazard *et al.*, 2016).

2.3. Mitigação de impactos ambientais pela produção de microalgas

Dentre os seus diversos usos, as microalgas possuem um grande potencial para a mitigação de diversos impactos ambientais, com destaque, entre outros, para: (i) aproveitamento do vinhoto proveniente de usinas sucroalcooleiras para a produção de microalgas (Wilkie *et al.*, 2000, Olguin *et al.*, 2015); (ii) biodegradação de compostos fenólicos da indústria do papel, petroquímicas e resíduos industriais (Selvaratnam *et al.*, 2016, Lika and Papadakis, 2009, Gao *et al.*, 2011) e de pesticidas organofosforados (Caceres *et al.*, 2008, Hultberg *et al.*, 2016); (iii) bioremediação de águas contaminadas com verde malaquita (Daneshvar *et al.*, 2007, Khataee *et al.*, 2010); (iv) tratamento de resíduos suínos (Mezzomo *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2016) e do processamento de peixes (Riano *et al.*, 2011); (v) captura de CO₂ e tratamento de esgoto doméstico (Rawat *et al.*, 2011, Honda *et al.*, 2012, Cheah *et al.*, 2016, Moreira and Pires, 2016, Posada *et al.*, 2016, Selvaratnam *et al.*, 2016); (vi) biofiltros para a remoção de compostos nitrogenados (Niu and Leung, 2010); (vii) tratamento de descarte da indústria farmacêutica (Hemalatha and Mohan, 2016).

Diante desse potencial e, considerando a crescente pressão por reutilização de recursos e mitigação de impactos ambientais, é provável que biomassa de

microalgas provenientes desses processos estejam cada vez mais disponíveis no mercado. Pires (2015) sugere um modelo de integração de geração de energia, mitigação de impactos da indústria e efluentes urbanos com a geração de produtos provenientes das microalgas (Figura2). Esse provavelmente será um modelo de integração que permitirá a redução custos de produção de microalgas, mas a biomassa gerada carece de avaliações para sua destinação no mercado de nutrição animal.

Figura 2. Sistema de integração da produção de microalgas, geração de energia e mitigação de impactos ambientais. Adaptado de Pires (2015).

2.4. Uso das microalgas na aquicultura e nutrição animal

As microalgas vivas já são amplamente utilizadas para a alimentação de larvas, pós-larvas e juvenis em sistemas aquícolas, em muitos casos a partir da produção de cepas selecionadas em laboratórios de produção de alimento vivo (Olvera-Novoa *et al.*, 1998; Knuckey *et al.*, 2006). Dependendo do regime de produção aquícola o uso das microalgas é substituído gradativamente por rações, sendo que para a formulação dessas dietas artificiais não é comum o uso das próprias microalgas como ingredientes ou suplementos dietéticos. De fato, não somente existem diversas espécies de microalgas que possuem um perfil nutricional com potencial para inclusão em rações (Tabela 1) como também algumas espécies de microalgas que também apresentam um perfil de aminoácidos essenciais

compatíveis com a farinha de peixe e outros ingredientes com alto valor biológico (Tabela 2).

Tabela 1. Composição nutricional de 32 espécies de microalgas (matéria seca).

Espécies	Proteína	Carboidratos	Lipídios	Referência
	----- % -----			
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	28,1	38,6	18,8	Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Anabaena sp</i>	48	25-30	4-7	Roy e Pal (2015); Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Botryococcus braunii</i>	39,1-39,9	18,5-30,6	24,9-34,4	Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Chlamydomonas sp</i>	43-56	2,9-17	14-22	Roy e Pal (2015)
<i>Chlorella minutissima</i>	14,9	6,6	2,2	(Borges-Campos <i>et al.</i> , 2010))
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	Becker (2013a)
<i>Chlorella sp.</i>	51-58	12-17	14-22	Roy e Pal (2015); Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	44-58	12-28	13	Becker (2013a); Matos <i>et al.</i> (2016)
<i>Chorella sorokiniana</i>	66-69	6,4	ND	RSC, Barone
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	Becker (2013a)
<i>Dunaliella salina</i>	29,3	16,3	25,3	Becker (2013a)
<i>Dunaliella sp.</i>	34,1-57	4-32	6-14,3	Roy e Pal (2015); Kent <i>et al.</i> (2015)
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	Becker (2013a)
<i>Isochrysis galbana</i>	50-56	10-17	12-14	Christaki <i>et al.</i> (2011)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	43,9	19,6	8,6	Matos <i>et al.</i> (2016)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	17,9-33,5	9,6-27,4	21,7-47,8	Tibbetts <i>et al.</i> (2015b); Kent <i>et al.</i> (2015)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	30,1	37,8	15,4	Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	39,6	15,1	15,6	Matos <i>et al.</i> (2016); Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Porphyridium sp</i>	28-39	50-57	ND	Roy e Pal (2015); Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Prorocentrum minimum</i>	30,9	17,6	3,5	(Borges-Campos <i>et al.</i> , 2010))
<i>Prymnesium sp</i>	28-45	25-33	22-38	Roy e Pal (2015)
<i>Scenedesmus sp.</i>	30,9-56	10-52	12-15,07	Roy e Pal (2015); Kent <i>et al.</i> (2015)
<i>Schizochytrium sp.</i>	12,4	25	72	RSC, Barone
<i>Spirogyra</i>	6-20	33-64	11-21	Roy e Pal (2015); Becker (2013a)
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	Christaki <i>et al.</i> (2011); Becker (2013a)
<i>Spirulina platensis</i>	50-65	8-14	4-9	Roy e Pal (2015)
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	Roy e Pal (2015)
<i>Tetraselmis chuii</i>	46,5	25	12,3	Becker (2013a); Tibbetts <i>et al.</i> (2015b)
<i>Tetraselmis gracilis</i>	33,6	23,1	5,3	(Borges-Campos <i>et al.</i> , 2010))
<i>Tetraselmis sp.</i>	52	15	16-45	Roy e Pal (2015); Becker (2013a)
<i>Tisochrysis lutea</i>	36,7-41,7	7,5-9,4	19,3-22	(Alkhamis and Qin, 2016)

ND – Não determinado

Tabela 2. Comparação entre a composição de aminoácidos de 3 espécies de microalgas, com farinhas de peixe e albumina.

Aminoácidos essenciais	<i>Chlorella sorokiniana</i> ¹	<i>Nannochloris bacillaris</i> ²	<i>Spirulina maxima</i> ³	Farinha de peixe ⁴	Albumina ⁵
	----- g 100 g ⁻¹ -----				
Arginina	3,71	6,2	5,22	3,43-4,02	6,2
Cistina	1,07	ND	ND	0,47-1,6	2,3
Fenilalanina	3,4	5,9	3,32	2,15-2,68	5,8
Histidina	1,02	1,5	0,99	1,34-1,78	2,4
Isoleucina	2,73	5,2	3,91	2,45-3,64	6,6
Leucina	5,69	9,3	5,68	3,79-5,0	8,8
Lisina	5,17	6,01	3,48	4,22-7,3	5,3
Metionina	1,08	1,9	1,88	1,47-2,2	3,2
Treonina	2,91	4,8	3,68	2,31-2,82	5
Triptofano	0,6	4,5	0,98	0,57-0,76	1,7
Valina	3,6	6,5	5,1	2,77-3,51	7,2

¹RSC, Barone; ²(Tibbetts *et al.*, 2015); ³(Olvera-Novoa *et al.*, 1998); ⁴NRC (2011); ⁵Becker, (2013a);
 ND – Não determinado

O conteúdo lipídico das microalgas pode variar de 16 a 77% da biomassa seca (Chisti, 2007, Chauton *et al.*, 2015, Ranjitha and Vijayalakshmi, 2015), sendo que algumas espécies ou cepas são ricas em ácidos graxos poli insaturados da série n-3, em especial o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o docosaexaenoico (DHA) (Harun *et al.*, 2010; Chauton *et al.* 2015), ambos apontados como benéficos à saúde humana (Hammad *et al.*, 2016, Wall *et al.*, 2010, Simopoulos, 2008). Entretanto, existem variações quanto a quantidade, qualidade dos nutrientes e perfil nutricional em uma mesma espécie de microalga em função de uma série de fatores: (i) sistema utilizado para sua produção; (ii) fase de colheita da microalga; (iii) estresse do sistema de produção pela manipulação das variáveis físico-químicas da água bem como existe a possibilidade de alteração do seu perfil nutricional através da manipulação das variáveis (Chisti, 2007), o que de certa forma é um obstáculo para o fornecimento de produtos padronizados para a indústria da nutrição animal, por exemplo.

No entanto, é evidente que as microalgas possuem diversas propriedades e características desejáveis para a nutrição de organismos aquáticos e, apesar da escassez de relatos sobre os resultados da incorporação da biomassa de microalgas em rações, alguns autores têm conseguido bons resultados (Tabela 3).

Tabela 3. Compilação de estudos que utilizaram microalgas na nutrição de peixes e os principais resultados obtidos.

Espécie (s) de Microalga (s)	Espécie (s) de peixe (s)	Peso inicial / Tempo	Tipo de experimento	Principais resultados	Referência
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	1,13g / 12 semanas	Inclusão como aditivo, níveis entre 1,0-4,0%	Níveis de 2% e 4% tiveram os melhor GP e TEP.	(Kim <i>et al.</i> , 2002)
<i>Chlorella sp.</i>	<i>Sebastes schlegeli</i>	1,5g / 12 semanas	Inclusão como aditivo, níveis entre 0,5-4,0%	Inclusão de 0,5% aumentou o GP, TCE, CA e TEP.	(Bai <i>et al.</i> , 2001)
<i>Chlorella sp.</i>	<i>Carassius auratus gibelio</i>	29,9g / 60 dias	Cinco níveis de suplementação 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2%	Todos os níveis acima de 0,8% aumentaram o GP, TCE, CA e TEP.	(Xu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Acipenser ruthenus</i>	18g / 62 dias	Aditivo na dieta 25g kg ⁻¹	A coloração dos animais ficou mais intensa nas dietas que continham microalga.	(Sergejevova and Masojidek, 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Sparus aurata</i>	145,2g / 9 semanas	Fonte de carotenóides	Aumento da pigmentação da pele, olhos e nadadeiras.	(Gouveia <i>et al.</i> , 2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Salmo salar</i>	107g / 4 semanas	Inclusão de 20%	Tratamento com <i>Chlorella</i> melhorou a saúde intestinal, a composição da microbiota e foi eficiente para a prevenção da enteropatia causada pelo farelo de soja.	(Grammes <i>et al.</i> , 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	90g / 21 dias	Dois níveis de suplementação na dieta 5 e 10%	10% de suplementação melhorou a resposta ao stress oxidativo e imunostimulação do sistema inato.	(Zahran and Risha, 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Arthrospira maxima</i>	<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carassius auratus</i>	24,6g carpa; 0,9g goldfish / 10 semanas	Inclusão das diferentes espécies de microalgas como fonte de carotenóides	Tratamentos com <i>Chlorella</i> aumentaram significativamente a coloração das duas espécies.	(Gouveia <i>et al.</i> , 2003)
<i>Cryptocodinium cohnii</i> ; <i>Phaedactylum tricornutum</i>	<i>Sparus aurata</i>	0,7g / 57dias	Três tratamentos: 2% e 4% de <i>C. cohnii</i> e 5% <i>P. tricornutum</i> de inclusão como fonte lipídica.	Tratamentos com <i>C. cohnii</i> melhoraram a sobrevivência e aumentaram o GP.	(Atalah <i>et al.</i> , 2007)
<i>Entomoneis spp</i>	<i>Salmo salar</i>	33,7g / 84 dias	Inclusão como fonte lipídica. Níveis de 2,5 e 5%	Não houveram alterações nos parâmetros de desempenho zootécnico, porém a inclusão de 5% reduziu a digestibilidade dos macros nutrientes.	(Norambuena <i>et al.</i> , 2015)
<i>Gracilaria sp.</i> , <i>Alaria sp.</i>	<i>Argyrosomus regius</i>	39,70 / 69 dias	Suplementação de 5% com cada uma das espécies de microalgas	As dietas com suplementação de microalgas aumentaram a resistência à infecção de patógenos	(Peixoto <i>et al.</i> , 2016)

Espécie (s) de Microalga (s)	Espécie (s) de peixe (s)	Peso inicial / Tempo	Tipo de experimento	Principais resultados	Referência
<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Carassius auratus</i>	3,4mg / 28 dias	Fonte de proteína e subst. do premix vitamínico	Permitiu a inclusão de até 25% como fonte proteica, mas não foi possível subst. o premix vitamínico.	(Coutinho <i>et al.</i> , 2006)
<i>Isochrysis sp</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	142g / 121 dias	Substituição de 10 e 20% da proteína bruta proveniente da farinha de peixe e 18 e 36% de substituição do óleo de peixe.	Não houve nenhuma diferença nos parâmetros zootécnicos entre os tratamentos e o controle.	(Tibaldi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Sparus aurata</i>	100g / 2 e 4 semanas	Dois níveis de inclusão de cada espécie de microalga 50 e 100g kg ⁻¹	Aumento significativo da atividade do sistema complemento e capacidade fagocítica das células de defesa nos tratamentos com microalgas.	(Cerezuela <i>et al.</i> , 2012c)
<i>Nanofrustulum sp.</i> , <i>Tetraselmis sp.</i>	<i>Salmo salar</i> , <i>Cyprinus carpio</i>	173,1g salmão, 10,9g carpa / 12 semanas	Substituição de 5 e 10% da farinha de peixe no salmão e 25 e 40% na carpa para cada espécie de microalga	No salmão não houve diferenças no desempenho zootécnico e na carpa os tratamentos com <i>Nanofrustulum sp.</i> reduziram o conteúdo lipídico nos peixes.	(Kiron <i>et al.</i> , 2012)
<i>Navicula sp.</i> ; <i>Chlorella sp.</i> ; <i>Nannochloropsis salina</i>	<i>Sciaenops ocellatus</i>	5,2g / 7 semanas	Subst. 5 e 10% da farinha de peixe por composto de microalgas	Substituição de 10% pela farinha de <i>Navicula sp.</i> não alterou os parâmetros de desempenho.	(Patterson and Gatlin, 2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Sparus aurata</i>	50g / 2 e 4 semanas	100g kg ⁻¹ de inclusão de cada espécie de microalga	Tratamento com <i>Phaeodactylum</i> obteve as melhores respostas como imunoestimulante.	(Cerezuela <i>et al.</i> , 2012b)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Sparus aurata</i>	50g / 4 semanas	100g kg ⁻¹ de inclusão de cada espécie de microalga	Não houve alterações significativas nos parâmetros histológicos, mas houve uma diminuição na diversidade e riqueza da microbiota.	(Cerezuela <i>et al.</i> , 2012a)
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	<i>Sparus aurata</i>	8g / 45 dias	Níveis de inclusão na dieta: 12, 20, 25 e 39%	20% de inclusão aumentou significativamente a capacidade absorviva da mucosa intestinal e tenderam apresentar os melhores resultados de GP e TEP.	(Vizcaino <i>et al.</i> , 2014)
<i>Schizochytrium sp.</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	1,52g / 84 dias	Quatro níveis de substituição de óleo de peixe 25; 50; 75 e 100%	100% de substituição significativamente melhoraram a CA, GP e TEP.	(Sarker <i>et al.</i> , 2016b)

Espécie (s) de Microalga (s)	Espécie (s) de peixe (s)	Peso inicial / Tempo	Tipo de experimento	Principais resultados	Referência
<i>Schizochytrium sp.</i> , <i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>		Substituição do óleo de soja e óleo de peixe pelas duas espécies de microalgas	As substituições das fontes de óleo pelas espécies de microalgas mantiveram os mesmos níveis de desempenho zootécnico.	(Qiao <i>et al.</i> , 2014)
<i>Spirulina maxima</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	0,02g / 9 semanas	Substituição da farinha de peixe: 20, 40,60,80 e 100%	Permitiu a substituição de até 40%.	(Olvera-Novoa <i>et al.</i> , 1998)
<i>Spirulina plantensis</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	100g / 2 semanas	Administração oral de três diferentes doses de <i>Spirulina</i> 1mg, 10mg e 25mg peixe ⁻¹	Tratamentos com <i>Spirulina</i> melhoram a resposta ao stress oxidativo e aumentaram a atividade fagocítica nas células do rim cefálico.	(Watanuki <i>et al.</i> , 2006)
<i>Spirulina sp.</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,02g / 11 semanas	100% de substituição do glúten de milho.	Tratamento com <i>Spirulina</i> aumentou o GP e TCE.	(Hussein <i>et al.</i> , 2013)
<i>Spirulina sp.</i>	<i>Acipenser baeri</i>	92g / 12 semanas	Níveis de substituição da farinha de peixe: 40, 50 e 60%	Possibilitou a substituição de 60% com melhora no GP e CA.	(Palmegiano <i>et al.</i> , 2005)
<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	69,4g / 63 dias	Subst. da fonte proteica em 10 e 20%	Permitiu a subst. sem prejuízo no desempenho e piorou a digestibilidade das rações.	(Tulli <i>et al.</i> , 2012)

GP – Ganho de peso; TEP – Taxa de eficiência proteica; TCE – Taxa de crescimento específico; CA – Conversão alimentar.

As microalgas já foram testadas na nutrição de outros animais e com resultados interessantes em termos de ganhos de qualidade e desempenho. Por exemplo:

- o uso de *Spirulina sp.* na alimentação de gado leiteiro alterou o perfil de ácidos graxos do leite, diminuindo a quantidade de gorduras saturadas e aumentando a proporção de DHA em sua composição (Kupczynski *et al.*, 2011; Christaki *et al.*, 2012);
- a suplementação com *Spirulina platensis* em *Bos indicus* aumentou o consumo de feno e a eficiência de produção de proteína microbiana no rúmen (Costa *et al.*, 2016);
- a adição de *Spirulina platensis* na dieta possibilitou o aumento no ganho de peso e consumo de ração durante o desmame de suínos (Grinstead *et al.*, 2000);
- o uso de *Spirulina* como suplemento mineral melhorou em 30% a absorção de micronutrientes por suínos (Saeid *et al.*, 2013);

- a adição da microalga *Porphyridium* sp. como suplemento nutricional na dieta de aves reduziu os níveis de colesterol sanguíneo em até 28% e aumentou a concentração dos ácidos linoleico e araquidônico nas gemas dos ovos em 29 % e 24 %, respectivamente (Ginzberg *et al.*, 2000).

Embora diversos trabalhos apresentem resultados promissores, o uso das microalgas na nutrição animal ainda é insignificante. Uma das razões é o baixo volume e, principalmente, o alto custo de obtenção dos concentrados de algas, a matéria prima para a produção de farinha de microalgas (Walker, 2009). Entretanto, existem técnicas emergentes que utilizam coagulantes e floculantes que permitem a obtenção de concentrados de microalgas a custos mais acessíveis (Schlesinger *et al.*, 2012), o que, em curto e médio prazo, pode viabilizar sua produção em grande escala e tornar seu uso mais acessível.

2.5. Microalgas como alimento funcional

Diversas espécies de microalgas apresentam moléculas e substâncias com ações antioxidantes, imunoestimulantes e moduladoras do metabolismo. O β -1,3-glucano, que possui ação imunoestimulante em peixes, é encontrado em algumas cepas de *Chlorella* sp. (Meena *et al.*, 2013, Richmond and Hu, 2013). Entre os antioxidantes, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são exemplos de espécies ricas em carotenoides, mais especificadamente de β -caroteno e astaxantina, respectivamente (Ng *et al.*, 2015). Existem também espécies ricas em outro grupo de pigmentos com características antioxidantes, que são as ficobiliproteínas, como por exemplo, a *Spirulina* sp. e *Porphyridium* sp., ricas em ficocininas e ficoeritrinas (Christaki *et al.*, 2015, Borowitzka, 2013). Apesar da grande variação da composição, as microalgas, de maneira geral, também são organismos ricos em vitaminas, principalmente vitamina C e riboflavina, que em algumas espécies chegam a 16 mg g⁻¹ e 50 μ g g⁻¹ de biomassa seca, respectivamente (Brown *et al.*, 1999, Brown and Miller, 1992).

Os ácidos graxos poli-insaturados [PUFAs], principalmente os da série n-3, são reconhecidos por trazerem benefícios a saúde humana, por terem um importante papel na prevenção e tratamento de doenças cardíacas, hipertensão, diabetes, artrite e outras doenças inflamatórias e autoimunes. As microalgas

produzem PUFA's como o ácido araquidônico (20:4 n-6) (espécies do gênero *Porphyridium*), ácido eicosapentanoico (20:5 n-3) (*Nannochloropsis*, *Phaedactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacronema*) e ácido docosaexaenoico (22:6 n-3) (*Cryptothecodinium*, *Schizochytrium*) (Guedes *et al.*, 2015, Kent *et al.*, 2015, Simopoulos, 2008) e, portanto, podem ser fontes desses lipídios quando adicionadas às dietas, inclusive como alternativa ao óleo de peixe.

2.6. Considerações e restrições do uso de microalgas em nutrição animal

Microalgas possuem alta capacidade reprodutiva; algumas espécies são capazes de duplicar ou até triplicar sua biomassa em um ou dois dias (He *et al.*, 2016). Devido a essa capacidade, muitos produtos oriundos de microalgas possuem uma alta concentração de ácidos nucleicos em sua composição – de 4 a 6% em matéria seca (Becker, 2013b).

Os ácidos nucleicos são fontes de purinas, cujo catabolismo em humanos tem como um de seus produtos o ácido úrico, que em grandes quantidades pode desencadear o aparecimento de doenças. Porém, em outras espécies de mamíferos, que apresentam a enzima uricase que converte ácido úrico em metabólitos que podem ser eliminados na urina, seu acúmulo não é prejudicial (Maiuolo *et al.*, 2016). Em peixes, as purinas não chegam a formar ácido úrico e os produtos de seu catabolismo são eliminados nas brânquias, como nitrogênio urinário, mas na forma de amônia (Walsh and Mommsen, 2001). Dessa forma, conforme a destinação do produto oriundo de microalga, esse é um fator a ser considerado.

Algumas microalgas, principalmente as cianobactérias, são conhecidas pela superflorescência e produção de toxinas. *Microcystis* sp. e *Anabaena* sp. são exemplos de gêneros que possuem relatos de superflorescências tóxicas, no entanto, apesar de não serem utilizadas na nutrição animal, são morfologicamente indistinguíveis com espécies não tóxicas e, apesar de existir a possibilidade de ocorrência de toxinas em produtos oriundos de microalgas, ainda não foi encontrado nenhum relato em produtos para a nutrição animal e humana com problemas de ficotoxinas (Rasmussen *et al.*, 2016, Manganelli, 2016, Becker, 2007).

Padrões de qualidade em termos de composição nutricional são fatores importantes a serem considerados para o uso de um ingrediente na nutrição animal, principalmente para garantir os valores de composição e a previsibilidade de

formulações. Na produção de microalgas existe uma série de fatores que podem alterar consideravelmente a composição do produto final, com destaque para:

- crescimento de outros organismos unicelulares, como bactérias e protozoários, no sistema de produção (Becker, 2013a);
- espécie utilizada, haja vista que espécies do mesmo gênero podem ter grandes variações em termos de composição nutricional (Tabela 1);
- condições do sistema de produção (autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico) e estresses físico-químicos aos quais as microalgas foram submetidas. Quanto a essas variáveis, é possível manipular intencionalmente a composição do produto final alterando a concentração de CO₂, salinidade, luminosidade, temperatura, Ph e concentrações de macro e micronutrientes do meio de produção (Chauton *et al.*, 2015, He *et al.*, 2016, Mahboob *et al.*, 2012);
- fase de crescimento em que foi realizada a colheita, sendo que, de forma geral, as tardias (acima de 6 dias) possuem um conteúdo maior de lipídios, as intermediárias (entre 3 a 5 dias) de carboidratos e as colheitas que ocorrem antes da depleção dos nutrientes possuem maior quantidade de proteína (Templeton and Laurens, 2015, He *et al.*, 2016) (Figura 3).

Figura 3. Variação da composição nutricional da microalga *Isochrysis galbana*, em termos de biomassa, concentração de carboidratos, lipídios e proteínas (eixo secundário) em função do tempo de produção. Adaptado de He *et al.* (2016).

Outro fator importante a ser considerado para a inclusão de microalgas como fontes de proteína é o método utilizado para a determinação da porcentagem de proteína bruta. O método comumente utilizado para a determinação de proteína é o método de Kjeldahl, que consiste basicamente na digestão da amostra, conversão do nitrogênio (N) constituinte da amostra em amônio para posterior quantificação por titulação em solução de ácido clorídrico. A concentração de N total é então convertida à proteína por um fator de conversão de 6,25 (esse fator considera que o N representa 16% do peso da proteína, portanto $100\text{g} \div 16\text{g} = 6,25$). No entanto, a limitação desse método é que, ao transformar N total em proteína, ele superestima a quantidade de proteína bruta em amostras que possuem alta concentração de nitrogênio não proteico de fontes orgânicas (aminoácidos livres, nucleotídeos, ácidos nucleicos, aminossacarídeos, peptídeos, clorofila) como é o caso das microalgas. (Benedict, 1987, Mariotti *et al.*, 2008, Lourenço *et al.*, 2004, Templeton and Laurens, 2015, Angell *et al.*, 2016).

Dessa forma, é comum encontrar relatos de altos conteúdos proteicos (acima de 60%) em espécies de microalgas, principalmente dos gêneros *Spirulina* sp. e *Chlorella* sp., quantificados pelo método de Kjeldahl, o que deve ser considerado com cautela, pela possibilidade de não representar o real conteúdo proteico das biomassas avaliadas. O processamento da biomassa de microalgas para transformá-la em uma farinha também pode ter consequências na qualidade do produto final em função do tratamento aplicado, sendo que os métodos mais baratos, como a secagem ao sol, podem levar a uma redução de até 27% na quantidade de proteína do produto final proveniente de *Spirulina* sp., por exemplo (Tabela 4). Diante do exposto, a ascensão do uso de microalgas na nutrição animal deverá essencialmente passar por um processo de padronização de qualidade, em que deverão ser considerados a cadeia animal para qual será destinado o produto, a presença de toxinas, os sistemas de produção adotados, fases e métodos empregados na colheita, processamento da biomassa em farinhas e principalmente o perfil nutricional e as características da espécie de microalga de interesse.

Tabela 4. Relação entre o método de secagem empregado e a razão de eficiência entre quantidade de proteína bruta final / proteína bruta inicial no produto obtido de biomassa de algas. Adaptado de Becker (2013).

Método de secagem	Nº de repetições	Eficiência $PB_{final}/PB_{inicial}$ %
Convecção 40°C, camada 3 mm	3	73
Convecção 60°C, camada 3 mm	3	81
Forno e convecção 40°C; camada 1,5 mm	6	89
Forno e convecção 60°C; camada 1,5 mm	7	84
Infravermelho 40°C; camada 1,5 mm	2	85
Infravermelho 40°C; camada 3 mm	3	76
Infravermelho 60°C; camada 1,5 mm	2	90
Infravermelho 60°C; camada 3 mm	2	76
Liofilização	4	95
Spray drying 95 - 150°C	3	86

2.7. *Schizochytrium* sp.

Schizochytrium sp. (Fungi; Myxomycota; Saprolegniales; Thraustochytriaceae) é uma microalga marinha que possui metabolismo heterotrófico, reprodução assexuada com formação de zoósporos flagelados, característica comum a algumas bactérias e fungos (Hong *et al.*, 2011). A maioria das cepas de *Schizochytrium* sp. utilizadas foram inicialmente isoladas de folhas de *Rhizophora apiculata*, uma planta que habita os mangues do Vietnam.

São organismos unicelulares de formato esférico, com tamanho entre 9 a 20 µm (Figura 4), capazes de formar colônias e cistos de resistência. A parede celular dessas espécies é caracterizada por um alto teor de proteína e baixa concentração de polissacarídeos, formados basicamente por galactose e xylose (Bongiorni, 2012, Hong *et al.*, 2011, Yokoyama and Honda, 2007).

Figura 4. *Schizochytrium* sp.: (a) fotomicrografia obtida por microscopia de luz (aumento x400) e (b) fotomicrografia obtida por microscopia de varredura (aumento x5.000). Imagem: Hong *et al.* (2011).

Essa espécie de microalga foi reconhecida pelas indústrias por sua composição em ácidos graxos poli-insaturados da série n-3, mais especificadamente pelo ácido docosaexaenoico – (DHA; C22:6n-3), a presença de β -caroteno e também por sua alta produtividade em sistemas heterotróficos, algo em torno de 23 g L⁻¹ em matéria seca (Hong *et al.*, 2011, Yokoyama and Honda, 2007). Diante disso, e dado o potencial de aplicação na indústria de cosméticos e nutrição animal, em que geralmente são comercializadas com as células íntegras liofilizadas, alguns produtos provenientes da *Schizochytrium* surgiram no mercado (Figura 5). Considerando-se a projetada escassez de fontes de óleo de peixe oriundos de captura e, conseqüentemente, a carência de fontes de ácidos graxos poli-insaturados para a nutrição humana e animal (Tacon and Metian, 2008), antecipa-se um grande potencial de crescimento da produção de *Schizochytrium* para atender essa demanda nos próximos anos.

Figura 5. Fotomicrografia de *Schizochytrium* sp. íntegra liofilizada (aumento x1.000). Imagem: RSC Barone.

2.8. *Chlorella sorokiniana*

As cepas do gênero *Chlorella* (Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae; Chlorellales; Chlorellaceae) são organismos unicelulares de formato esférico ou elipsoidal (Figura 6), de reprodução assexuada com produção de zoósporos (Liu and Chen, 2016) e que habitam águas doces, marinhas, solos e também ocorrem em associação simbiótica com líquens. A composição da parede celular das espécies que do gênero varia amplamente intra e interespecies; neste último caso a variação se deve ao processo de produção e colheita, portanto é muito difícil ter uma caracterização precisa de sua composição. No entanto, a presença de alguns polissacarídeos como a fucose, xylose, manose, galactose, glucose e, principalmente, a acetilglucosamina, cuja a composição se assemelha as quitinas presentes nos insetos e fungos, são frequentes nas espécies desse gênero (Gerken *et al.*, 2013).

Figura 6. Fotomicrografia de *Chlorella sorokiniana* íntegra liofilizada (aumento x20.000). Imagem: RSC Barone.

As algas do gênero *Chlorella* são produzidas em larga escala e os primeiros registros de produção de biomassa datam de meados de 1940, com experiências quase que simultâneas nos Estados Unidos, Alemanha e Japão. São espécies que permitem a utilização de sistemas fototróficos, heterotróficos e mixotróficos (Liu and Chen, 2016, Mortensen and Gislerod, 2016, Kotrbacek *et al.*, 2015, Mitra *et al.*, 2012)

O interesse comercial pela *Chlorella* é motivado pela alta concentração de proteína e a presença de carotenoides, antioxidantes e vitaminas em sua composição. Aliado a esse perfil nutricional, ressalta-se ainda a relativa facilidade e adaptação a diferentes sistemas de produção, quando comparada a outras espécies de microalgas (Matos *et al.*, 2016, Kotrbacek *et al.*, 2015, Sergejevova and Masojidek, 2012). Os principais produtores de *Chlorella* são China e Japão, com uma produção de 3.500 t registradas em 2005, sendo comercializada principalmente como farinhas, cápsulas e tabletes para a nutrição humana (Liu and Chen, 2016).

2.9. A tilápia, *Oreochromis* sp.

Os peixes do gênero *Oreochromis* sp. (Perciformes: Cichlidae) são vernacularmente chamadas tilápias. São espécies de origem endêmica aos lagos africanos, do rio Nilo e rio Jordão em Israel dependendo do gênero, mas foram introduzidas em diversos países de clima tropical e subtropical durante a segunda

metade do século XX (Zengeya *et al.*, 2015, Eknath and Hulata, 2009). As tilápias estão em segundo lugar em termos de volume de produção, aproximadamente 3×10^6 t no ano de 2009 (Ng and Romano, 2013b) dentre as espécies de água doce produzidas no mundo, sendo a espécie mais produzida no Brasil – cerca de $2,8 \times 10^5$ t em 2014 (Fontes *et al.*, 2016).

Tilápias são predominantemente herbívoros na fase adulta, com uma dieta composta basicamente de fitoplâncton, macrófitas e algas filamentosas, que apresentam características morfológicas, como rastros branquiais longos e estreitos e intestinos longos (7 a 14 vezes o seu tamanho padrão), e características fisiológicas de baixo pH estomacal (entre 1,5 e 2) para aproveitamento de dietas com pouca quantidade de proteína (Beveridge and Baird, 2000, McAndrew, 2000, Britz, 2008).

As fases jovens das tilápias apresentam hábitos onívoros, tendo como principais fontes alimentares fitoplâncton, zooplâncton, fauna bentônica, insetos, crustáceos, filmes bacterianos e perifíton. A plasticidade adaptativa, rusticidade no manejo, facilidade na reprodução e ampla tolerância a qualidade de água, aliadas ao desenvolvimento de pacotes tecnológicos de produção, seleção genética e grande aceitação no mercado consumidor, tornam as tilápias uma das principais espécies para a produção aquícola (Edwards, 2015, Kobayashi *et al.*, 2015, Scorvo Filho *et al.*, 2010, Eknath and Hulata, 2009, Britz, 2008). Desta forma, todo o produto que tenha viabilidade de ser utilizado na dieta da tilápia, a exemplo das microalgas, possui, ao mesmo tempo, um grande potencial de expansão de mercado com possibilidade de ganhos de produção e comercialização em escala mundial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Determinação da digestibilidade de farinhas de microalgas

Foram realizados ensaios de digestibilidade para as farinhas das microalgas *Chlorella sorokiniana* (produto experimental; Algae Biotecnologia, Piracicaba, SP) e *Schizochytrium* sp. (All G Rich[®]; Altech, Nicholasville, KY, USA). Os processos de produção e processamento das farinhas são informações proprietárias das empresas, inacessíveis mesmo para estudos acadêmicos.

Digestibilidade da farinha de *Schizochytrium* sp.

Juvenis de tilápia ($n = 150$; $28,55 \pm 3,00$ g) foram aclimatados às condições de laboratório (caixas de polipropileno; 500 L), alimentados por 15 dias em três refeições diárias com ração comercial (32% PB). Em seguida, grupos de 30 animais eram aleatoriamente separados e estocados em tanques cilíndrico-cônicos (200 L) e condicionados por 10 dias às rações experimentais, mesmo regime alimentar. Os tanques eram abastecidos em sistema aberto, com renovação de contínua de água e controle de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), oxigênio dissolvido ($5,0 \pm 0,5$ mg L⁻¹), luminosidade (12h luz+12h escuro) e pH ($7 \pm 0,5$).

Os peixes eram alimentados até a saciedade aparente por três vezes ao dia (8h00m, 12h00m e 18h00m) com as dietas-teste e após a última refeição do dia os aquários eram limpos e as coletas de fezes realizadas por sedimentação pelo método indireto (Guelph adaptado) descrito em NRC (2011). A coleta de fezes iniciava-se às 19h00m a partir do acoplamento aos aquários dos recipientes de coleta (200 mL), mantidos refrigerados em gelo, e terminava às 7h00m do próximo dia. As fezes coletadas eram centrifugadas (3.100 g; 5°C ; 10min) e imediatamente armazenadas em ultra congelador (-80°C). Posteriormente eram retirados contaminantes (escamas) e as amostras eram liofilizadas e enviadas ao laboratório para as análises de composição. Ao final do período de coleta, os animais retornavam à caixa comum para descanso e 48 horas depois grupos de 30 indivíduos eram amostrados aleatoriamente e alojados nos aquários de coleta de fezes caracterizando uma repetição no tempo ($n = 3$).

Digestibilidade da farinha de *Chlorella* sp.

Juvenis de tilápia ($78,01 \pm 1,87$ g) foram mantidos por 20 dias em uma caixa de 500L e alimentados com ração comercial com 32% de proteína. Após esse período 120 indivíduos foram divididos em seis grupos de 20 animais e alojados nos aquários de coleta de fezes em um delineamento experimental casualizado, com dois tratamentos e três repetições simultâneas. Durante 10 dias foram adaptados às dietas experimentais e nos três dias subsequentes foram realizadas as coletas de fezes, seguindo o mesmo protocolo adotado para o ensaio de digestibilidade com a farinha de *Schizochytrium* sp.

Rações experimentais

Foram confeccionadas uma dieta basal, nutricionalmente completa, atendendo as exigências da espécie de acordo com Furuya et al. (2010) e Portz e Furuya (2012), e duas dietas experimentais, que consistiam na substituição de 30% da dieta basal pelos ingredientes teste (Tabela 5). Todas as dietas foram adicionadas de 0,2% de óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador inerte (Goncalves et al., 2015).

Os ingredientes utilizados foram finamente moídos em moinho de facas móvel utilizando a peneira de 1,0 mm, homogeneizados e misturados. Foi então feita adição de água na quantidade de 20% v:p à mistura (Storebakken et al., 2015) que foi processada em extrusora experimental (Imbramaq, Ribeirão Preto, SP) em matriz de 3,0 mm. As rações foram secas em estufa de ventilação forçada (45°C) por 24 horas, armazenadas em sacos plásticos em ambiente refrigerado (4 °C) até o momento do uso.

Tabela 5. Composição de ingredientes e nutricional das dietas para os ensaios de digestibilidade das farinhas de *Schizochytrium* e *Chlorella*.

Ingredientes (%)	Ref SCI	Ref CHO	70%Ref SCI+30%SCI	70%Ref CHO+30%CHO
Farelo Soja	47,35	47,35	-	-
Milho moído	28,31	28,31	-	-
Glúten de milho	11,20	11,20	-	-
Farelo Trigo	10,00	10,00	-	-
Óleo Soja	1,71	1,71	-	-
Celulose	0,24	0,24	-	-
Metionina	0,27	0,27	-	-
Óxido de crômio III	0,20	0,20	-	-
Premix vit/min	0,80	0,80	-	-
BHT	0,02	0,02	-	-
NaCl	0,10	0,10	-	-
Composição proximal (%)				
Proteína bruta	37,9	36,5	35,69	41,6
Extrato etéreo	6,8	3,1	14,01	3,6
Fibra bruta	2,7	4,1	2,88	4,01
Matéria mineral	4,88	4,84	5,00	5,38
Nitrogênio não proteico	0,36	0,39	0,43	0,41
Óxido de crômio III	0,179	0,160	0,189	0,160
Energia (cal/g)	4712,8	4878,0	5051,3	4937,1

¹ Mistura mineral e vitamínica Premix Nutrifish Guabi® (Campinas, SP, Brasil). Níveis de garantia do produto: Fe 1500 mg; Cu 1500 mg; Zn 12500 mg; I 375 mg; Mn 12500 mg; Se 87,5 mg; Co 125 mg; vit. A 2.500.000 IU; vit. D 3.600.000; vit. E 37.500 IU; vit. K 3750 mg; vit.C 50.000 mg; vit. B1 4.000 mg; vit. B2 4.000 mg; vit. B6 4.000 mg; vit. B12 4.000 mg; ác. Pantotênico 12.000 mg; biotina 15 mg; ác. Fólico 1.250 mg; niacina 22.500 mg; BHT 15.000 mg

² butil-hidroxi-tolueno

³ base matéria seca

Análises de Composição

As análises de composição proximal das rações, dos ingredientes teste e das fezes, foram realizadas por laboratório certificado (CBO análises laboratoriais, Campinas, SP) conforme metodologia descrita pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1999) (Tabela 6). As rações e ingredientes teste foram analisados quanto aos seus conteúdos de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta (fator de conversão de Kjeldahl), extrato etéreo, energia bruta, fibra bruta e nitrogênio não proteico, sendo que foram analisados os aminoácidos para as amostras relativas aos ensaios de digestibilidade da farinha de *Chlorella* sp. e ácidos graxos somente para as amostras relativas aos ensaios com a farinha de *Schizochytrium* sp. (Tabela 7).

Tabela 6. Análises realizadas e os respectivos métodos utilizados.

Análise	Método
Matéria seca	Secagem em forno
Proteína bruta	N*6,25 (Kjeldahl)
Extrato etéreo	Digestão ácida e lavagem com éter
Cinzas	Queima em forno mufla
Energia bruta	Combustão em bomba calorimétrica
Fibra bruta	Digestão ácida e básica
Perfil de aminoácidos	Cromatografia líquida de alta eficiência
Perfil de ácidos graxos	Cromatografia gasosa
Nitrogênio não proteico	Digestão ácida

Tabela 7. Composição nutricional das farinhas de *Schizochytrium* sp. e *Chlorella* sp.

Composição proximal ¹	Farinha <i>Schizochytrium</i> sp.	Farinha <i>Chlorella</i> sp.
	----- % -----	
Proteína bruta	12,45	69,06
Extrato etéreo	72,78	0,57
Fibra bruta	2,29	0,23
Matéria mineral	4,53	8,7
Nitrogênio não proteico	0,96	0,77
Energia (kJ g ⁻¹)	32,02	22,04
Aminoácidos essenciais²	-	60,92
Arginina	-	3,71
Treonina	-	2,91
Valina	-	3,6
DL-Metionina	-	1,08
Cistina	-	1,07
Isoleucina	-	2,73
Leucina	-	5,69
Fenilalanina	-	3,4
L-Lisina	-	5,17
Ácidos graxos³		
Gorduras Monoinsaturadas	0,63	-
Gorduras Poli-insaturada	53,99	-
Gorduras Insaturadas	54,62	-
Gorduras Saturadas	17,61	-
20:5n-3 EPA	0,49	-
22:6n-3 DHA	53,14	-
n-3	53,67	-
n-6	0,45	-
n-9	0,21	-

¹ Base matéria seca.² Exceto triptofano³ Perfil completo de ácidos graxos da *Schizochytrium* e de aminoácidos da *Chlorella* estão disponíveis no Apêndice A.

Cálculo dos Coeficientes de Digestibilidade Aparente

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes, energia e aminoácidos foram determinados utilizando-se as seguintes fórmulas:

(i) Coeficiente de digestibilidade aparente para os nutrientes (NRC, 2011):

$$CDA = 1 - \frac{Cr2O3 \text{ na ração}}{Cr2O3 \text{ nas fezes}} \times \frac{Nutriente \text{ nas fezes}}{Nutriente \text{ na ração}}$$

(ii) Coeficiente de digestibilidade aparente para os ingredientes (NRC, 2011):

$$CDA_{\text{Ingrediente teste}} = CDA_{\text{Dieta teste}} + ((CDA_{\text{Dieta teste}} - CDA_{\text{Dieta ref.}}) \times \left(\frac{0,7 \times N_{\text{Dieta ref.}}}{0,3 \times N_{\text{Ingrediente}}} \right))$$

em que:

CDA = coeficiente de digestibilidade aparente

N = quantidade ou porcentagem do nutriente

Modelo para a estimativa de preço da farinha de *Chlorella* sp. para uso como ingrediente

O modelo de estimativa de preço para uso da farinha de *Chlorella* sp. como ingrediente proteico em rações utilizou como balizador os principais ingredientes proteicos utilizados em rações de peixes: o farelo de soja e a farinha de peixe. A partir das informações sobre o histórico de preços de cada uma desses produtos (<http://www.worldbank.org/en/research/commodity-markets>), calculou-se o preço da proteína digestível desses produtos da seguinte maneira:

$$D_i = (100 \times C) / (PB \times CDA_{(p)})$$

em que:

D_i = preço da proteína digestível do ingrediente;

C = preço médio do ingrediente (USD kg⁻¹);

PB = porcentagem de proteína bruta no ingrediente;

$CDA_{(p)}$ = coeficiente de digestibilidade da proteína do ingrediente;

Para os valores de $CDA_{(p)}$ e PB da soja e da farinha de peixe, utilizou-se como referência para o cálculo o trabalho de Gonçalves et al. (2009) e para os valores de “C”, a partir da série gerada com os dados do Banco Mundial, calculou-se

a média de preço por quilograma dos últimos cinco anos. A partir desses resultados, estimou-se o preço (USD kg⁻¹) da farinha de *Chlorella* sp. pela seguinte fórmula:

$$D_{(chl)} = (D_i \times PD_{(chl)}) / PD_i$$

em que:

D_i = preço da proteína digestível do ingrediente;

$D_{(chl)}$ = preço da proteína digestível da farinha de *Chlorella* sp.;

PD_i = porcentagem de proteína digestível no ingrediente;

$PD_{(chl)}$ = porcentagem de proteína digestível da farinha de *Chlorella* sp.;

3.2. Determinação da digestibilidade das rações do ensaio de desempenho

Juvenis de tilápia (17,99 ± 0,95g) foram mantidos em uma caixa de polipropileno (500L) por 10 dias, alimentados com ração comercial 32% PB para aclimação ao sistema. Em seguida, foram agrupados em seis aquários cilíndrico cônicos (200 L; 18 indivíduos por aquário) e alimentados com as dietas experimentais até a saciedade aparente em três refeições diárias (8h30m; 12h00m e 18h:00m) durante 10 dias. Passado o período de aclimação às dietas, procedeu-se à coleta de fezes utilizando-se o mesmo protocolo adotado para os ensaios de digestibilidade das farinhas de algas anteriormente descritos.

Para obtenção das dietas experimentais, alíquotas (2,0 kg) de cada uma das rações utilizadas no ensaio de desempenho (Tabela 8) foram moídas, reduzidas a granulometria uniforme em peneira 841 µm, e ao material resultante foi adicionado e homogeneizado óxido de cromo III (Cr₂O₃). À mistura resultante foi adicionada uma quantia de água referente a 20% de seu peso (Storebakken *et al.*, 2015) formando uma massa homogeneia que foi granulada a frio e seca em estufa de ventilação forçada à 45°C por 24 horas, sendo posteriormente analisada para a determinação da composição nutricional e quantificação do marcador inerte (Tabela 8).

Tabela 8. Composição nutricional das dietas utilizadas no ensaio de digestibilidade

Níveis de Inclusão	Níveis inclusão microalga – dietas digestibilidade					
	0%	1%	2,50%	5%	7,50%	10%
Composição proximal (%)						
Proteína bruta	35,91	35,63	35,36	35,30	35,58	35,27
Extrato etéreo	9,71	9,71	9,88	10,45	10,36	11,41
Fibra bruta	1,87	1,72	1,24	1,22	0,95	1,78
Óxido de cromo III	0,17	0,18	0,18	0,17	0,18	0,19
Energia (kJ g ⁻¹)	19,30	19,31	19,35	19,16	19,41	19,73

3.3. Determinação do desempenho das tilápias alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de farinha de *Schizochytrium* sp.

Alevinos de tilápia foram pesados individualmente ($2,95 \pm 0,2\text{g}$) e distribuídos em 24 caixas (300 L; 15 peixes por caixa) configurando um delineamento experimental inteiramente aleatorizado com seis tratamentos ($n=4$). O ensaio foi conduzido em um sistema de recirculação com fotoperíodo controlado (12h claro:12h escuro) e controle de parâmetros físicos e químicos da água por sonda multiparamétrica Horiba U-50 e kit de amônia tóxica - temperatura ($26 \pm 0,72^\circ\text{C}$), oxigênio dissolvido ($4,65 \pm 1,25 \text{ mg L}^{-1}$), pH ($7,82 \pm 0,07$) e amônia ($< 0,4 \text{ mg L}^{-1}$). Durante a biometria inicial uma amostra de 15 animais foi retirada e sacrificada em superdose em de benzocaína (1g L^{-1}) (Okamura *et al.*, 2010) para determinação da composição corporal.

Os peixes foram alimentados por 66 dias em três refeições diárias (8h30m, 14h00m e 18h00m) até a saciedade aparente com as dietas experimentais formuladas para conter 0% (controle) e 1%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10% farinha de *Schizochytrium* sp. (Tabela 9). As dietas foram formuladas a partir de ingredientes práticos de forma a serem isoproteicas 30% de proteína digestível – PD, isoenergéticas $13,79 \text{ kJ g}^{-1}$ de energia digestível – ED e isofibrosas 4% de fibra bruta – FB. Para a definição do menor nível de inclusão foi considerado a indicação do rótulo do produto e, para o maior nível foi considerada o máximo de inclusão que mantivesse as rações isoproteicas e isoenergéticas, respeitando a porcentagem pré-fixada de alguns ingredientes (farelo de soja e vísceras de aves). Moagem, homogeneização e mistura dos ingredientes, bem como processamento das dietas, seguiram o protocolo anteriormente descrito para obtenção das dietas-teste para os ensaios de digestibilidade.

Foram realizadas biometrias parciais aos 19 e 40 dias do período experimental, com coleta do peso total dos lotes, e uma biometria final, com coleta de peso individual. Por ocasião da biometria final, seis indivíduos de cada unidade experimental foram sacrificados em superdose de benzocaína (500 mg L⁻¹), dois peixes sendo destinados às análises de composição proximal, dois para coleta de microbiota intestinal e dois para as análises histológicas.

Tabela 9. Composição de ingredientes e nutricional das dietas para os ensaios de desempenho das farinhas de *Schizochytrium* sp.

Ingrediente	Níveis inclusão microalga - dietas desempenho					
	0%	1%	2,50%	5%	7,50%	10%
Farelo soja	30,00	30,00	29,29	28,87	28,87	30,00
Farinha vísceras	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
Milho moído	25,39	24,82	25,13	24,59	24,31	20,88
Glúten de milho	16,00	15,98	16,00	16,00	15,38	14,05
Farelo trigo	10,00	9,99	9,47	9,04	8,75	10,00
Óleo de soja	4,00	3,60	2,78	1,59	0,27	-
All G Rich	-	1,00	2,50	5,00	7,50	10,00
Celulose	0,78	0,77	0,96	1,00	1,00	1,00
DL-Metionina	0,29	0,29	0,29	0,30	0,31	0,45
L-Lisina	0,12	0,13	0,16	0,20	0,19	0,20
Fosfato bicálcico	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura mineral e vitamínica ¹	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
NaCl	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Composição proximal (%)³						
Proteína bruta	36,32	35,89	35,68	35,20	35,66	35,96
Extrato etéreo	10,47	10,50	10,93	11,57	11,73	13,05
Fibra bruta	1,71	2,22	2,07	1,52	2,20	2,31
Matéria mineral	7,55	7,72	7,79	7,66	8,00	7,80
Energia (kJ g ⁻¹)	19,57	19,50	19,54	19,97	19,85	20,18
Ácidos graxos (%)⁴						
Gorduras monoinsaturadas	3,31	2,82	2,67	2,41	1,93	1,76
Gorduras poli-insaturadas	4,75	5,20	5,04	4,63	4,29	4,50
Gorduras insaturadas	8,05	8,01	7,72	7,04	6,22	6,27
Gorduras saturadas	2,42	2,49	3,21	4,53	5,51	6,79
20:5n-3 EPA	-	0,003	0,004	0,010	0,015	0,021
22:6n-3 DHA	-	0,177	0,453	0,862	1,496	2,015
n-3	0,279	0,528	0,76	1,09	1,66	2,168
n-6	4,462	4,667	4,285	3,534	2,64	2,345
n-9	3,21	2,729	2,583	2,319	1,829	1,658

¹ Premix Nutrifish Guabi® (Campinas, SP, Brasil). Níveis de garantia (por kg) do produto: Fe 1500 mg; Cu 1500 mg; Zn 12500 mg; I 375 mg; Mn 12500 mg; Se 87,5 mg; Co 125 mg; vit. A 2.500.000 IU; vit. D 3.600.000; vit. E 37.500 IU; vit. K 3750 mg; vit.C 50.000 mg; vit. B1 4.000 mg; vit. B2 4.000 mg; vit. B6 4.000 mg; vit. B12 4.000 mg; ác. Pantotênico 12.000 mg; biotina 15 mg; ác. Fólico 1.250 mg; niacina 22.500 mg; BHT 15.000 mg

² butil-hidroxi-tolueno

³ valores analisados referentes a matéria seca

⁴ Perfil completo dos ácidos graxos das rações disponível no Apêndice B

Variáveis de desempenho

Utilizando-se dos registros de pesos dos animais nas biometrias inicial e final e também dos registros semanais de consumo de ração (dois registros por semana), foram calculadas as variáveis de desempenho a partir das seguintes equações:

Ganho de peso médio (g):

$$GPm = Pmf - Pmi$$

Conversão alimentar aparente:

$$CA = \frac{I}{GP}$$

Taxa de crescimento específico (%):

$$TCE = \frac{\ln(Pf) - \ln(Pi)}{t} \times 100$$

Sobrevivência (%):

$$Sb = \frac{Ni - Nf}{N} \times 100$$

em que:

P: peso final ou inicial (g, peso úmido);

t: período experimental (dias);

I: ingestão total de alimento (g, peso úmido);

N: número de indivíduos final ou inicial.

Composição proximal

As análises de composição proximal das rações e dos animais foram realizadas por laboratório certificado (CBO Análises Laboratoriais, Campinas, SP) conforme metodologia descrita pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1999). As rações e as carcaças foram analisadas quanto aos seus conteúdos de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta (fator de conversão de Kjeldahl), extrato etéreo, energia bruta, fibra bruta, nitrogênio não proteico e perfil de ácidos graxos. A utilização dos nutrientes da dieta foi calculada pelas seguintes equações:

Taxa de retenção aparente da proteína (%):

$$TRP = \frac{(Pf \times PCf) - (Pi \times PCi)}{Ip} \times 100$$

Taxa de retenção aparente da energia (%):

$$TRE = \frac{(Pf \times ECf) - (Pi \times ECi)}{Ie} \times 100$$

em que:

PC: proteína corporal final ou inicial (g kg⁻¹, peso seco);

EC: energia corporal final ou inicial (g kg⁻¹, peso seco);

I_p: ingestão total de proteína (g kg⁻¹, peso seco);

I_e: ingestão total de energia (g kg⁻¹, peso seco);

3.4. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA; $\alpha = 0,05$). As suposições de homogeneidade das variâncias foram verificadas pelo teste de Levene e a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando não atendidas estas suposições, optou-se pela ANOVA de Welch ($\alpha = 0,05$), considerada uma opção razoável quando os dados apresentam heterocedasticidade (Moder, 2010). Os dados foram submetidos a análises de regressões sob modelos lineares e polinomiais ($\alpha = 0,05$). A técnica de regressão robusta (m-estimação) foi utilizada para ajustar os modelos quando detectada a presença de dados influentes (indicados nas tabelas de resultados com o símbolo †) (Huber, 1964).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Digestibilidade da farinha de *Chlorella sorokiniana*

A composição e a digestibilidade da proteína, energia e aminoácidos determinados para a farinha de *Chlorella sorokiniana* [FCS] foram comparáveis àqueles da farinha de peixe e do farelo de soja. Os níveis de proteína determinados para as farinhas de microalgas são variáveis, e os valores absolutamente discutíveis, pois as altas concentrações de nitrogênio não proteico presentes nas moléculas de clorofila, ácidos nucleicos, aminoácidos livres e aminossacarídeos podem fazer com que os níveis de proteína bruta determinados pelo método de Kjeldahl, que utiliza o fator de 6,25 para converter o nitrogênio total em proteína, sejam superestimados. No entanto, a definição de um fator de conversão mais realista para microalgas depende da espécie, sistema de produção, fase do crescimento em que foi realizada a colheita, método de colheita e processamento. Os fatores sugeridos para a *Chlorella* sp. estão entre 5,02, para aquelas colhidas na fase log de crescimento (maior concentração de proteína), e 4,84, para aquelas colhidas na fase de declínio (maior concentração de lipídios) (Templeton and Laurens, 2015, Angell *et al.*, 2016) (Tabela 10).

Tabela 10. Comparativo entre farinha de *Chlorella sorokiniana*, farinha de peixe e farelo de soja, em termos de composição nutricional, coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) para a tilápia e quantidade de nutriente digestível.

Nutriente (%)	Farinha de <i>Chlorella</i> ¹		Farinha de Peixe ²		Farelo de Soja ²	
	Comp. ³	CDA ⁴	Comp. ³	CDA	Comp. ³	CDA
Proteína	69,06	90,51 (62,50) ⁵	60,15	82,59 (49,68)	51,70	94,13 (48,67)
Energia (kJ.g ⁻¹)	22,69	84,22 (19,10)	17,93	95,29 (17,08)	20,34	84,12 (17,11)
Matéria Seca	-	82,71 (78,83)	-	82,6 (74,79)	-	85,3 (74,82)
A.A. essenciais⁶						
Arginina	3,71	96,1 (3,57)	3,64	89,39 (3,26)	3,55	94,53 (3,35)
Fenilalanina	3,41	91,78 (3,13)	2,68	88,89 (2,39)	2,83	97,58 (2,76)
Histidina	1,03	93,85 (0,96)	1,28	92,24 (1,18)	1,43	94,4 (1,35)
Isoleucina	2,74	93,29 (2,55)	2,57	89,7 (2,31)	2,63	92,64 (2,44)
Leucina	5,70	90,69 (5,17)	4,47	92,59 (4,14)	4,44	93,32 (4,14)
L-Lisina	5,17	90,35 (4,67)	4,51	93,63 (4,22)	3,06	97,01 (2,96)
DL-Metionina	1,08	94,4 (1,02)	1,73	87,26 (1,51)	0,49	90,7 (0,44)
Treonina	2,92	91,82 (2,68)	2,47	83,93 (2,08)	2,02	90,4 (1,82)
Valina	3,61	91,65 (3,31)	2,78	92,46 (2,57)	2,62	90 (2,36)

¹ valores analisados

² (Goncalves *et al.*, 2009)

³ composição com base na matéria seca

⁴ CDA = coeficiente de digestibilidade aparente

⁵ valores entre parênteses referem-se a % de nutriente digestível

⁶ Exceção do triptofano

Aplicando o fator de conversão de 5,00 (Angell et al., 2016), o nível de proteína bruta da FCS passa de 69,06% para 55,24% em matéria seca, o que ainda representa um alto valor/conteúdo proteico. Porém, não é possível utilizar esses valores para o cálculo de digestibilidade dessa proteína em função da dificuldade em correlacionar os níveis proteicos determinados nas rações com os valores contidos nas fezes coletadas. Desta forma, optou-se por manter os valores determinados pelo método de Kjeldahl.

Com exceção da histidina e da metionina, os conteúdos dos demais aminoácidos essenciais na FCS foram superiores àqueles da farinha de peixe e do farelo de soja. Embora o conteúdo em metionina seja comparativamente menor àquele da farinha de peixe, a digestibilidade da metionina da farinha de *Chlorella* foi maior, o que faz com que contribua com maior quantidade desse aminoácido nas formulações. A exigência nutricional em metionina da tilápia é 0,7 na proteína da dieta, mas com o mesmo é precursor da cistina, é recomendável a inclusão de 0,9 desse aminoácido nas dietas da espécie. A farinha de *Chlorella* pode então ser uma boa fonte de metionina em dietas para tilápias, uma vez que fornece até 1,02 de metionina digestível (Furuya et al., 2004, Furuya et al., 2013, Furuya et al., 2006, Diogenes et al., 2016, Michelato et al., 2013).

A lisina é o aminoácido mais limitante em dietas para peixes, principalmente quando fontes proteicas de origem vegetal são utilizadas na substituição da farinha de peixe. A concentração desse aminoácido na dieta afeta consideravelmente o desempenho zootécnico, a saúde e a retenção de nitrogênio pelos peixes (Li et al., 2009, Diogenes et al., 2016, Furuya et al., 2013). Os níveis desse aminoácido encontrados na farinha de *Chlorella* sp. são considerados altos – 5,17, sendo que a exigência para a tilápia até 100 g é de 1,6 (Furuya et al., 2004; Furuya et al., 2006; Furuya et al., 2013). Portanto, a farinha de *Chlorella* sp. pode ser utilizada também como uma boa fonte de lisina, o que poderia reduzir ou até eliminar a inclusão de lisina sintética nas formulações de dietas para tilápia.

Ao compararmos os dados gerados com FCS neste estudo com dados da literatura de referência (Gonçalves et al., 2009) é importante levar em consideração que existe muitas variáveis (características) experimentais que possivelmente influenciaram os resultados de digestibilidade nos dois ensaios (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação entre os delineamentos experimentais utilizados no atual trabalho com a literatura de referência

	RSC Barone	Gonçalves <i>et al.</i> (2009)
Tamanho inicial dos indivíduos (g)	78,01 ± 1,87	82 ± 5
Método de coleta das fezes	Indireto/passivo	Indireto/passivo
Marcador utilizado	Cr ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃
Quantidade de marcador (%)	0,2	0,1
Processamento da ração	Extrusão	Peletização
Tipo de dieta	Prática	Semi-purificada
Composição proximal das dietas referências em matéria seca (%)		
Proteína bruta	36,5	36,05
Energia bruta (kJ g ⁻¹)	20,39	17,68
Fibra bruta	4,1	5,24
Extrato etéreo	3,1	4,72

As principais fontes de diferenças entre os resultados de digestibilidade dos trabalhos e que permitiriam uma discussão sobre validade dessa comparação são o tipo de dieta utilizada e o método de processamento das rações. A utilização de dietas purificadas, compostas basicamente por gelatina, caseína, dextrina e, no caso das semi-purificadas, a adição de uma fonte lipídica, tem como objetivo prevenir possíveis interações entre os ingredientes e evitar a presença de possíveis fatores antinutricionais. No entanto, a utilização desse tipo de dieta pode diminuir a apreensão e ingestão dos grânulos pelos peixes, uma vez que dietas purificadas e semi-purificadas podem não ser tão palatáveis quanto dietas práticas, o que, do ponto de vista experimental, pode ser uma fonte de alteração na digestibilidade, já que os animais podem não ingerir uma quantidade de alimento que assegure o funcionamento normal do sistema digestório (NRC, 2011).

O processo de extrusão de dietas causa desnaturação de algumas proteínas e gelatinização do amido promovendo melhor utilização dos nutrientes e, conseqüentemente, maiores valores de digestibilidade comparativamente a dietas peletizadas (Ma *et al.*, 2016). Todavia, quando se compara os valores de digestibilidade registrados com os resultados de Gonçalves *et al.* (2009), não são observados coeficientes de digestibilidade muito discrepantes entre os trabalhos, o que pode sugerir que o tipo de dieta e o processamento utilizados não tiveram influência maior do que a fonte de ingrediente testada na digestibilidade das dietas.

Estimativa de preço da farinha de *Chlorella* como ingrediente proteico

Nos últimos anos os preços da farinha de peixe vêm descolando dos preços do farelo de soja e, portanto, para as estimativas de preço médio considerou-se apenas os valores dos últimos cinco anos em que, aparentemente, houve um “plateau” de estabilização desses preços, com valores de 1,68 USD kg⁻¹ e 0,40 USD kg⁻¹ para a farinha de peixe e o farelo de soja, respectivamente (Figura 7).

Figura 7. Histórico de preços da farinha de peixe e farelo de soja de 1987 até junho de 2016 e média de preços dos últimos cinco anos desses ingredientes. Fonte dos dados: Banco mundial.

O preço por proteína digestível da farinha de peixe e do farelo de soja foram de 3,38 USD kg⁻¹ e 0,82 USD kg⁻¹ respectivamente, conforme base de cálculo abaixo:

$$D_{FP} = (100 \times C) / (PB \times CDA_{(FP)})$$

$$D_{FS} = (100 \times C) / (PB \times CDA_{(FS)})$$

$$D_{FP} = (100 \times 1,68) / (54,46 \times 82,59)$$

$$D_{FS} = (100 \times 0,4) / (45,35 \times 94,13)$$

$$D_{FP} = 3,38 \text{ USD. Kg}^{-1}$$

$$D_{FS} = 0,82 \text{ USD. Kg}^{-1}$$

em que:

D_{FS} = preço da proteína digestível do farelo de soja

D_{FP} = preço da proteína digestível da farinha de peixe

C = preço médio do ingrediente

PB = proteína bruta do ingrediente

CDA = coeficiente de digestibilidade aparente

Dessa forma, considerando o modelo proposto, estimou-se que para que pudesse competir como fonte proteica substituta a farinha de peixe, o valor da proteína digestível da farinha de *Chlorella* sp. deve ser, no máximo, 4,25 USD kg⁻¹, ou até 1,06 USD kg⁻¹ quando a comparação fosse feita com o farelo de soja, o que em termos de valor do produto final, seria o equivalente a 2,65 USD kg⁻¹ e 0,66 USD kg⁻¹. Ressalte-se que esta estimativa se baseia na premissa de que a farinha de *Chlorella* sp. possa ser um substituto perfeito de ambos os ingredientes, o que, do ponto de vista zootécnico, ainda necessita de comprovação.

Apesar de não terem sido localizados resultados de estudos que avaliassem a substituição de farinha de peixe especificamente por farinha de *Chlorella* sp., outras espécies de microalgas como a *Isochrysis* sp. (Tibaldi *et al.*, 2015); *Nanofrustulum* sp. e *Tetraselmis* sp. (Kiron *et al.*, 2012); *Navicula* sp. e *Nannochloropsis salina* (Patterson and Gatlin, 2013), e *Spirulina* sp. (Palmegiano *et al.*, 2005) já foram avaliadas, possibilitando a substituição em todos os níveis testados sem comprometer o desempenho zootécnico dos animais. No entanto, o nível mais alto de substituição registrado foi de 60% (Palmegiano *et al.*, 2005).

Outro fator a ser ponderado diz respeito à digestibilidade da farinha de *Chlorella* sp. Apesar de a tilápia ter apresentado uma alta digestibilidade para a proteína no presente trabalho (90,51 %), os valores registrados para a digestibilidade da *Chlorella* sp. na nutrição de outros animais estão entre 68% e 80% (Becker, 2007, Kotrbacek *et al.*, 2015). Desta forma, há que se considerar que a tilápia é uma espécie herbívora com tendências a onivoria em sua fase adulta e em outras espécies neotropicais utilizadas na produção como o onívoro Pacu *Piaractus mesopotamicus* ou o carnívoro dourado *Salminus brasilienses* provavelmente serão registrados valores de digestibilidade inferiores àqueles registrados para a tilápia, o que, do ponto de vista econômico, tornaria o preço por proteína digestível da *Chlorella* sp. abaixo do valor de 4,25 USD kg⁻¹ estimado no presente estudo.

Avaliando o uso da farinha de *Chlorella* sp. como fonte proteica alternativa à farinha de peixe na nutrição de tilápia, deve-se considerar que a quantidade de farinha de peixe normalmente utilizada nas formulações para tilápia é baixa, em torno de 2 a 5% (Chiu *et al.*, 2013). Na realidade, o uso da farinha de peixe em dietas para tilápia é possivelmente desnecessário (Koch *et al.*, 2016). Dessa forma, seria mais lógico que a farinha de *Chlorella* sp. “competisse” com fontes proteicas mais baratas como o farelo de soja, ou sendo uma boa fonte de lisina digestível,

pudesse “competir” com fontes de lisina sintéticas cujo valor mercado por quilograma de produto oscila entre esses os valores da farinha de peixe e o farelo de soja.

Estimativas de preços da microalga como fonte dos ácidos graxos poli-insaturados eicosapentaenoico [EPA] e docosaexaenoico [DHA] alternativos ao óleo de peixe, foram realizadas por (Chauton *et al.*, 2015), sendo que o valor estimado para que fossem competitivas seria de 2,4 USD kg⁻¹ ou 8,0 USD kg⁻¹ do equivalente em EPA e DHA, respectivamente. Considerando a contribuição em proteína, energia e aminoácidos em formulações e usando o modelo hedônico de predição de preço, (Maisashvili *et al.*, 2015) relataram que os resultados para a farinha de *Chlorella pyrenoidosa* seria de no máximo 0,64 USD kg⁻¹ para o período estudado (2005 a 2012). Os resultados desses trabalhos, de certa forma, corroboram com os encontrados no presente estudo, pois os valores estimados estiveram em uma faixa de preço que se encontra entre a farinha de peixe e o farelo de soja.

A faixa de preço entre 4,25 e 1,06 USD kg⁻¹ encontradas, considerando o modelo proposto no presente estudo, carecem de avaliações de desempenho zootécnico e ensaios de substituição integral da farinha de peixe. No entanto, esses valores já podem ser utilizados como indicativos e balizadores na formação de preço de mercado para o uso da farinha de *Chlorella* sp. na nutrição de tilápia.

4.2. Digestibilidade da farinha de *Schizochytrium* sp.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da farinha de *Schizochytrium* sp. [FSZ] para a proteína e energia foram, respectivamente, 97,19% e 82,55%, o que em termos de proteína e energia digestível é o equivalente à 12,1 e 26,43 kJ g⁻¹, respectivamente. Esses resultados, pelo menos em termo de digestibilidade da proteína, foram melhores que aquele encontrado por Sarker *et al.* (2016a) – 81,7 % (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação entre composição nutricional e coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) entre o presente estudo e Sarker (2016a).

Composição nutricional (%)	RSC Barone		(Sarker <i>et al.</i> , 2016a)	
	<i>Schizochytrium</i>	CDA (%)	<i>Schizochytrium</i>	CDA (%)
Matéria Seca	97,48	82,69	96,5	81,8
Proteína	12,45	97,20	11,9	81,7
Energia kJ.g ⁻¹	32,02	82,55	17,7	86,5
Extrato etéreo	72,78	91,61	54,1	97,9
Cinzas	4,53	75,57	8,7	65,9

As diferenças registradas nos coeficientes de digestibilidade aparente entre os trabalhos podem ser justificadas pelas diferenças metodológicas adotadas pelos autores (Tabela 13). Os principais pontos de divergência estão no processamento da ração, ingredientes utilizados e quantidade de proteína e extrato etéreo das dietas.

Tabela 13. Comparação entre o método utilizado na condução dos ensaios de digestibilidade entre o presente estudo e Sarker *et al.* (2016a).

	RSC Barone	Sarker <i>et al.</i> (2016a)
Tamanho médio inicial dos indivíduos (g)	28,5	20
Método de coleta das fezes	Indireto/passivo	Indireto/passivo
Marcador utilizado	Cr ₂ O ₃	SiO ₂
Quantidade de marcador (%)	0,2	1
Processamento da ração	Extrusão	Peletização
Tipo de dieta	Prática	Prática
Composição proximal das dietas referências em matéria seca (%) e (CDA)		
Proteína bruta	37,97 (94,53)	39,6 (84,7)
Energia bruta (kJ g ⁻¹)	19,6 (85,05)	16,7 (86,1)
Fibra bruta	2,66	1,3
Extrato etéreo	6,76 (95,44)	13,4 (95,2)
Ingredientes da formulação (% do total da dieta)		
	Farelo de soja (47,35)	Farinha de peixe (30)
	Milho moído (28,31)	Farelo de soja (17)
	Glúten de milho (11,2)	Glúten de milho (13)
	Farelo de trigo (10)	Óleo de peixe (10)
	Óleo de soja (1,71)	Farelo de trigo (28)
	Premix vit/min (0,8)	Premix vit/min (1)
	Celulose (0,24)	SiO ₂ (1)
	Metionina (0,27)	
	Cr ₂ O ₃ (0,2)	
	NaCl (0,1)	
	BHT (0,02)	

Rações extrudadas aumentam a disponibilidade nutrientes e, dessa forma, possibilitam melhores coeficientes de digestibilidade aparente e uma maior retenção dos nutrientes (Ma *et al.*, 2016, Shi *et al.*, 2016). Como relatado por (Ma *et al.*, 2015) uso de rações extrudadas possibilitou, além de melhores coeficientes de digestibilidade aparente da dieta, aumento no ganho de peso e melhor eficiência de retenção proteica pelas tilápias. A baixa digestibilidade da proteína – 84,7 % – da ração referência de Sarker *et al.* (2016a), quando comparada com o CDA de 94,53 registrado neste estudo, sugere que, além das diferenças do tipo de processamento (extrusão vs peletização), pode ter havido alguma falha no controle da qualidade ou pré-processamento (moagem e homogeneização) dos ingredientes, que podem ter ocasionado as diferenças no CDA da proteína da FSZ.

A quantidade de extrato etéreo na dieta ou a relação lipídio/carboidrato, influenciam não só a estabilidade dos grânulos de ração, como também a utilização da proteína e energia da dieta. Maiores níveis de lipídios dietéticos podem reduzir a taxa de retenção proteica e, conseqüentemente, o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína (Ma *et al.*, 2016, Moro *et al.*, 2016). Portanto, as diferenças registradas na quantidade de lipídios nas rações entre o presente estudo e o trabalho de Sarker *et al.* podem ter influenciado o CDA da proteína da FSZ.

As espécies que compõem o gênero *Schizochytrium* sp. são caracterizadas por possuírem alto teor de proteína e baixa concentração de polissacarídeos não amiláceos, e.g. galactose e xylose, na parede celular (Yokoyama e Honda, 2007; Hong *et al.*, 2011; Hong e Lee, 2015). Em geral, as enzimas específicas para a sua digestão dos polissacarídeos não amiláceos estão ausentes ou presentes em baixas concentrações em diversas espécies de peixe (Yokoyama and Honda, 2007, Hong and Lee, 2015, Hong *et al.*, 2011, Kuz'mina, 1996). No entanto, apesar das células da FSZ estarem íntegras, foi registrada uma boa utilização dos nutrientes do ingrediente, com CDAs acima de 80%.

A alta digestibilidade FSZ para a tilápia pode estar relacionada ao hábito onívoro, à alta capacidade de filtragem de partículas orgânicas e consequente absorção das mesmas, o baixo pH ($\approx 1,5$) estomacal e a alta ação de proteases no sistema gastrointestinal da espécie. Essas características são consequências de adaptações evolutivas, que permitiram às tilápias utilizarem o baixo conteúdo proteico das dietas naturais (Kuz'mina *et al.*, 2015, Hlophe *et al.*, 2014, Tengjaroenkul *et al.*, 2000).

O diferencial da adoção da FSZ para uma dieta de peixes está na possibilidade de enriquecimento do produto final – e.g. filés – com ácidos graxos poli-insaturados da série n-3. Além dos benefícios que tal fenômeno pode trazer ao consumidor final desses produtos, a inclusão da FSZ em dietas para organismos aquáticos permitiria redução no uso de óleo de peixe nestas dietas, possíveis benefícios nos parâmetros de desempenho zootécnico e uma ação imunoestimulante (Kim *et al.*, 2002, Bai *et al.*, 2001, Hammad *et al.*, 2016, Peixoto *et al.*, 2016, Kent *et al.*, 2015, Qiao *et al.*, 2014).

4.3. Digestibilidade das dietas

A inclusão FSZ reduziu os coeficientes de digestibilidade de proteína e energia das dietas (Tabela 14) de maneira linear (Figura 8). As diferenças registradas para os coeficientes de digestibilidade da energia das rações em função do nível de inclusão do produto podem ser resultado da substituição do óleo de soja pela FSZ nas dietas. Apesar das rações terem sido formuladas em bases digestíveis, o óleo de soja, além de ser uma energia prontamente disponível, não necessita da quebra de uma parede celular para que a energia nele contida seja disponibilizada ao animal, ao contrário da microalga.

Tabela 14. Coeficientes de digestibilidade aparente das rações do ensaio de desempenho.

CDA	Níveis de inclusão da farinha de <i>Schizochytrium sp.</i>						Valor P
	0	1	2,5	5	7,5	10	
	-----%-----						
Prot.	88,07 (0,50)	88,87 (0,15)	87,32 (0,34)	86,90 (0,69)	85,18 (0,23)	86,01 (0,09)	0,001
Ener.	74,19 (1,39)	76,97 (1,93)	73,00 (0,09)	72,61 (0,66)	69,34 (0,52)	67,35 (0,25)	0,001

CDA = coeficiente de digestibilidade aparente.

Figura 8. Regressão linear para os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia das rações do ensaio de desempenho.

A quantidade de energia de uma dieta é um fator de limitação de seu consumo e os lipídios são os nutrientes mais eficientes no fornecimento de energia e consequente reguladores da quantidade de alimento consumida (Hua and Bureau, 2009). Dessa forma, a disponibilidade imediata do óleo de soja frente os lipídios contidos no interior das células da microalga podem ter tido um efeito regulador sobre a quantidade de alimento ingerido pelos peixes. Sendo assim, os indivíduos alimentados com os maiores níveis de inclusão de microalgas na dieta podem ter ingerido uma quantidade maior de alimento, alterando a velocidade de passagem da digesta no trato. No entanto, isso não pode ser confirmado no ensaio de digestibilidade das rações, pois não foi realizado nenhum controle sobre a quantidade de alimento ingerida nos e entre os tratamentos.

A redução da digestibilidade de macro nutrientes das dietas em função da inclusão de ingredientes provenientes de microrganismos já foram registrados em truta, salmão e outros monogástricos, sendo que em salmão um nível de 5% de inclusão de algas foi suficiente para uma redução de até 7% no CDA da proteína (Norambuena *et al.*, 2015, Skrede *et al.*, 2011). Para o salmão *Salmo salar*, por exemplo, a inclusão de níveis acima 1% de *Schizochytrium* sp. piorou a digestibilidade da energia, porém não alterou o CDA da proteína dietética. Possivelmente as diferenças do perfil de ácidos graxos entre as dietas tenham influenciado a digestibilidade da energia, já que o salmão metaboliza de forma diferente os ácidos graxos em função da temperatura do ambiente (Kousoulaki *et al.*, 2015). Tilápias também utilizam os ácidos graxos de forma seletiva em seu

metabolismo em função de situações de estresse e variação da temperatura (He *et al.*, 2015).

A inclusão de 20% da microalga *Tetraselmis suecica* como fonte proteica na dieta do “European seabass”, *Dicentrarchus labrax*, reduziu os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, lipídios e matéria seca das rações. O efeito ou fenômeno foi atribuído à utilização da microalga na forma íntegra, o que dificultou a assimilação dos nutrientes, já que as células precisaram ser lizadas para disponibilizar o seu conteúdo (Tulli *et al.*, 2012).

Outra possível causa da redução dos CDAs é a presença dos polissacarídeos não amiláceos (PNAs) na parede celular da *Schizochytrium* sp. PNAs podem ligar-se a sais biliares e diminuir sua ação na emulsificação dos lipídios, alterando o metabolismo destes lipídios no intestino (Sinha *et al.*, 2011). Portanto, o aumento dos níveis de inclusão de FSZ nas dietas e consequente aumento dos níveis de polissacarídeos pode ter ocasionado uma redução na ação dos sais biliares, condicionando piora na digestibilidade das rações pela tilápia.

A inclusão dos polissacarídeos não amiláceos, alginato e goma guar (galactomanano), em dietas para truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss*, resulta em diminuição da digestibilidade da proteína e gordura e também na velocidade de passagem no trato. Esses resultados são atribuídos à não dissociação dos polissacarídeos no estômago, devido ao baixo pH, formando precipitados de difícil digestão (Storebakken and Austreng, 1987, Storebakken, 1985, Storebakken *et al.*, 2015). Por outro lado, a inclusão de polissacarídeos não amiláceos em dietas para a tilápia-do-Nilo reduziu a quantidade de matéria seca das rações resultando em aumento da viscosidade da digesta, o que, entretanto, não resultou em piora na digestibilidade dos nutrientes da ração, com exceção da absorção do sódio (Leenhouwers *et al.*, 2007). Em geral o aumento de viscosidade da digesta diminui a disponibilidade de nutrientes como os lipídios, amidos e proteínas, dificultando a ação de enzimas endógenas, o que pode resultar em uma redução de digestibilidade e desempenho zootécnico (de Brito *et al.*, 2009, Sinha *et al.*, 2011).

A composição das dietas e quantidade de ingesta influenciam o tempo de trânsito do alimento no trato digestório que, por sua vez, altera a absorção dos nutrientes. O aumento da quantidade de carboidratos, proteínas e lipídios digestíveis na região anterior do intestino inibem a motilidade do trato digestório, e os lipídios parecem ter uma influência maior neste fenômeno (NRC, 2011). Em peixes

herbívoros, como é o caso da tilápia, em que o estômago possui tamanho e funcionalidade reduzidos, a digestão dos alimentos ocorre majoritariamente na região anterior do intestino e, portanto, o tempo de passagem se torna um fator relevante para a absorção dos nutrientes (Uscanga *et al.*, 2010).

A inclusão de *Schizochytrium* sp. em dietas para o salmão resultou em uma piora na qualidade dos grânulos, i.e., o aumento dos níveis de inclusão de *Schizochytrium* sp. tornou as dietas mais friáveis, aumentando a quantidade de finos, reduziu a estabilidade na água, o que resultou em uma piora nos coeficientes de digestibilidade aparente da energia (Kousoulaki *et al.*, 2016). Apesar de não terem sido realizadas análise da qualidade física e estabilidade dos grânulos das rações no presente estudo, registra-se que, de forma empírica, os maiores níveis de inclusão de FSZ na dieta tornaram os grânulos mais quebradiços.

A realização de estudos de tempo de passagem, a comparação entre a utilização da FSZ íntegra e lisada, o controle do consumo, a análise de qualidade e estabilidade de grânulos e a análise da viscosidade da digesta em futuros ensaios de digestibilidade com a utilização dessa espécie de microalga, devem permitir identificar a principal causa da redução dos coeficientes de digestibilidade aparente dos macro nutrientes concomitantemente ao aumento dos níveis de inclusão da microalga nas dietas.

4.4. Desempenho da tilápia alimentada com dietas contendo níveis crescentes de inclusão da farinha de *Schizochytrium* sp.

Níveis crescentes de FSZ na dieta não afetaram a sobrevivência, o ganho de peso individual (GPI), a taxa de crescimento específico (TCE), a taxa de eficiência proteica e energética (TEP), a taxa de retenção de proteína e energia (TRP e TRE respectivamente) e o índice hepato somático (IHS) dos peixes (Tabela 15). No entanto, os níveis de inclusão alteraram a taxa de ingestão diária (Id) (Figura 9) e, consequentemente, a conversão alimentar aparente (CAA) (Figura 10).

Tabela 15. Parâmetros de desempenho zootécnico em função do nível de inclusão da farinha de *Schizochytrium* sp. na dieta ($\alpha=0,05$).

	Níveis de inclusão da farinha de <i>Schizochytrium</i> sp. (%)						Valor p
	0	1	2,5	5	7,5	10	
S (%)	91,67 (8,32)	95,00 (5,00)	100,00	100,00	100,00	98,32 (1,67)	0,605
GPI (g)	49,42 (5,3)	55,47 (6,95)	49,58 (2,85)	49,45 (1,06)	50,40 (1,84)	51,60 (3,14)	0,881
CAA [†]	0,90 (0,05)	0,91 (0,02)	0,90 (0,02)	0,88 (0,01)	0,92 (0,01)	0,94 (0,01)	0,028
Id (%)	2,39 (0,08)	2,47 (0,03)	2,44 (0,04)	2,37 (0,01)	2,50 (0,03)	2,55 (0,02)	0,057
TCE (%)	4,14 (0,28)	4,49 (0,26)	4,41 (0,08)	4,29 (0,04)	4,37 (0,07)	4,38 (0,13)	0,780
TEP (%)	3,06 (0,16)	3,06 (0,07)	3,11 (0,06)	3,21 (0,02)	3,03 (0,03)	2,94 (0,03)	0,324
TRP (%)	44,46 (0,95)	43,07 (0,18)	41,8 (1,37)	46,00 (1,56)	42,66 (1,32)	42,02 (0,77)	0,118
TRE (%)	37,05 (0,99)	37,38 (0,85)	33,87 (2,34)	37,29 (1,57)	34,45 (1,48)	34,10 (0,77)	0,265
IHS	1,23 (0,08)	1,22 (0,08)	1,34 (0,16)	1,60 (0,43)	1,47 (0,27)	1,26 (0,10)	0,801

Valores médios (n=4) erro padrão entre parênteses. S – Sobrevivência; GPI – ganho de peso individual; CAA – conversão alimentar aparente; Id – Ingestão alimentar; TCE – taxa de crescimento específico; TEP – taxa de eficiência proteica; TRP – taxa de retenção proteica; TRE – taxa de retenção energética; IHS – índice hepato-somático.

† Welch ANOVA

Figura 9. Modelo de regressão linear para a taxa de ingestão alimentar. LI e LS referem-se ao limite superior e inferior do intervalo de confiança, utilizando o erro padrão. R² - corrigido pela soma de quadrados do erro puro

Figura 10. Modelo de regressão linear para a conversão alimentar. LI e LS referem-se ao limite superior e inferior do intervalo de confiança, utilizando o erro padrão.

O aumento na ingestão de alimento registrado no ensaio de desempenho corrobora os resultados obtidos no teste de digestibilidade das rações, em que os níveis mais elevados de inclusão resultaram em redução nos coeficientes de digestibilidade aparente para a proteína e energia. O balanço energia: proteína de uma dieta influencia diretamente o controle da ingesta, sendo a quantidade de energia digestível o fator mais limitante (NRC, 2011; Portz e Furuya, 2012; Fernandes *et al.*, 2016). Apesar dos tratamentos serem isoenergéticos e isoproteicos, as dietas com maiores níveis de inclusão de FSZ ofereceram uma quantidade menor de energia digerível, o que pode ter refletido no aumento de consumo e consequentemente piora na conversão alimentar.

Por outro lado, o aumento na ingestão e piora na conversão alimentar não foram suficientes para alterar outros parâmetros de desempenho. Um período mais longo de experimentação poderia acentuar essas diferenças refletindo em outras variáveis.

Resultado similar ao presente estudo foi relatado em um estudo com trutas, que quando alimentadas com dietas contendo maiores quantidades de ácidos graxos poli-insaturados apresentaram aumento no consumo de alimento. Embora as alterações no perfil de hormônios que regulam o apetite das trutas fossem não significativas, aparentemente os maiores níveis de ácidos graxos dietéticos

influenciaram a palatabilidade das dietas aumentando o consumo, efeito que demanda estudos mais aprofundados para comprovação (Francis *et al.*, 2014).

O uso de microalgas como aditivo em rações para peixes tem gerado resultados controversos sobre os parâmetros de desempenho zootécnico. Enquanto algumas espécies de microalgas condicionam melhoras significativas, outras não resultam em diferenças de desempenho comparativamente a dietas-controle.

A suplementação de 2 % de *Chlorella* na dieta do linguado, *Paralichthys olivaceus*, melhorou a taxa de eficiência proteica e taxa de eficiência alimentar, bem como aumentou o ganho de peso. Esse efeito aditivo foi atribuído à modulação do metabolismo de lipídios: os animais alimentados com as rações contendo *Chlorella* priorizaram a utilização de lipídios como fonte de energia, o que resultou também em animais com menor deposição de gordura no músculo (Kim *et al.*, 2002). Esse mesmo efeito de redução da quantidade de lipídios no filé foi observado em ensaio em que 10% da microalga *Nanofrustulum* foi adicionado à dieta da carpa comum *Cyprinus carpio*, embora nenhuma diferença no desempenho zootécnico tenha sido registrada (Kiron *et al.*, 2012).

Quando (Bai *et al.*, 2001) suplementaram dietas do “Korean rockfish” *Sebastes schlegelii* com *Chlorella*, o nível de 0,5% de inclusão resultou em melhora no ganho de peso, taxa de eficiência proteica, conversão alimentar e taxa de crescimento específico, mas os níveis acima de 0,5% levaram a efeitos negativos na condição fisiológica dos peixes. A inclusão de 0,8% de *Chlorella* na dieta melhorou a conversão alimentar e aumentou a taxa de crescimento específico, a taxa de eficiência proteica e o ganho de peso da carpa prussiana, *Carassius auratus gibelio*, permitindo a (Xu *et al.*, 2014) inferir que a *Chlorella* contém alguma molécula bioativa que modula o metabolismo de lipídios e proteínas dos peixes.

A inclusão de *Spirulina* sp. como principal fonte proteica na dieta melhorou o ganho de peso, taxa de eficiência proteica e a conversão alimentar da tilápia-do-Nilo, bem como resultou em redução na quantidade de lipídios na carcaça. Por outro lado, a adição de Algamaxx (Independence Bio-Products, Dublin, OH, USA), composto comercial à base de microalgas à dieta, resultou em piora nos parâmetros de desempenho em todos os níveis utilizados (Hussein *et al.*, 2013).

Coprodutos de microalgas provenientes da extração de lipídios para geração de biodiesel (Lipid Extracted Algae – LEA) foram testadas em dietas para o “red drum”, *Sciaenops ocellatus*. Três produtos à base de diferentes espécies de

microalgas (*Chlorella* sp., *Navicula* sp. e *Nannochloropsis salina*) com diferentes tipos de processamento (LEA e NON-LEA) resultaram em efeitos distintos nos parâmetros de desempenho. Os parâmetros de desempenho de peixes alimentados com dietas contendo *Navicula* sp., tanto LEA quanto NON-LEA, não diferiram dos peixes alimentados com a dieta controle, mas apresentaram piores coeficientes de digestibilidade para a proteína e energia, especialmente quando as dietas eram suplementadas com produtos NON-LEA, ou seja, células íntegras, que dificultam a utilização dos nutrientes. Nesse mesmo estudo, a inclusão da *Chlorella* e *Nannochloropsis*, ambas na forma LEA, causaram piora em todos os parâmetros de desempenho em todos os níveis testados (Patterson and Gatlin, 2013).

A adição de *Schizochytrium* sp. a dietas dos peixes também tem resultado em efeitos distintos sobre os parâmetros de desempenho. Enquanto que a utilização dessa microalga na dieta da perca australiana, *Scortum barcoo* (Van Hoestenbergh *et al.*, 2016) e no linguado *Paralichthys olivaceus* (Qiao *et al.*, 2014) não resultou em nenhuma alteração nas variáveis de desempenho, o seu uso em dietas para o salmão, *Salmo salar*, resultou em melhor rendimento de carcaça, justificado pela sua alteração na composição final (Kousoulaki *et al.*, 2016), e aumento no ganho de peso (Kousoulaki *et al.*, 2015). A substituição total do óleo de peixe por *Schizochytrium* sp. em dietas para tilápia resultou em melhora no ganho de peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica, aparentemente como resultado da presença de micronutrientes e moléculas bioativas na alga em questão, que podem ter contribuído para esses ganhos em desempenho (Sarker *et al.*, 2016b).

Os resultados de Sarker (2016b) contrapõem os resultados do presente estudo em que a inclusão de FSZ na dieta não resultou em melhora no desempenho das tilápias. Uma possível explicação para essa diferença está na formulação das rações: a fonte exclusiva de lipídios da dieta controle de Sarker é o óleo de peixe, ingrediente usualmente não utilizado em dietas para tilápia (Ng and Romano, 2013b, Chiu *et al.*, 2013), espécie que aparentemente tem exigência nutricional por ácidos graxos da série n-6 (Chou and Shiau, 1999, Lim *et al.*, 2011, Sakabe *et al.*, 2013). As dietas com inclusão de níveis crescentes de microalga fornecem quantidades crescentes de ácidos graxos da série n-6: nesse estudo a relação n-3/n-6 passa de 2,2 na dieta controle para 1,6 na dieta com o nível máximo de inclusão. Em contrapartida, o presente estudo substitui a fonte de lipídios, o óleo de soja, rico em

n-6, pela FSZ, rica em n-3, fazendo com que a relação n-3/n-6 passe de 0,06 na dieta controle para 0,92 na dieta com o nível máximo de inclusão.

Peixes de águas quentes ou de ocorrência tropical, como a tilápia, parecem ter uma exigência comparativamente maior de ácidos graxos da série n-6 para melhor desempenho zootécnico (Chen *et al.*, 2013, Chou and Shiau, 1999). No entanto, apesar de relações próximas a um resultarem em melhores desempenhos zootécnicos, é provável que essa exigência seja por um ácido graxo específico, e não pelo grupo. Os resultados até então disponíveis sobre exigências em ácidos graxos para tilápias ainda não permitem a compreensão das exigências nutricionais em ácidos graxos específicos para a espécie (Bozaoglu and Bilguven, 2012, Chou and Shiau, 1999, Al-Souti *et al.*, 2012, Lim *et al.*, 2011).

A adição da FSZ na dieta não afetou os parâmetros de desempenho zootécnico da tilápia, mas alterou o perfil de ácidos graxos da carcaça sem alterar significativamente a composição centesimal (Tabela 16). A principal alteração em termos de perfil de ácidos graxos da carcaça se deu em relação ao aumento da quantidade de n-3, principalmente pela incorporação de docosahexanoico – DHA (22:6 n-3) e eicosapentanoico – EPA (20:5 n-3) e, consequentes redução da quantidade de n-6 e alteração da relação n-3/n-6 (Figura 11).

Tabela 16. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos da carcaça em função do nível de inclusão de *Schizochytrium* sp. (perfil completo dos ácidos graxos disponível no Apêndice C).

Comp. (%)	Níveis de inclusão da farinha de <i>Schizochytrium</i> (%)						Valor p
	0	1	2,5	5	7,5	10	
MS	26,50 (1,55)	26,32 (0,008)	24,78 (0,499)	26,22 (0,69)	25,20 (0,47)	26,16 (0,40)	0,351
PB	14,38 (0,62)	13,92 (0,29)	13,32 (0,37)	14,12 (0,38)	13,90 (0,31)	14,09 (0,26)	0,551
EB ¹	6,40 (0,04)	6,50 (0,04)	5,86 (0,29)	6,44 (0,22)	6,20 (0,21)	6,37 (0,15)	0,366
EE	7,91 (0,49)	8,61 (0,31)	7,29 (0,78)	7,93 (0,32)	7,50 (0,27)	7,98 (0,20)	0,419
MM	4,19 (0,19)	3,77 (0,08)	4,14 (0,36)	4,16 (0,08)	3,78 (0,08)	4,06 (0,11)	0,41
Ácidos Graxos (% em matéria seca)							
MUFA	37,60 (1,59)	38,67 (1,87)	32,31 (3,45)	32,61 (0,44)	30,46 (0,98)	30,77 (1,22)	0,125
PUFA	31,27 (3,92)	25,22 (5,38)	31,86 (1,77)	32,37 (1,79)	30,97 (1,65)	29,19 (2,60)	0,902
SFA	31,07 (0,93)	36,05 (1,40)	35,76 (0,69)	34,97 (0,54)	38,51 (0,49)	38,98 (0,65)	0,298
EPA	0,02 (0,01)	0,01 (0,01)	0,05 (0,06)	0,05 (0,02)	0,07 (0,02)	0,06 (0,03)	0,023
DHA	0,10 (0,04)	0,25 (0,11)	0,7 (0,11)	1,49 (0,16)	2,43 (0,19)	2,71 (0,44)	0,0001
n-3	2,02 (0,11)	2,10 (0,23)	4,56 (0,14)	6,71 (0,17)	10,23 (0,20)	10,77 (0,43)	0,0001
n-6†	28,96 (0,72)	22,75 (1,36)	24,94 (1,02)	24,63 (0,14)	20,46 (0,12)	19,95 (0,91)	0,006
n-6/n-3	16,35 (2,88)	17,48 (6,47)	6,00 (1,15)	3,75 (0,29)	2,04 (0,14)	1,95 (0,40)	0,002

¹ valores em kJ g⁻¹

Valores médios (n=4) erro padrão entre parênteses. MS – matéria seca; PB – proteína bruta; EB – energia bruta; EE – extrato etéreo; MM – matéria mineral; MUFA – ácidos graxos monoinsaturados; PUFA – ácidos graxos poli-insaturados; SFA – ácidos graxos saturados; EPA – ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3); DHA – ácido docosaexaenoico (22:6 n-3); n-3 – ácidos graxos da série ômega 3; n-6 – ácidos graxos da série ômega 6; n-9 – ácidos graxos da série ômega 9; n-6/n-3 – relação ácidos graxos da série ômega 6 e 3.

† Welch ANOVA

Figura 11. Alteração do perfil de ácidos graxos da carcaça da tilápia (base matéria natural) em termos de incorporação de ácidos graxos n-3, DHA e relação N6/N3.

A alteração da relação n-6/n-3 é consequência da substituição do óleo de soja, rico em ácido linoleico (18:2 n-6), pela FSZ, rica em ácido docosaexaenoico (22:6 n-3). Portanto, era esperado que houvesse a alteração dessa relação, no sentido de diminuição na quantidade de n-6 frente ao aumento no n-3. Já foi demonstrado que o aumento da quantidade de ácidos graxos da série n-3 em dietas para a tilápia influencia o desempenho zootécnico de forma negativa, piorando o eficiência alimentar e reduzindo taxa de eficiência proteica (Ng *et al.*, 2001), bem como a taxa de crescimento específico e o ganho de peso (Huang *et al.*, 1998). Vários autores sugerem que, além das exigências dos peixes de águas quentes por ácidos graxos da série n-6, dietas desbalanceadas, com maiores quantidades de PUFA, podem aumentar a suscetibilidade das membranas à peroxidação lipídica, causando uma redução nas concentrações de vitamina E nos tecidos e consequente redução na resposta imune e no desempenho zootécnico (Wang *et al.*, 2006). No entanto, no presente estudo, exceto pelo aumento no consumo e consequente piora na conversão alimentar aparente, a alteração no perfil de ácidos graxos na dieta não afetou negativamente os parâmetros de desempenho, confirmando resultados já relatados por autores que testaram a inclusão de PUFA na dieta de tilápias (Al-Souti *et al.*, 2012, Bozaoglu and Bilguven, 2012, Han *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2006).

O DHA tem ação anti-inflamatória e atua no sistema imune, aumentando da atividade de macrófagos, estimulando a proliferação de linfócitos e a atividade das células “natural killers” (NK) (Wang *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2016). Juntamente com EPA e ácido araquidônico são precursores dos eicosanoides, é o principal componente das membranas das células do cérebro e da retina de peixes e aumenta permeabilidade de membranas celulares, auxiliando na tolerância a habitats mais frios (Raposo *et al.*, 2016, Raposo and de Moraes, 2015, Raposo *et al.*, 2013, Barreira *et al.*, 2015, Kousoulaki *et al.*, 2015, Wall *et al.*, 2010).

Estudos sobre a exposição de tilápias ao choque térmico (baixas temperaturas) demonstrou que a espécie utiliza os ácidos graxos de forma seletiva, priorizando a utilização dos ácidos graxos saturados nas primeiras horas, passando a utilizar os PUFA da série n-3 à medida que a exposição a baixas temperaturas se prolonga por mais de 24 horas (He *et al.*, 2015). Dessa forma, parece oportuno propor a realização de estudos sobre a utilização por períodos prolongados de dietas que possam alterar a composição corporal em ácidos graxos, elevando os

níveis de PUFA da série n-3 na carcaça, definindo o potencial de uso de “dietas preparatórias” para os períodos de baixas temperaturas.

Outra possível aplicação de resultados de estudos prolongados seria a definição de dietas destinadas à preparação ou recuperação dos peixes para/de situações estressantes. Por exemplo, o enriquecimento das dietas com EPA e DHA aumentou a sobrevivência de larvas do lúcio, *Sander lucioperca*, submetidas ao estresse de confinamento (Lund and Steenfeldt, 2011) e de larvas do “European seabass” submetidas ao stress de manejo (Atalah *et al.*, 2011), bem como estimulou o sistema imune não-específico e as respostas anti-inflamatórias de tilápias (Chen *et al.*, 2016) e aumentou a tolerância de trutas à exposição ao mercúrio e cádmio (Ferain *et al.*, 2016).

O enriquecimento de dietas para reprodutores com ácidos graxos poli-insaturados tem um potencial de aplicação comercial, pois há indícios que peixes utilizam as reservas de ácidos graxos de forma seletiva, priorizando a disponibilização dos poli-insaturados presente nos músculos, para a formação de gônadas e ovócitos, podendo influenciar também o desempenho reprodutivo e o desenvolvimento larval (Liu *et al.*, 2014, Ng and Wang, 2011, Morais *et al.*, 2014, Yanes-Roca *et al.*, 2009). No entanto, ressalta-se a importância de mais estudos que avaliem essa influência em tilápia.

Os benefícios do consumo de dietas contendo níveis elevados de PUFA da série n-3 pelo homem incluem a prevenção de doenças cardíacas, cardiovasculares, inflamatórias, desenvolvimento neurológico e prevenção do câncer de próstata, seios e colo-retal (Hammad *et al.*, 2016, Simopoulos, 2016, Barreira *et al.*, 2015, Kent *et al.*, 2015, Raposo and de Morais, 2015, Nichols *et al.*, 2014). Aliado a isso, há evidências que sugerem que os humanos evoluíram consumindo uma dieta com uma razão de n-6/n-3 de 1:1 e que parte dos problemas de saúde modernos, derivam das atuais dietas, em que essa relação de ácidos graxos está entre 20-25:1 (Simopoulos, 2008, Simopoulos, 2011). Portanto, há uma recomendação da organização global pelo EPA e DHA (GOED) para um consumo de 500 mg de DHA por dia.

Em se considerando os resultados do presente estudo, o consumo de 150 g de tilápia alimentadas com dietas contendo mais que 5% de FSZ já seria mais que suficientes para atender as recomendações de consumo de DHA pelo homem. Há de se considerar, no entanto, que as análises de ácidos graxos foram feitas sobre o

peixe inteiro e possivelmente os resultados de deposição são superiores quando comparados aos dos filés. Desta forma, estudos que avaliem o efeito do DHA no sistema imune, tolerância a baixas temperaturas, desempenho reprodutivo e efeitos do enriquecimento sobre a qualidade do produto final são necessários para o avanço na definição das possíveis aplicações comerciais da farinha de *Schizochytrium* sp.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microalga *Chlorella* sp. é comprovadamente uma boa fonte de proteína e aminoácidos, e a microalga *Schizochytrium* sp. uma boa fonte de energia e ácidos graxos par a dieta de peixes. A tilápia tem uma alta capacidade de assimilação dos nutrientes de ambas as microalgas testadas, mas níveis crescentes de microalgas nas dietas reduziu a digestibilidade da proteína e energia, assim como também aumentou o consumo e piorou a conversão alimentar dos peixes. Portanto, a inclusão de *Schizochytrium* sp. em dietas necessita de uma avaliação custo-benefício.

Como benefícios, essa inclusão permitiu uma alteração do perfil de ácidos graxos na carcaça dos peixes, com enriquecimento do perfil de ácidos graxos poli-insaturados da série n-3. Isso pode refletir em uma série de possibilidades para aplicações comerciais, como: dietas para reprodutores visando uma melhora na no desempenho reprodutivo e na sobrevivência larval; dietas imunoestimulantes e preparatórias para períodos de stress; e enriquecimento de filés visando a oferta de produtos benéficos a saúde humana.

Esse estudo demonstrou alguns dos diversos potenciais de aplicações das microalgas descritos na bibliografia. Não há dúvidas que, direta ou indiretamente, esses microrganismos cada vez mais farão parte do nosso cotidiano e, toda contribuição científica e técnica, nesse momento de avaliação e desenvolvimento desses produtos, é de grande valia para o direcionamento de futuros estudos.

REFERÊNCIAS

- Al-Souti, A., Al-Sabahi, J., Soussi, B. & Goddard, S. (2012) The effects of fish oil-enriched diets on growth, feed conversion and fatty acid content of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.* *Food Chemistry*, **133**, 723-727.
- Alkhamis, Y. & Qin, J.G. (2016) Comparison of pigment and proximate compositions of *Tisochrysis lutea* in phototrophic and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology*, **28**, 35-42.
- Andersen, R. A. (2013). The Microalgal cell with reference in mass culture In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. (Richmond, A.; Hu, Q. eds), pp 1-21. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R. & Paul, N.A. (2016) The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, **28**, 511-524.
- Atalah, E., Cruz, C.M.H., Izquierdo, M.S., Rosenlund, G., Caballero, M.J., Valencia, A. & Robaina, L. (2007) Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **270**, 178-185.
- Atalah, E., Hernandez-Cruz, C.M., Ganuza, E., Benitez-Santana, T., Ganga, R., Roo, J., Montero, D. & Izquierdo, M. (2011) Importance of dietary arachidonic acid for the growth, survival and stress resistance of larval European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture Research*, **42**, 1261-1268.
- Association of official analytical chemists (1999) *Official Methods of Analysis*. 17th ed. 1141 p. Gaithersburg.
- Bai, S.C., Koo, J.W., Kim, K.W. & Kim, S.K. (2001) Effects of *Chlorella* powder as a feed additive on growth performance in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegelii* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, **32**, 92-98.
- Barreira, L., Pereira, H., Gangadhar, K.N., Custódio, L. & Varela, J. (2015) Chapter 13 - Medicinal Effects of Microalgae-Derived Fatty Acids A2 - Kim, Se-Kwon In *Handbook of Marine Microalgae*, pp. 209-231. Academic Press, Boston.
- Becker, E.W. (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, **25**, 207-210.
- Becker, W.E. (2013a) Microalgae for Human and Animal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (Richmond, A.; Hu, Q. eds). pp. 461-504. Wiley-Blackwell, Oxford.

Becker, W.E. (2013b) Microalgae for Aquaculture: Nutricional Aspects. In Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology (Richmond, A.; Hu, Q. eds). pp. 461-504. Wiley-Blackwell, Oxford.

Bellinger EG, Sigee DC. (2010) Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators. 284 p. Wiley-Blackwell, Oxford.

Benedict, R.C. (1987) Determination of nitrogen and protein-content of meat and meat-products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **70**, 69-74.

Beveridge, M.C.M. & Baird, D.J. (2000) Diet, feeding and digestive physiology In *Tilapias: Biology and Exploitation* (Beveridge, M.C.M. & McAndrew, B.J. eds.), pp. 59-87. Springer Netherlands, Dordrecht.

Bicudo, C.E.M. & Menezes, M. (2006) Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições. 502p. RiMa Editora, São Carlos.

Bongiorni, L. (2012) Thraustochytrids, a Neglected Component of Organic Matter Decomposition and Food Webs in Marine Sediments in *Biology of Marine Fungi* (Raghukumar, C. ed.), pp. 1-13. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Borges-Campos, V., Barbarino, E. & Lourenço, S.d.O. (2010) Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*, **40**, 309-317.

Borowitzka, M.A. (2013) High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, **25**, 743-756.

Bozaoglu, S.A. & Bilguven, M. (2012) The Effects of Different Oils Sources on the Growth Performance and Body Composition of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **11**, 853-857.

Brito, M.S., de Oliveira, C.F.S., da Silva, T.R.G., de Lima, R.B., Moraes, S.N. & da Silva, J.H.V. (2009) Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos—revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, **2**, 111-117.

Britz, P. (2008) Tilapia: Biology, Culture and Nutrition. *African Journal of Aquatic Science*, **33**, 103-103.

Brown, M.R. & Miller, K.A. (1992) The ascorbic-acid content of 11 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, **4**, 205-215.

Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. & Trenerry, C. (1999) The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, **11**, 247-255.

Caceres, T.P., Megharaj, M. & Naidu, R. (2008) Biodegradation of the Pesticide Fenamiphos by Ten Different Species of Green Algae and Cyanobacteria. *Current Microbiology*, **57**, 643-646.

Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Morinigo, M.A. & Esteban, M.A. (2012a) Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and Tissue Research*, **350**, 477-489.

Cerezuela, R., Guardiola, F.A., Gonzalez, P., Meseguer, J. & Esteban, M.A. (2012b) Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, **33**, 342-349.

Cerezuela, R., Guardiola, F.A., Meseguer, J. & Esteban, M.A. (2012c) Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: effects on the immune system. *Fish Physiology and Biochemistry*, **38**, 1729-1739.

Chapman, R.L. (2013) Algae: the world's most important "plants"-an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **18**, 5-12.

Chauton, M.S., Reitan, K.I., Norsker, N.H., Tveteras, R. & Kleivdal, H.T. (2015) A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. *Aquaculture*, **436**, 95-103.

Cheah, W.Y., Ling, T.C., Juan, J.C., Lee, D.J., Chang, J.S. & Show, P.L. (2016) Biorefineries of carbon dioxide: From carbon capture and storage (CCS) to bioenergies production. *Bioresource Technology*, **215**, 346-356.

Chen, C.Y., Sun, B.L., Guan, W.T., Bi, Y.Z., Li, P.Y., Ma, J.Y., Chen, F., Pan, Q. & Xie, Q.M. (2016) N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effects of linolenic acid on non-specific immunity and anti-inflammatory responses in juvenile fish. *Aquaculture*, **450**, 250-257.

Chen, C.Y., Sun, B.L., Li, X.X., Li, P.Y., Guan, W.T., Bi, Y.Z. & Pan, Q. (2013) N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish. *Aquaculture*, **416**, 99-104.

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**, 294-306.

Chiu, A., Li, L.P., Guo, S.J., Bai, J.F., Fedor, C. & Naylor, R.L. (2013) Feed and fishmeal use in the production of carp and tilapia in China. *Aquaculture*, **414**, 127-134.

Chou, B.S. & Shiau, S.Y. (1999) Both n-6 and n-3 fatty acids are required for maximal growth of juvenile hybrid tilapia. *North American Journal of Aquaculture*, **61**, 13-20.

Christaki, E., Bonos, E. & Florou-Paneri, P. (2015) Chapter 14 - Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition A2 - Kim, Se-Kwon In *Handbook of Marine Microalgae*, pp. 233-243. Academic Press, Boston.

Christaki, E., Florou-Paneri, P. & Bonos, E. (2011) Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **62**, 794-799.

Christaki, E., Karatzia, M., Bonos, E., Florou-Paneri, P. & Karatzias, C. (2012) Effect of Dietary *Spirulina platensis* on Milk Fatty Acid Profile of Dairy Cows. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, **7**, 597-604.

Costa, D.F.A., Quigley, S.P., Isherwood, P., McLennan, S.R. & Poppi, D.P. (2016) Supplementation of cattle fed tropical grasses with microalgae increases microbial protein production and average daily gain. *Journal of Animal Science*, **94**, 2047-2058.

Coutinho, P., Rema, P., Otero, A., Pereira, O. & Fabregas, J. (2006) Use of biomass of the marine microalga *Isochrysis galbana* in the nutrition of goldfish (*Carassius auratus*) larvae as source of protein and vitamins. *Aquaculture Research*, **37**, 793-798.

Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A.R. & Pourhassan, M. (2007) Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresource Technology*, **98**, 1176-1182.

Demirbas, A. & Demirbas, M.F. (2011) Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, **52**, 163-170.

Diogenes, A.F., Fernandes, J.B.K., Dorigam, J.C.P., Sakomura, N.K., Rodrigues, F.H.F., Lima, B.T.M. & Goncalves, F.H. (2016) Establishing the optimal essential amino acid ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method. *Aquaculture Nutrition*, **22**, 435-443.

Edwards, P. (2015) Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture*, **447**, 2-14.

Eknath, A.E. & Hulata, G. (2009) Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Reviews in Aquaculture*, **1**, 197-213.

Falkowski, P.G. & Knoll, A.H. (2007) CHAPTER 1 - An Introduction to Primary Producers in the Sea: Who They Are, What They Do, and When They Evolved In *Evolution of Primary Producers in the Sea*, pp. 1-6. Academic Press, Burlington.

Ferain, A., Bonnineau, C., Neefs, I., Rees, J.F., Larondelle, Y., De Schamphelaere, K.A.C. & Debier, C. (2016) The fatty acid profile of rainbow trout liver cells modulates their tolerance to methylmercury and cadmium. *Aquatic Toxicology*, **177**, 171-181.

Fernandes, A.C., de Carvalho, P., Pezzato, L.E., Koch, J.F.A., Teixeira, C.P., Cintra, F.T., Damasceno, F.M., Amorin, R.L., Padovani, C.R. & Barros, M.M. (2016) The effect of digestible protein to digestible energy ratio and choline supplementation on growth, hematological parameters, liver steatosis and size-sorting stress response in Nile tilapia under field condition. *Aquaculture*, **456**, 83-93.

Fontes, A.; Nikolik, G.; Rasmussen, R.; Ikeda, V. (2016) Feeding Nemo: Turning Brazil's Economic Turmoil into Bussiness Opportunities. *Rabobank Industry Note* #564.

Francis, D.S., Thanuthong, T., Senadheera, S., Paolucci, M., Coccia, E., De Silva, S.S. & Turchini, G.M. (2014) n-3 LC-PUFA deposition efficiency and appetite-regulating hormones are modulated by the dietary lipid source during rainbow trout grow-out and finishing periods. *Fish Physiology and Biochemistry*, **40**, 577-593.

Furuya, W.M., Botaro, D., Neves, P.R., Silva, L.C.R. & Hayashi, C. (2004) Lysine requirement of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), for grow-out phase = Exigência de lisina pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), na fase de terminação. *Ciência Rural*, **34**, 1571-1577

Furuya, W.M., dos Santos, V.G., Rosa Silva, L.C., Barriviera Furuya, V.R. & Sakaguti, E.S. (2006) Digestible lysine requirements of Nile tilapia juveniles. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, **35**, 937-942.

Furuya, W.M. (2010) Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. 100p. Toledo, Brasil.

Furuya, W.M., Michelato, M., Graciano, T.S., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Furuya, V.R.B. & De Moura, L.B. (2013) Digestible lysine requirement of Nile tilapia from 86 to 227 g fed arginine to lysine balanced diets. *Semina:Ciencias Agrarias*, **34**, 1945-1954.

Gao, Q.T., Wong, Y.S. & Tam, N.F.Y. (2011) Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species. *Marine Pollution Bulletin*, **63**, 445-451.

Gerken, H.G., Donohoe, B. & Knoshaug, E.P. (2013) Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, **237**, 239-253.

Ginzberg, A., Cohen, M., Sod-Moriah, U.A., Shany, S., Rosenshtrauch, A. & Arad, S. (2000) Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology*, **12**, 325-330.

Goncalves, G.S., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Rocha, D.F., Kleeman, G.K. & Santa Rosa, M.J. (2009) Digestible nutrients of nile Tilapia feed. *Boletim Do Instituto De Pesca*, **35**, 201-213.

Goncalves, L.U., Cerozi, B.D., Silva, T.S.C., Zanon, R.B. & Cyrino, J.E.P. (2015) Crude glycerin as dietary energy source for Nile tilapia. *Aquaculture*, **437**, 230-234.

Gouveia, L., Choubert, G., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J. & Gomes, E. (2002) Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquaculture Research*, **33**, 987-993.

Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O. & Empis, J. (2003) Colouring ornamental fish (Cyprinus carpio and Carassius auratus) with microalgal biomass. *Aquaculture Nutrition*, **9**, 123-129.

Grammes, F., Reveco, F.E., Romarheim, O.H., Landsverk, T., Mydland, L.T. & Overland, M. (2013) Candida utilis and Chlorella vulgaris Counteract Intestinal Inflammation in Atlantic Salmon (Salmo salar L.). *Plos One*, **8**, 13.

Grinstead, G.S., Tokach, M.D., Dritz, S.S., Goodband, R.D. & Nelssen, J.L. (2000) Effects of Spirulina platensis on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, **83**, 237-247.

Guedes, A.C., Sousa-Pinto, I. & Malcata, F.X. (2015) Chapter 8 - Application of Microalgae Protein to Aquafeed A2 - Kim, Se-Kwon In Handbook of Marine Microalgae, pp. 93-125. Academic Press, Boston.

Hammad, S., Pu, S.H. & Jones, P.J. (2016) Current Evidence Supporting the Link Between Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Lipids*, **51**, 507-517.

Han, C.Y., Zheng, Q.M. & Feng, L.N. (2013) Effects of total replacement of dietary fish oil on growth performance and fatty acid compositions of hybrid tilapia (Oreochromis niloticus x O. aureus). *Aquaculture International*, **21**, 1209-1217.

Harun, R., Singh, M., Forde, G. & Danquah, M. (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**, 1037-1047.

He, J., Qiang, J., Yang, H., Xu, P., Zhu, Z.X. & Yang, R.Q. (2015) Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia Oreochromis niloticus (L.), subjected to short-term low temperature stress. *Journal of Thermal Biology*, **53**, 90-97.

He, Y.J., Chen, L.J., Zhou, Y.C., Chen, H., Zhou, X.L., Cai, F., Huang, J., Wang, M.Z., Chen, B.L. & Guo, Z. (2016) Analysis and model delineation of marine microalgae growth and lipid accumulation in flat-plate photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, **111**, 108-116.

Hemalatha, M. & Mohan, S.V. (2016) Microalgae cultivation as tertiary unit operation for treatment of pharmaceutical wastewater associated with lipid production. *Bioresource Technology*, **215**, 117-122.

Hlophe, S.N., Moyo, N.A.G. & Ncube, I. (2014) Postprandial changes in pH and enzyme activity from the stomach and intestines of Tilapia rendalli (Boulenger, 1897), Oreochromis mossambicus (Peters, 1852) and Clarias gariepinus (Burchell, 1822). *Journal of Applied Ichthyology*, **30**, 35-41.

Honda, R., Boonnorat, J., Chiemchaisri, C., Chiemchaisri, W. & Yamamoto, K. (2012) Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *Bioresource Technology*, **125**, 59-64.

Hong, D.D., Hoang, T.L.A. & Ngo, T.H.T. (2011) Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6 isolated from Phu Quoc island, Kien Giang province, Vietnam. *Journal of Phycology*, **47**, 944-954.

Hong, S.-J. & Lee, C.-G. (2015) Chapter 23 - Microalgal Systems Biology Through Genome-Scale Metabolic Reconstructions for Industrial Applications A2 - Kim, Se-Kwon In Handbook of Marine Microalgae, pp. 353-370. Academic Press, Boston.

Hua, K. & Bureau, D.P. (2009) Development of a model to estimate digestible lipid content of salmonid fish feeds. *Aquaculture*, **286**, 271-276.

Huang, C.H., Huang, M.C. & Hou, P.C. (1998) Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **120**, 331-336.

Huber, P.J. (1964) Robust Estimation of a Location Parameter. *The Annals of Mathematical Statistics*, **35**, 73-101.

Hultberg, M., Bodin, H., Ardal, E. & Asp, H. (2016) Effect of microalgal treatments on pesticides in water. *Environmental Technology*, **37**, 893-898.

Hussein, E.E.S., Dabrowski, K., El-Saidy, D. & Lee, B.J. (2013) Enhancing the growth of Nile tilapia larvae/juveniles by replacing plant (gluten) protein with algae protein. *Aquaculture Research*, **44**, 937-949.

Kent, M., Welladsen, H.M., Mangott, A. & Li, Y. (2015) Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. *Plos One*, **10**, 14.

Khataee, A.R., Zarei, M. & Pourhassan, M. (2010) Bioremediation of Malachite Green from Contaminated Water by Three Microalgae: Neural Network Modeling. *Clean-Soil Air Water*, **38**, 96-103.

Kim, K.W., Bai, S.C.C., Koo, J.W., Wang, X.J. & Kim, S.K. (2002) Effects of dietary *Chlorella ellipsoidea* supplementation on growth, blood characteristics, and whole-body composition in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **33**, 425-431.

Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I. & De Scheemaker, G. (2012) Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition*, **18**, 521-531.

Knuckey, R., Brown, M., Robert, R. & Frampton, D. (2006) Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, **35**, 300-313.

Kobayashi, M., Msangi, S., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M.M. & Anderson, J.L. (2015) Fish to 2030: The Role and Opportunity for Aquaculture. *Aquaculture Economics & Management*, **19**, 282-300.

Koch, J.F., Rawles, S.D., Webster, C.D., Cummins, V., Kobayashi, Y., Thompson, K.R., Gannam, A.L., Twibell, R.G. & Hyde, N.M. (2016) Optimizing fish meal-free commercial diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, **452**, 357-366.

Kotrbaček, V., Doubek, J. & Doucha, J. (2015) The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *Journal of Applied Phycology*, **27**, 2173-2180.

Kousoulaki, K., Morkore, T., Nengas, I., Berge, R.K. & Sweetman, J. (2016) Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **451**, 47-57.

Kousoulaki, K., Ostbye, T.K.K., Krasnov, A., Torgersen, J.S., Morkore, T. & Sweetman, J. (2015) Metabolism, health and fillet nutritional quality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae. *Journal of Nutritional Science*, **4**, 13.

Kupczynski, R., Janeczek, W., Kinal, S. & Kuczaj, M. (2011) Possibility of modifying the fatty acid profile of cow's milk: marine algae application. *Medycyna Weterynaryjna*, **67**, 304-308.

Kuz'mina, V.V. (1996) Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, **148**, 25-37.

Kuz'mina, V.V., Zolotareva, G.V. & Sheptitsky, V.A. (2015) The in vitro effect of pH on glycosidase activity in potential preys of planktivorous and benthivorous fish. *Inland Water Biology*, **8**, 182-187.

Lee, R.E. (2008) *Phycology*. 547p. Cambridge University Press.

Leenhouwers, J.I., Ortega, R.C., Verreth, J.A.J. & Schrama, J.W. (2007) Digesta characteristics in relation to nutrient digestibility and mineral absorption in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed cereal grains of increasing viscosity. *Aquaculture*, **273**, 556-565.

Li, P., Mai, K.S., Trushenski, J. & Wu, G.Y. (2009) New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, **37**, 43-53.

Lika, K. & Papadakis, I.A. (2009) Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *Journal of Sea Research*, **62**, 135-146.

Lim, C., Yildirim-Aksoy, M. & Klesius, P. (2011) Lipid and Fatty Acid Requirements of Tilapias. *North American Journal of Aquaculture*, **73**, 188-193.

Liu, J. & Chen, F. (2016) *Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects in Microalgae Biotechnology* (Posten, C. & Feng Chen, S. eds.), pp. 1-35. Springer International Publishing, Cham.

Liu, J.J., Li, Q.F., Guo, B.F. & Gao, Y. (2014) Selective utilization of fatty acids by Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray, 1835) during gonadal development and first year juvenile growth. *Journal of Applied Ichthyology*, **30**, 1181-1185.

Lourenço, S.O., Barbarino, E., Lavín, P.L., Lanfer Marquez, U.M. & Aidar, E. (2004) Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology*, **39**, 17-32.

Lovell, R.T. (1998) *Nutrition and Feeding of Fish*. 2ed. Kluwer Academic Publisher, Boston, MS, USA.

Lund, I. & Steenfeldt, S.J. (2011) The effects of dietary long-chain essential fatty acids on growth and stress tolerance in pikeperch larvae (*Sander lucioperca* L.). *Aquaculture Nutrition*, **17**, 191-199.

Ma, F., Li, X.Q., Li, B.A. & Leng, X.J. (2015) Effects of extruded and pelleted diets with differing protein levels on growth and nutrient retention of tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture International*, **23**, 1341-1356.

Ma, F., Li, X.Q., Li, B.A. & Leng, X.J. (2016) Effects of extruded and pelleted diets with differing lipid levels on growth, nutrient retention and serum biochemical indices of tilapia (*Oreochromis aureus* x *Tilapia nilotica*). *Aquaculture Nutrition*, **22**, 61-71.

Mahboob, S., Rauf, A., Ashraf, M., Sultana, T., Sultana, S., Jabeen, F., Rajoka, M.I., Al-Balawi, H.F.A. & Al-Ghanim, K.A. (2012) High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. *Aquaculture International*, **20**, 455-466.

Maisashvili, A., Bryant, H., Richardson, J., Anderson, D., Wickersham, T. & Drewery, M. (2015) The values of whole algae and lipid extracted algae meal for aquaculture. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, **9**, 133-142.

Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C. & Mollace, V. (2016) Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, **213**, 8-14.

Manganelli, M. (2016) Blooms of toxic microorganisms in aquatic environments: marine microalgae and freshwater cyanobacteria. A brief review with a particular focus on the Italian situation Diffusion and health effects of toxic marine microalgae and freshwater cyanobacteria in Italy. *Rendiconti Lincei-Scienze Fisiche E Naturali*, **27**, 135-143.

Mariotti, F., Tomé, D. & Mirand, P.P. (2008) Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48**, 177-184.

Matos, A.P., Feller, R., Moecke, E.H.S., de Oliveira, J.V., Furigo, A., Derner, R.B. & Sant'Anna, E.S. (2016) Chemical Characterization of Six Microalgae with Potential Utility for Food Application. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **93**, 963-972.

Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I.T. & Egan, S. (2016) Tiny Microbes with a Big Impact: The Role of Cyanobacteria and Their Metabolites in Shaping Our Future. *Marine Drugs*, **14**, 19.

McAndrew, B.J. (2000) Evolution, phylogenetic relationships and biogeography In Tilapias: Biology and Exploitation (Beveridge, M.C.M. & McAndrew, B.J. eds.), pp. 1-32. Springer Netherlands, Dordrecht.

Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K. & Mukherjee, S.C. (2013) Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, **39**, 431-457.

Mezzomo, N., Saggiorato, A.G., Siebert, R., Tatsch, P.O., Lago, M.C., Hemkemeier, M., Costa, J.A.V., Bertolin, T.E. & Colla, L.M. (2010) Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, **30**, 173-178.

Michelato, M., Furuya, W.M., Graciano, T.S., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., de Moura, L.B. & Furuya, V.R.B. (2013) Digestible methionine plus cystine requirement for Nile tilapia from 550 to 700 g. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, **42**, 7-12.

Milledge, J. (2011) Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, **10**, 31-41.

Mitra, D., van Leeuwen, J. & Lamsal, B. (2012) Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, **1**, 40-48.

Moder, K. (2010) Alternatives to F-test in one way ANOVA in case of heterogeneity of variances (a simulation study). *Psychological Test and Assessment Modeling*, **52**, 343-353.

Morais, S., Mendes, A.C., Castanheira, M.F., Coutinho, J., Bandarra, N., Dias, J., Conceicao, L.E.C. & Pousao-Ferreira, P. (2014) New formulated diets for *Solea senegalensis* broodstock: Effects of parental nutrition on biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids and performance of early larval stages and juvenile fish. *Aquaculture*, **432**, 374-382.

Moreira, D. & Pires, J.C.M. (2016) Atmospheric CO₂ capture by algae: Negative carbon dioxide emission path. *Bioresource Technology*, **215**, 371-379.

Moro, G.V., Silva, T.S.C., Zanon, R.B. & Cyrino, J.E.P. (2016) Starch and lipid in diets for dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816): growth, nutrient utilization and digestive enzymes. *Aquaculture Nutrition*, **22**, 890-898.

Mortensen, L.M. & Gislerod, H.R. (2016) The growth of *Chlorella sorokiniana* as influenced by CO₂, light, and flue gases. *Journal of Applied Phycology*, **28**, 813-820.

National Research Council - NRC. (2011) Nutrient Requirement of fish and shrimp. 360 p. The National Academic Press, Washington.

Nascimento, I.A., Izabel Marques, S.S., Dominguez Cabanelas, I.T., de Carvalho, G.C., Nascimento, M.A., de Souza, C.O., Druzian, J.I., Hussain, J. & Liao, W. (2014) Microalgae Versus Land Crops as Feedstock for Biodiesel: Productivity, Quality, and Standard Compliance. *Bioenergy Research*, **7**, 1002-1013.

Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K. & Nichols, P.D. (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 15103-15110.

Ng, D.H.P., Ng, Y.K., Shen, H. & Lee, Y.K. (2015) Chapter 6 - Microalgal Biotechnology: The Way Forward A2 - Kim, Se-Kwon In Handbook of Marine Microalgae, pp. 69-80. Academic Press, Boston.

Ng, W.-K. & Romano, N. (2013) A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*, **5**, 220-254.

Ng, W.K., Lim, P.K. & Sidek, H. (2001) The influence of a dietary lipid source on growth, muscle fatty acid composition and erythrocyte osmotic fragility of hybrid tilapia. *Fish Physiology and Biochemistry*, **25**, 301-310.

Ng, W.K. & Wang, Y. (2011) Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture*, **314**, 122-131.

Nichols, P.D., McManus, A., Krail, K., Sinclair, A.J. & Miller, M. (2014) Recent Advances in Omega-3: Health Benefits, Sources, Products and Bioavailability. *Nutrients*, **6**, 3727-3733.

Niu, H.J.Y. & Leung, D.Y.C. (2010) A review on the removal of nitrogen oxides from polluted flow by bioreactors. *Environmental Reviews*, **18**, 175-189.

Norambuena, F., Hermon, K., Skrzypczyk, V., Emery, J.A., Sharon, Y., Beard, A. & Turchini, G.M. (2015) Algae in Fish Feed: Performances and Fatty Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon. *Plos One*, **10**, 17.

Okamura, D., Araújo, F.G.d., Rosa, P.V.e., Freitas, R.T.F.d., Murgas, L.D.S. & Cesar, M.P. (2010) Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **39**, 971-976.

Olguin, E.J., Dorantes, E., Castillo, O.S. & Hernandez-Landa, V.J. (2015) Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. *Journal of Applied Phycology*, **27**, 1813-1822.

Olvera-Novoa, M.A., Dominguez-Cen, L.J. & Olivera-Castillo, L. (1998) Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research*, **29**, 709-715.

Palmeigiano, G.B., Agradi, E., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Rigamonti, E., Sicuro, B. & Zoccarato, I. (2005) *Spirulina* as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture Research*, **36**, 188-195.

Patterson, D. & Gatlin, D.M. (2013) Evaluation of whole and lipid-extracted algae meals in the diets of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, **416**, 92-98.

Pires, J.C.M. (2015) Chapter 5 - Mass Production of Microalgae A2 - Kim, Se-Kwon In *Handbook of Marine Microalgae*, pp. 55-68. Academic Press, Boston.

Peixoto, M.J., Salas-Leitón, E., Brito, F., Pereira, L.F., Svendsen, J.C., Baptista, T., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P.A., Gonçalves, J.F.M. & de Almeida Ozório, R.O. (2016) Effects of dietary *Gracilaria* sp. and *Alaria* sp. supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. *Journal of Applied Phycology*, 1-15.

Portz, L.; Furuya, W.M. (2012) Energia, proteína e aminoácidos. In *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira*. (Fracalossi, D.M.; Cyrino, J.E.P. Eds.). pp.65-77 Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Florianópolis.

Posada, J.A., Brentner, L.B., Ramirez, A. & Patel, M.K. (2016) Conceptual design of sustainable integrated microalgae biorefineries: Parametric analysis of energy use, greenhouse gas emissions and techno-economics. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, **17**, 113-131.

Qiao, H., Wang, H., Song, Z., Ma, J., Li, B., Liu, X., Zhang, S., Wang, J. & Zhang, L. (2014) Effects of dietary fish oil replacement by microalgae raw materials on growth performance, body composition and fatty acid profile of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, **20**, 646-653.

Ranjitha, J. & Vijayalakshmi, S. (2015) Micro-algae as a substrate for biofuel production - A review. *Research Journal of Biotechnology*, **10**, 99-107.

Raposo, M.F.D. & de Moraes, A. (2015) Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences*, **125**, 32-41.

Raposo, M.F.D., de Moraes, A. & de Moraes, R. (2016) Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. *Marine Drugs*, **14**.

Raposo, M.F.D., de Moraes, R. & de Moraes, A. (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, **93**, 479-486.

Rasmussen, S.A., Andersen, A.J.C., Andersen, N.G., Nielsen, K.F., Hansen, P.J. & Larsen, T.O. (2016) Chemical Diversity, Origin, and Analysis of Phycotoxins. *Journal of Natural Products*, **79**, 662-673.

Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T. & Bux, F. (2011) Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, **88**, 3411-3424.

Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T. & Bux, F. (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, **103**, 444-467.

Riano, B., Molinuevo, B. & Garcia-Gonzalez, M.C. (2011) Treatment of fish processing wastewater with microalgae-containing microbiota. *Bioresource Technology*, **102**, 10829-10833.

Richmond, A. & Hu, Q. (2013) *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*.

Roy, S.S. & Pal, R. (2015) Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, **68**, 1-8.

Sakabe, R., de Moraes, F.R., Belo, M.A.D., Pilarski, F. & de Moraes, J.R.E. (2013) Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia fed n-3 and n-6 essential fatty acids. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **48**, 313-319.

Saeid, A., Chojnacka, K., Korczynski, M., Korniewicz, D. & Dobrzanski, Z. (2013) Biomass of *Spirulina maxima* enriched by biosorption process as a new feed supplement for swine. *Journal of Applied Phycology*, **25**, 667-675.

Sarker, P.K., Gamble, M.M., Kelson, S. & Kapuscinski, A.R. (2016a) Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp feed ingredients. *Aquaculture Nutrition*, **22**, 109-119.

Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Lanois, A.J., Livesey, E.D., Bernhard, K.P. & Coley, M.L. (2016b) Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS ONE*, 11.

Schlesinger, A., Eisenstadt, D., Bar-Gil, A., Carmely, H., Einbinder, S. & Gressel, J. (2012) Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnology Advances*, **30**, 1023-1030.

Scorvo Filho, J.D., Frascá-Scorvo, C.M.D., Alves, J.M.C. & Souza, F.R.A.d. (2010) A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **39**, 112-118.

Selvaratnam, T., Henkanatte-Gedera, S.M., Muppaneni, T., Nirmalakhandan, N., Deng, S. & Lammers, P.J. (2016) Maximizing recovery of energy and nutrients from urban wastewaters. *Energy*, **104**, 16-23.

Sergejevova, M. & Masojidek, J. (2012) Chlorella biomass as feed supplement for freshwater fish: sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Research*, **44**, 157-159.

Shannon, E. & Abu-Ghannam, N. (2016) Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. *Marine Drugs*, **14**, 23.

Shi, Z., Li, X.Q., Chowdhury, M.A.K., Chen, J.N. & Leng, X.J. (2016) Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture*, **460**, 37-44.

Simopoulos, A.P. (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, **233**, 674-688.

Simopoulos, A.P. (2011) Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*, **44**, 203-215.

Simopoulos, A.P. (2016) An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, **8**.

Sindirações. (2015). Annual report 2015: calendar year 2015 = Relatório anual 2015: ano calendário 2015. Sindirações, São Paulo, São Paulo, Brazil. Available at http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2015/12/boletim_informativo_do_setor_de_alimentacao_animal_dez2015_online.pdf. [Accessed Feb 12, 2016]

Singh, S., Kate, B. & Banerjee, U. (2005) Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, **25**, 73-95.

Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G. & Becker, K. (2011) Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chemistry*, **127**, 1409-1426.

Skrede, A., Mydland, L.T., Ahlstrom, O., Reitan, K.I., Gislerod, H.R. & Overland, M. (2011) Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **20**, 131-142.

Storebakken, T. (1985) Binders in fish feeds. 1. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture*, **47**, 11-26.

Storebakken, T. & Austreng, E. (1987) Binders in fish feeds.2. Effect of different alginates on the digestibility of macronutrients in Rainbow trout. *Aquaculture*, **60**, 121-131.

Storebakken, T., Zhang, Y.X., Kraugerud, O.F., Ma, J.J., Overland, M., Apper, E. & Feneuil, A. (2015) Restricted process water limits starch gelatinization, and reduces digestibility of starch, lipid, and energy in extruded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture*, **448**, 203-206.

Sun, A., Davis, R., Starbuck, M., Ben-Amotz, A., Pate, R. & Pienkos, P. (2011) Comparative cost analysis of algal oil production for biofuels. *Energy*, **36**, 5169-5179.

Tacon, A.G.J. & Metian, M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, **285**, 146-158.

Templeton, D.W. & Laurens, L.M.L. (2015) Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, **11**, 359-367.

Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Caceci, T. & Smith, S.A. (2000) Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, **182**, 317-327.

Tibaldi, E., Chini Zittelli, G., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M.R. & Poli, B.M. (2015) Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried Isochrysis sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, **440**, 60-68.

Tibbetts, S.M., Bjornsson, W.J. & McGinn, P.J. (2015a) Biochemical composition and amino acid profiles of *Nannochloropsis granulata* algal biomass before and after supercritical fluid CO₂ extraction at two processing temperatures. *Animal Feed Science and Technology*, **204**, 62-71.

Tibbetts, S.M., Milley, J.E. & Lall, S.P. (2015b) Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, **27**, 1109-1119.

Tulli, F., Zittelli, G.C., Giorgi, G., Poli, B.M., Tibaldi, E. & Tredici, M.R. (2012) Effect of the Inclusion of Dried *Tetraselmis suecica* on Growth, Feed Utilization, and Fillet Composition of European Sea Bass Juveniles Fed Organic Diets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **21**, 188-197.

Uscanga, A., Moyano, F.J. & Alvarez, C.A. (2010) Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **36**, 1079-1085.

Van Hoestenbergh, S., Fransman, C.A., Luyten, T., Vermeulen, D., Roelants, I., Buysens, S. & Goddeeris, B.M. (2016) Schizochytrium as a replacement for fish oil in a fishmeal free diet for jade perch, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite). *Aquaculture Research*, **47**, 1747-1760.

Viegas, C.V., Hachemi, I., Maki-Arvela, P., Smeds, A., Aho, A., Freitas, S.P., Gorgonio, C.M.D., Carbonetti, G., Peurla, M., Paranko, J., Kumar, N., Aranda, D.A.G. & Murzin, D.Y. (2015) Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella* sp. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, **11**, 156-164.

Vizcaino, A.J., Lopez, G., Saez, M.I., Jimenez, J.A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodriguez, J., Martinez, T.F., Ceron-Garcia, M.C. & Alarcon, F.J. (2014) Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, **431**, 34-43.

Walker, D. (2009) Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. *Journal of Applied Phycology*, **21**, 509-517.

Wall, R., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Stanton, C. (2010) Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, **68**, 280-289.

Walsh, P.J. & Mommsen, T.P. (2001) Evolutionary considerations of nitrogen metabolism and excretion In *Fish Physiology*, Vol. Volume 20, pp. 1-30. Academic Press.

Wang, Z.L., Mai, K.S., Liufu, Z.G., Ma, H.M., Xu, W., Ai, Q.H., Zhang, W.B., Tan, B.P. & Wang, X.J. (2006) Effect of high dietary intakes of vitamin E and n-3 HUFA on immune responses and resistance to *Edwardsiella tarda* challenge in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research*, **37**, 681-692.

Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A., Kato, T. & Sakai, M. (2006) Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, **258**, 157-163.

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J. & Owens, J.M. (2000) Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass & Bioenergy*, **19**, 63-102.

Xu, W., Gao, Z., Qi, Z., Qiu, M., Peng, J.-q. & Shao, R. (2014) Effect of Dietary *Chlorella* on the Growth Performance and Physiological Parameters of Gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **14**, 53-57.

Yanes-Roca, C., Rhody, N., Nystrom, M. & Main, K.L. (2009) Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture*, **287**, 335-340.

Yokoyama, R. & Honda, D. (2007) Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, **48**, 199-211.

Zahran, E. & Risha, E. (2014) Modulatory role of dietary *Chlorella vulgaris* powder against arsenic-induced immunotoxicity and oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, **41**, 654-662.

Zengeya, A.T., Booth, J.A. & Chimimba, T.C. (2015) Broad Niche Overlap between Invasive Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* and Indigenous Congenerics in Southern Africa: Should We be Concerned? *Entropy*, **17**.

Zhang, B., Wang, L.J., Riddicka, B.A., Li, R., Able, J.R., Boakye-Boaten, N.A. & Shahbazi, A. (2016) Sustainable Production of Algal Biomass and Biofuels Using Swine Wastewater in North Carolina, US. *Sustainability*, **8**, 12.

APÊNDICE A.

Perfil completo de ácidos graxos, em % sobre o total de extrato etéreo em matéria seca, da farinha de *Schizochytrium* e perfil completo dos aminoácidos, em matéria seca, da farinha de *Chlorella*.

Farinha de <i>Schizochytrium</i>		Farinha de <i>Chlorella</i>	
Ác Graxos		Aminoácidos %	60,92
Ác. Cáprico	0,041	Ác. Aspartico	5,78
Ác. Láurico	0,349	Ác. Glutâmico	7,21
Ác. Mirístico	10,207	Serina	2,32
Ác. Pentadecanóico	3,088	Glicina	3,57
Ác. 10-Pentadecanóico	0,103	Histidina	1,03
Ác. Palmitoleico	0,174	Taurina	0,00
Ác. Margárico	0,913	Arginina	3,71
Ác. Cis-10-heptadecenóico	0,010	Treonina	2,92
Ác. Esteárico	2,801	Alanina	5,80
Ác. Oleico	0,051	Prolina	2,90
Ác. Linoleico	0,103	Tirosina	2,30
Ác. Gama-linolênico	0,051	Valina	3,61
Ác. Alfa- linolenico LNA	0,041	Metionina	1,08
Ác. Araquídico	0,400	Cistina	1,07
Ác. 9-11-14 Eicosatrienóico	0,195	Isoleucina	2,74
Ác. Araquidônico AA	0,103	Leucina	5,70
Ác. Behenico	0,205	Fenilalanina	3,41
Ác. Erúcico	0,062	Lisina	5,17
Ác. Eicosapentanóico EPA	0,492	Triptofano	0,61
Ác. Lignocérico	0,164		
Ác. Nervonico	0,092		
Ác. Docosaexaenoico DHA	53,139		

APÊNDICE B.

Perfil completo de ácidos graxos das rações do ensaio de desempenho

Ácido graxo	Níveis inclusão <i>Schizochytrium</i> (%)					
	0	1	2,5	5	7,5	10
% conteúdo total estrato etéreo						
Ácido 5,8,11,14,17- EPA (C20:5n3)	0	0,0034	0,0044	0,0099	0,0151	0,0206
Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico (C20:3n6)	0	0,004	0,0053	0,0075	0,0102	0,0127
Alfa Linolênico LNA (C18:3n3)	0,2793	0,3484	0,3024	0,2268	0,1492	0,1323
Ácido Araquídico (C20:0)	0,0499	0,0412	0,0435	0,0446	0,0409	0,0428
Ácido Araquidônico AA (C20:4n6)	0,0075	0,0137	0,0131	0,0143	0,0163	0,0181
Ácido Behênico (C22:0)	0,0441	0,0356	0,0347	0,0295	0,0245	0,0221
Ácido Cáprico (C10:0)	0	0	0	0	0,0019	0
Ácido Caprílico (C8:0)	0,0089	0,0022	0,0019	0,0018	0	0
Ácido Capróico (C6:0)	0,0111	0,003	0,0027	0,0029	0	0
Ácido cis-11,14- Eicosadienóico (C20:2)	0,0063	0,0044	0,0048	0,0049	0,0042	0,0039
Ácido Cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	0,0324	0,0278	0,0259	0,0229	0,0181	0,0175
Ácido Docosahexaenóico DHA(C22:6n3)	0	0,1765	0,4532	0,862	1,4956	2,0149
Ácido Elaidico (C18:1n9t)	0,0066	0,0044	0,0041	0	0,0027	0,0029
Ácido Estearico (C18:0)	0,4384	0,3723	0,367	0,3663	0,3227	0,3403
Ácido Gama-Linolênico (C18:3n6)	0	0	0	0	0,0036	0,0047
Ácido Heneicosanóico (C21:0)	0,0029	0,0022	0,0017	0	0	0
Ácido Láurico (C12:0)	0,0031	0,0036	0,0052	0,0099	0,0134	0,017
Ácido Lignocérico (C24:0)	0,0266	0,0221	0,0235	0,0241	0,0216	0,0237
Ácido Linoleico (C18:2n6c)	4,4543	4,6495	4,2662	3,5118	2,6097	2,3093
Ácido Margárico (C17:0)	0,02	0,0198	0,0284	0,0429	0,0534	0,0671
Ácido Mirístico (C14:0)	0,0252	0,0604	0,1245	0,2377	0,3381	0,4446
Ácido Miristoleico (C14:1)	0	0,0036	0,0022	0,0019	0,0036	0,0025
Ácido Oleico (C18:1n9c)	3,1767	2,6972	2,5529	2,2961	1,8078	1,6374
Ácido Palmítico (C16:0)	1,7744	1,9011	2,5369	3,6839	4,577	5,6837
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0,0898	0,0814	0,0813	0,086	0,0842	0,0882
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0,0064	0,0171	0,0389	0,0772	0,1128	0,1409
Ácido Tricosanóico (C23:0)	0,006	0,005	0,0053	0,0051	0,0036	0,0028
Gordura Monoinsaturada	3,306	2,818	2,672	2,414	1,927	1,761
Gordura Poli-insaturada	4,747	5,196	5,044	4,63	4,294	4,504
Gorduras Insaturadas	8,053	8,014	7,716	7,044	6,22	6,265
Gorduras Saturadas	2,417	2,486	3,214	4,526	5,51	6,785
Gorduras Trans	0,007	0,004	0,004	0	0,003	0,003
n-3	0,279	0,528	0,76	1,099	1,66	2,168
n-6	4,462	4,667	4,285	3,534	2,64	2,345
n-9	3,216	2,729	2,583	2,319	1,829	1,658
n-3/n-6	0,062	0,113	0,177	0,310	0,628	0,924

APÊNDICE C.

Perfil completo de ácidos graxos das carcaças do ensaio de desempenho

Ácido graxo	0%				1%				2,5%				5%				7,5%				10%			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
% conteúdo total estrato etéreo																								
C15:1	0,058	0	0	0	0,111	0,031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:3n3	0,089	0,177	0,260	0,236	0,022	0,132	0,263	0,237	0,170	0,156	0,237	0,257	0,186	0,168	0,225	0,207	0,133	0,134	0,121	0,161	0,100	0,249	0,112	0,118
C22:2	0,050	0,077	0,093	0,063	0,000	0,058	0,063	0,046	0,039	0,046	0,058	0,059	0,044	0,043	0,042	0,046	0,021	0,023	0,026	0,035	0,024	0,061	0,025	0,022
C20:5n3	0,000	0,012	0,031	0,028	0,000	0,000	0,021	0,028	0,010	0,132	0,026	0,033	0,028	0,042	0,056	0,065	0,067	0,073	0,049	0,104	0,068	0,024	0,037	0,102
C20:3n6	0,416	1,020	1,284	1,359	0,096	0,613	1,075	1,135	0,609	0,438	0,725	0,851	0,671	0,608	0,668	0,661	0,643	0,516	0,441	0,580	0,429	0,734	0,397	0,548
C18:3n3	0,647	1,295	1,865	1,767	0,209	0,837	1,596	1,647	1,111	0,814	1,549	1,591	1,059	1,217	1,360	1,449	0,868	0,904	0,853	1,065	0,744	1,443	0,614	0,848
C20:0	0,375	0,300	0,296	0,263	0,415	0,346	0,250	0,251	0,277	0,358	0,295	0,253	0,288	0,277	0,259	0,269	0,273	0,291	0,282	0,265	0,263	0,308	0,315	0,254
C20:4n6	0,376	0,894	1,476	1,510	0,069	0,428	1,038	1,311	0,547	0,728	0,730	0,881	0,568	0,587	0,714	0,715	0,641	0,531	0,442	0,752	0,447	0,773	0,301	0,575
C22:0	0,177	0,161	0,147	0,116	0,207	0,171	0,109	0,113	0,119	0,183	0,128	0,103	0,109	0,150	0,092	0,118	0,122	0,103	0,099	0,108	0,114	0,158	0,107	0,109
C4:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C10:0	0,014	0	0	0	0	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C8:0	0,101	0,034	0	0	0,121	0,048	0	0	0,035	0	0	0	0,034	0,023	0	0	0,024	0,021	0	0	0,023	0	0	0
C6:0	0,291	0,070	0	0	0,435	0,137	0,019	0	0	0	0,026	0	0	0,026	0	0	0,020	0,022	0,023	0	0,036	0	0,055	0
C17:1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:2	0,755	1,188	1,491	1,235	0,349	1,114	1,374	1,178	0,919	0,847	1,142	1,206	1,023	0,913	1,062	1,003	0,771	0,776	0,648	0,801	0,582	1,274	0,666	0,650
C20:1n9	1,704	1,614	1,332	1,491	1,850	1,650	1,572	1,308	1,475	0,648	1,346	1,403	1,327	1,253	1,315	1,228	1,198	1,160	1,263	1,070	1,064	1,334	1,418	0,974
C22:6n3	0,056	0,240	0,716	0,663	0,040	0,388	1,343	1,656	1,378	3,530	2,558	3,295	3,732	5,278	6,722	5,975	8,706	8,729	7,120	11,839	9,138	8,617	7,068	13,873
C18:1n9	0,144	0,075	0,055	0,047	0,096	0,105	0,055	0,049	0,076	0,040	0,066	0,045	0,078	0,032	0,054	0,051	0,065	0,061	0,061	0,041	0,070	0,059	0,074	0,048
C22:1n9	0,056	0,072	0,069	0,064	0,050	0,054	0,051	0,050	0,040	0,049	0,058	0,042	0,050	0,046	0,047	0,049	0,047	0,049	0,039	0,048	0,044	0,051	0,048	0,043
C18:0	6,673	5,925	5,025	5,291	7,764	6,578	5,909	4,718	6,202	5,346	5,317	5,450	5,562	5,046	4,484	4,517	4,802	4,676	5,762	4,566	5,275	5,136	5,766	4,906
C18:3n6	0,531	1,142	1,507	1,489	0,134	0,470	0,859	1,173	0,482	0,244	0,601	0,592	0,354	0,325	0,407	0,409	0,323	0,267	0,233	0,322	0,246	0,566	0,189	0,270
C21:0	0,064	0,052	0,045	0,039	0,044	0,038	0,036	0,042	0,042	0,063	0,043	0,041	0,044	0,037	0,039	0,042	0,039	0,046	0,037	0,038	0,040	0,048	0,039	0,034