UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOFRAFIA

RAFAEL DE OLIVEIRA JAIME SALES

CULTIVO DE JUVENIS DE CAVALOS-MARINHOS *Hippocampus reidi* USANDO UMA PASTA DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* PRODUZIDA POR FLOCULAÇÃO

RECIFE/2015

RAFAEL DE OLIVEIRA JAIME SALES

CULTIVO DE JUVENIS DE CAVALOS-MARINHOS *Hippocampus reidi* USANDO UMA PASTA DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* PRODUZIDA POR FLOCULAÇÃO

Dissertação apresentada objetivando a obtenção do grau de mestre em Oceanografia à Universidade Federal de Pernambuco, na área de Oceanografia.

Orientadora: Prof. Dra. Lília Pereira de Souza Santos

RECIFE/2015

Catalogação na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

S163c Sales, Rafael de Oliveira Jaime.
Cultivo de juvenis de cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* usando uma pasta da microalga *Nannochloropsis oculata* produzida por floculação / Rafael de Oliveira Jaime Sales - Recife: O Autor, 2015.
42 folhas, il.

Orientadora: Profª. Drª. Lília Pereira de Souza Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-graduação em Oceanografia, 2015.
Inclui Referências.

1. Oceanografia. 2. Água-verde. 3. Biomassa de microalgas. 4. Alimento vivo. 5. Peixes ornamentais. I. Santos, Lília Pereira de Souza (Orientadora). II. Título.

551.46 CDD (22. ed.) UFPE/BCTG/2015-138

FOLHA DE APROVAÇÃO:

Rafael de Oliveira Jaime Sales

CULTIVO DE JUVENIS DE CAVALOS-MARINHOS *Hippocampus reidi* USANDO UMA PASTA DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* PRODUZIDA POR FLOCULAÇÃO

Dissertação apresentada objetivando a obtenção do grau de mestre em Oceanografia à Universidade Federal de Pernambuco, na área de Oceanografia.

Aprovada em: 23/04/2015

_____

Orientadora: Prof. Dra. Lília Pereira de Souza Santos

_____

Examinador 1: Ronaldo de Olivera Cavalli

_____

Examinador 2: Alfredo de Olivera Gálvez

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio, em especial aos meus pais que me deram a vida e me incentivaram a seguir meus sonhos. À minha irmã pelo carinho e companheirismo.

À minha namorada, Karol por estar sempre comigo, me ajudando nas horas mais difíceis e por fazer dos bons dias, os melhores. Pelas opiniões e (inúmeras) correções em meus trabalhos e na vida.

À minha orientadora, Lilia por ter confiado em minhas ideias e pelo suporte intelectual.

Aos amigos do LACE que me ajudaram antes, durante e comemoraram comigo o fim dos experimentos. Pelo companheirismo e alegria até mesmo nos dias de faxina no laboratório.

Aos meus novos amigos de Recife, que me levaram para o Carnaval e fizeram eu me sentir em casa nessa cidade tão especial.

Agradeço também aos professores do Departamento de Oceanografia que me cederam equipamentos para realizar algumas análises.

À Universidade Federal de Pernambuco, especificamente ao programa de Pós-graduação em Oceanografia.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto Universal 14/2013 e à CAPES pela bolsa de mestrado.

RESUMO

A produção de alimento-vivo representa grande parte dos custos de produção em empreendimentos de aquicultura, as microalgas contribuem com cerca de 30 a 40% desse custo. Uma alternativa para diminuir os custos é o uso de pastas de microalgas em substituição à produção destas na própria fazenda. Muito embora estas pastas são caras e de difícil aquisição, limitando seu uso. O presente estudo propõe uma nova metodologia para produzir a pasta da microalga *Nannochloropsis oculata*. A pasta foi produzida por floculação adicionando NaOH e o floculante FLOPAM FO4800SH, e armazenada em geladeira a +4º C por quatro semanas. Foi avaliada a capacidade da pasta em manter sua composição bioquímica (proteínas e carboidratos) e a porcentagem de células vivas, taxa de crescimento (*k*) e densidade celular máxima (DCM) da pasta recém produzida e na 4ª semana de armazenamento. Posteriormente, cultivou-se juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, recém-nascidos até 15 dias em três tratamentos adicionando a pasta da microalga produzida por floculação (PF), microalga viva (MV), e uma pasta comercial (PC). Os juvenis foram alimentados com prole do copépode *Tisbe biminiensis* e artêmia recém eclodida do 2º ao 5º dia. A partir do 6º dia foi ofertado prole de copépode e artêmia enriquecida (24h). Avaliou-se o desempenho dos cavalos-marinhos (sobrevivência, altura, comprimento total, peso seco e taxa de ingestão). A concentração de proteínas se manteve constante, já a concentração de carboidratos diminuiu na quarta semana de armazenamento. Além disso, 100% das células permaneceram vivas e se reproduzindo até a quarta semana, não havendo também diferença dos valores de *k* e de DCM entre as semanas de armazenamento. A taxa de sobrevivência, a taxa de ingestão e o peso seco não variaram de forma significativa entre os tratamentos. A altura e o comprimento total dos juvenis no tratamento PF foram iguais ao MV e maiores que o PC. A pasta floculada pode ser armazenada por pelo menos quatro semanas e utilizada como substituto à microalga viva e também apresentou eficiência semelhante à pasta comercial.

Palavras-chave: Água-verde. Biomassa de microalgas. Alimento vivo. Peixes ornamentais

ABSTRACT

The production of live food represents a great part of production costs at aquaculture farms, to cultivate the microalgae represents about 30-40% of that cost. The use of microalgae pastes is an alternative to avoid culturing the algae at the farm. Although these pastes are expensive and of difficult purchase. This study proposes a new and cheaper methodology to produce the paste of the microalgae *Nannochloropsis oculata*. The paste was produced by flocculation, adding NaOH and flocculant FLOPAM FO4800SH, stored at fridge 4 ºC for four weeks. Its shelf-life was estimated in relation to the maintenance of the biochemical composition (proteins and carbohydrates) and the percentage of live cells, growth rate (*k*) and maximum cell density (MCD) of the newly produced paste and at the 4th week of storage. Afterwards, juvenile seahorses *Hippocampus reidi*, from newborns to 15 days old, were reared in green water system. Juveniles fed offspring of copepod *Tisbe biminiensis* and newly hatched *Artemia* nauplii from the 2nd to the 5th day after release (DAR), from the 6th to the 15th DAR, copepod offspring and enriched *Artemia* metanauplii was offered. The performance of seahorses was evaluated (survival, height, length, dry weight and ingestion rate) in three treatments adding microalgae produced by flocculation (FP), live microalgae (LM), and a commercial paste (CP). The paste's protein concentration remained constant, on the other hand carbohydrate concentration decreased at the fourth week of storage. Furthermore, 100% of the cells remained viable and reproducing until the fourth week, there was no difference on the *k* and MCD values between the weeks of storage. No significant difference was found in survival, dry weight and ingestion rate between treatments. Height and length of the treatment FP were equal to LM and superior to CP. Results have shown that FP could be stored for at least four weeks. In addition, this paste could be used as a substitute for live microalgae and has shown similar performance compared to the commercial paste.

Keywords: Green-water. Algae biomass. Live food. Ornamental fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto mostrando o processo de floculação, sendo que **a** representa um cultivo de *N. oculata* não floculado e **b** um cultivo 30 minutos após a floculação. 15

Figura 2 - Sistema de recirculação de água salgada do experimento com juvenis de *H. reidi*. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam os aquários, o filtro tipo bag, filtro biológico, skimmer e o filtro UV, respectivamente. 21

Figura 3 - Aquários do experimento com juvenis de *H. reidi*. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam as lâmpadas, a torneira de entrada de água, aeração superficial, calha para saída de água com malha de 600 μm e calha com malha de 50 μm. 22

Figura 4 - Protocolo de cultivo de juvenis de *H. reidi*. 23

Figura 5 - Medições de altura (h) = distância da ponta da cauda até a coroa e comprimento total (CT) = distância da cauda até a extremidade do focinho, de cavalos-marinhos *H. reidi*, estrelas representam as marcações do início e fim das medições. 24

Figura 6 - Curva de crescimento do cultivo da microalga *N. oculata* proveniente da pasta recém produzida. Os círculos representam os valores médios de densidade celular, a linha representa a aproximação usando o modelo logístico e a seta equivale ao dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária. 27

Figura 7 - Curva de crescimento do cultivo da microalga *N. oculata* proveniente da pasta na quarta semana de estocagem. Os círculos representam os valores médios de densidade celular, a linha representa a aproximação usando o modelo logístico e a seta equivale ao dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária.ao dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária. 27

Figura 8 - Taxa de ressuspensão diária (%) do cultivo de *N. oculata* proveniente da pasta de alga recém produzida semana (quadrado) e na quarta (losango). 28

Figura 9 - Média (± desvio padrão) da sobrevivência diária dos juvenis de *H. reidi* nos 15 dias de experimento. Os tratamentos PC, PF e MV estão representados por quadrado, círculo e triângulo. 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média (± desvio padrão) dos valores de concentração de proteínas e carboidratos (%), porcentagem de células vivas (%), DCM (cel.10^7/mL) e velocidade de crescimento total (k_t) presentes na pasta da microalga *N. oculata* recém produzida e na quarta semana de armazenamento. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). 26

Tabela 2 – Média (± desvio padrão) dos valores de sobrevivência (%), altura (mm), comprimento total (mm), peso seco (mg) e taxa de ingestão (presa juvenil^{-1} h^{-1}) dos juvenis de *H. reidi* no 15º dia de experimento para os tratamentos PC, PF e MV. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). 29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
2. OBJETIVOS 12
2.1 Objetivo geral 12
2.2 Objetivos específicos 12
3. MATERIAL E MÉTODOS 13
3.1 Produção da pasta de microalgas 13
3.2 Avaliação da durabilidade da pasta 14
3.2.1 Análise bioquímica 14
3.2.2 Porcentagem de células vivas 16
3.2.3 Curva de crescimento 16
3.2.4 Taxa de ressuspensão 17
3.2.5 Parâmetros de crescimento 17
3.2.6 Estatística 18
3.3 Experimento com juvenis de *H. reidi* 18
3.3.1 Produção de alimento vivo 18
3.3.2 Obtenção e manutenção dos machos reprodutores 19
3.3.3 Cultivo de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* 20
3.3.4 Taxa de ingestão 23
3.3.5 Estatística 24
4. RESULTADOS 25
4.1 Avaliação da durabilidade da pasta 25
4.2 Experimento com juvenis de *H. reidi* 27
5. DISCUSSÃO 29
5.1 Avaliação da durabilidade da pasta 29
5.2 Experimento com juvenis de *H. reidi* 31
6. CONCLUSÕES 36
REFERÊNCIAS 37

1. INTRODUÇÃO

Em todo o litoral brasileiro há ocorrência do cavalo marinho *Hippocampus reidi* (SILVEIRA, 2011), sendo a espécie de cavalos-marinhos mais abundante. Devido às suas características biológicas, estes são os mais comercializados, tanto vivos em lojas de aquários quanto secos em mercados públicos (GASPARINI et al., 2005; KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010). A maior parte dos organismos provêm na captura da natureza (BAUM; VINCENT, 2005; VINCENT; FOSTER; KOLDEWEY, 2011). Seu habitat na zona costeira são os recifes de corais e manguezais, estando vulneráveis às ações antrópicas (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010).

Devido à sobre-exploração e a destruição dos ambientes costeiros, os estoques de cavalos-marinhos têm sofrido depleção. Isso fez com que todas as espécies de cavalos-marinhos fossem incluídas no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna), que controla o comércio das espécies listadas (CITES, 2015). Pela quantidade de organismos, espécies e países envolvidos, o comércio de cavalos-marinhos é considerado um dos maiores problemas que a CITES tem enfrentado (VINCENT et al., 2014).

Uma alternativa para diminuir a extração de cavalos-marinhos do meio ambiente é o cultivo destes em cativeiro. Apesar do ciclo reprodutivo do cavalo-marinho *H. reidi* ter sido estudado e fechado em cativeiro com sucesso por HORA e JOYEUX (2009); OLIVOTTO et al. (2008); PHAM; LIN (2013); SOUZA-SANTOS et al. (2013); WILLADINO et al. (2012), a viabilidade da produção em larga escala para fins comerciais ainda encontra obstáculos tecnológicos, sendo a fase de juvenil uma das mais críticas do cultivo (GIWOJNA, 2002).

O cultivo de peixes em sistema água-clara caracteriza-se por ser um sistema intensivo, onde se controla os parâmetros de qualidade de água. A vantagem desse método é a possibilidade de aplicar altas densidades de estocagens. Em contrapartida, apresenta alta taxas de mortalidade e de deformidades. Isso não ocorre no sistema água-verde, que induz a produção natural do fito e zooplâncton, quase não há necessidade de ofertar ração nem se controla a qualidade da água. Sua desvantagem é a variabilidade sazonal. A fim de se evitar essa variabilidade sazonal da composição fito e zooplânctonica, são selecionadas espécies de maior interesse para serem cultivadas paralelamente e adicionadas diariamente nos tanques de cultivo (PAPANDROULAKIS; DIVANACH; ANASTASIADIS, 2001; PAPANDROULAKIS; KENTOURI; MAINGOT, 2004).

Na maioria dos estudos (OLIVOTTO et al., 2008; PHAM; LIN, 2013; WILLADINO et al., 2012) os juvenis de cavalos-marinhos *H. reidi* são cultivados na presença de microalgas. A importância da adição de microalgas ao cultivo de juvenis dos cavalos-marinhos *H. reidi* foi evidenciada por MELO et al. (em preparação).

O maior problema relacionado ao cultivo em água-verde é a produção de microalgas, que representa grande parte dos custos de operação cerca de 30 a 40% dependendo do tamanho do empreendimento de aquicultura (BOROWITZKA, 1997), além de ser uma atividade laboriosa e complexa tecnicamente. Em pequenas propriedades, produzir a alga na própria fazenda é mais dispendioso (US$ 250,00 – 1000,00 por quilo) do que comprar a biomassa, na forma de pastas de microalgas, produzida em laboratórios especializados (US$ 50 – 300,00 por quilo) (BENEMANN; HWY; PIERCE, 1992; MULLER-FEUGA, 2000).

Normalmente a concentração da biomassa das microalgas é feita por centrifugação (BONALDO et al., 2005; D'SOUZA et al., 2000; PONIS et al., 2003; SEYCHELLES et al., 2009), mas esse método é caro e pode causar danos às células (UDUMAN et al., 2010). Então, floculação, considerada uma forma mais barata e menos nociva às células, seria a mais indicada para a produção da pasta (D'SOUZA et al., 2002).

SALES e ABREU (2015), visando somente concentrar a biomassa de microalgas para produção de biodiesel, desenvolveram uma metodologia para floculação do cultivo da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophycea). Esta espécie é comumente utilizada em aquicultura para cultivos de zooplâncton (BOROWITZKA, 1997; DHERT et al., 2001), devido à sua composição bioquímica e rusticidade ao cultivo em larga escala (BORGES et al., 2007; BROWN et al., 1997). SALES e ABREU (2015), entretanto, não avaliaram o uso dessa biomassa concentrada como alimento vivo em aquicultura, nem sua estocagem em forma de pasta, apesar de já existirem, no mercado internacional, pastas desta microalga que foram estudadas por (MILIONE; ZENG, 2007; NICOLAISEN; CUNY; BOLLA, 2014; ROCHA et al., 2008).

A aplicação de pastas de microalgas em empreendimentos aquícolas vai desde a produção alimento vivo como rotíferos *Brachionus plicatilis* (GUEVARA et al., 2011; LUBZENS; SUKENIK, 1995) (GUEVARA et al., 2011) e copépodes *Acartia sinjiensis* (MILIONE; ZENG, 2007). Como também na larvicultura de camarões peneídeos (BIEDENBACH; SMITH; LAWRENCE, 1990; D'SOUZA et al., 2000, 2002; MILLAMENA, 1991), no cultivo de larvas e juvenis de ostras (BONALDO et al., 2005; BROWN, 2002;

D’SOUZA et al., 2000; KNUCKEY et al., 2006; MCCAUSLAND et al., 1999; NELL; CONNOR, 1991; PONIS; ROBERT; PARISI, 2003; PONIS et al., 2008, 2003; ROBERT et al., 2001) e também na larvicultura de peixes marinhos (DAUGHERTY, 2013; JOAN HOLT; FAULK; SCHWARZ, 2007; ROCHA et al., 2008).

Não foram encontrados registros da aplicação de pastas de microalgas em cultivos de cavalos-marinhos. Assim esse estudo descreve a produção de uma nova pasta da microalga *N. oculata* por floculação e compara seu uso em substituição à microalga viva e à pasta disponível comercialmente Instant Algae® Nanno 3600 (Reed Mariculture Inc., USA).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de substituição da microalga viva e de uma pasta comercial por uma pasta de microalga produzida por floculação, aplicada no cultivo de juvenis de *Hippocampus reidi.*

2.2 Objetivos específicos

- Produzir uma pasta da microalga *Nannochloropsis oculata* por floculação;

- Determinar a durabilidade da pasta de microalgas, em termos de composição bioquímica e manutenção da viabilidade das células;

- Determinar a sobrevivência, altura, comprimento total, peso seco e taxa de ingestão de juvenis de cavalo-marinho *H. reidi*, cultivados com distintas fontes da microalga *N. oculata* (microalga viva, pasta comercial e pasta floculada).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção da pasta de microalgas

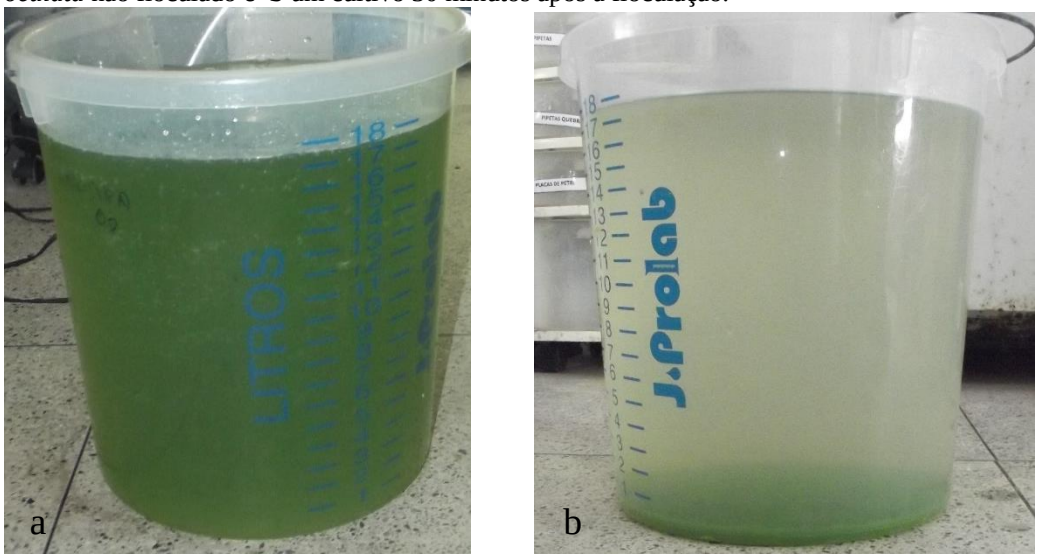
A microalga eustigmatofícea *Nannochloropsis oculata* foi cultivada em meio Conway (WALNE, 1956). A cepa foi repicada semanalmente até atingir 5 L em 28° C, salinidade 35 e fotoperíodo 12C:12E. Após uma semana crescendo em 5 L, com aeração constante, o cultivo foi transferido para um galão de 20 L e posteriormente para 60 L, sendo mantidos a 28ºC, aeração constante e, para aumentar a velocidade do crescimento, iluminação 24 horas por dia.

O crescimento do cultivo foi aferido diariamente usando-se câmara de Neubauer. Ao atingir o fim da fase logarítmica, aproximadamente após nove dias, o cultivo estava pronto para a produção da pasta. A biomassa foi concentrada por floculação, a partir de uma adaptação do método proposto por SALES E ABREU (2015), adicionando 5 mM de hidróxido de sódio (NaOH) e o floculante FLOPAM FO4800SH Floeger® (1 mg/L), variando o pH de 8,1 inicialmente para 9,8 após a floculação. Esse processo promove a agregação das células, formando flocos densos que vão decantar. Após 30 min, a biomassa se encontrava concentrada no fundo, então retirou-se a água superficial (Figura 1). A eficiência de floculação (E%) foi calculada relacionando a concentração de células na coluna d'água antes e após a floculação pela fórmula (1):

$$E\% = \frac{[(Di - Df) * 100]}{Di} \quad (1)$$

Sendo Di a densidade inicial de células do cultivo antes da floculação e Df a densidade final de células na coluna d'água, após 30 minutos de sedimentação.

Figura 1 – Foto mostrando o processo de floculação, sendo que **a** representa um cultivo de *N. oculata* não floculado e **b** um cultivo 30 minutos após a floculação.



Fonte: o autor.

A biomassa concentrada apresentava pH muito básico pela adição do NaOH, então o valor do pH foi ajustado para 8,5 adicionando HCl 2N, para diminuir a deterioração das células e para que as células unidas se dispersem (KNUCKEY et al., 2006), esse processo chama-se de-floculação. Após esse ajuste do pH, naturalmente, a biomassa foi compactada novamente, permitindo a remoção de mais água. Finalmente a pasta foi estocada em geladeira a 4 °C, no escuro.

3.2 Avaliação da durabilidade da pasta

Após a produção da pasta de microalgas é necessário avaliar se as células haviam sido danificadas com os processos de floculação e estocagem nas características bioquímicas e se as células continuavam vivas e se reproduzindo. Por isso foram medidos a concentração de proteínas e carboidratos, a velocidade de crescimento do cultivo e densidade celular máxima da pasta recém produzida (logo após a floculação) e da pasta estocada por quatro semanas.

3.2.1 Análise bioquímica

A pasta foi armazenada por quatro semanas em geladeira e avaliou-se a concentração de carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e proteínas (LOWRY et al., 1951) da pasta recém produzida e na quarta semana em relação ao peso seco (PS). O peso seco foi estimado através

da filtragem de 1 mL de pasta, lavado com formiato de amônia (0,5%), seco em estufa (60ºC por 24h) e pesado em balança de precisão.

Carboidratos:

Adicionou-se 0,3 mL da pasta de algas em tubo falcon de 20 L o volume completado para 1 mL com água destilada (aproximadamente 5 mg). Adicionou-se 2 mL de NaOH 1N em banho maria a 100 °C por uma hora. Após esfriar, os tubos foram pesados e centrifugados por 10 min a 3.000 rpm. 500 uL do sobrenadante foi retirado e inserido em um tubo de ensaio e adicionado 1 mL de NaOH 1N, 50 microlitros de fenol 80% (m/m) e posteriormente 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (em bacia com agua e gelo). A absorbância lida em espectrofotômetro a 485 nm.

A curva de calibração foi confeccionada a partir de uma solução de glicose anidra 300 µg/mL nas concentrações de 0, 15, 30, 90, 150 e 240 µg /mL, os dados foram expressos em porcentagem de carboidrato por biomassa seca.

Proteínas:

Adicionou-se 0,3 mL da pasta de algas em tubo falcon de 20 L o volume completado para 1 mL com água destilada (aproximadamente 5 mg de biomassa). Adicionou-se 2 mL de NaOH 1N em banho-maria a 100 °C por uma hora. Após esfriar, os tubos foram pesados e centrifugados por 30 min a 3.000 rpm. 1 mL do sobrenadante foi retirado e inserido em um tubo de ensaio e adicionado 5 mL do reagente C*, e 500 µL do reagente D*. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm.

* Soluções:

- Reagente C = (A:B 50:1)
  - A → Na_2CO_3 2% em NaOH a 0,1 N
  - B → $CuSO_4$ a 0,5% e tartarato de sódio potássio a 1% (1:1)
- Reagente D → Folin-ciocalteau : água destilada (1:1)

A curva de calibração foi confeccionada a partir de uma solução de albumina de soro bovino (300 µg/mL) nas concentrações de 0, 30, 90, 150, 210, 270 µg /mL, os dados foram expressos em porcentagem de proteína por biomassa seca.

3.2.2 Porcentagem de células vivas

A porcentagem de células vivas foi determinada usando o corante Azul de Evan, que cora em azul as células mortas (HEASMAN et al., 2000). A determinação de células mortas e vivas foi feita em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico em aumento de 400x, e a porcentagem de células vivas (V%) calculada pela fórmula:

$$V\% = \frac{[(Ct - Cm) * 100]}{Ct} \quad (2)$$

Sendo Ct a concentração total de células (vivas e mortas) e Cm a concentração de células mortas, coradas de azul.

3.2.3 Curva de crescimento

A partir de três alíquotas de 2 mL de pasta relativas à pasta recém produzida e à pasta armazenada por quatro semanas foram inoculadas em 500 mL de meio Conway (WALNE, 1956) e mantidas nas condições em que a pasta foi produzida, ou seja 28º C e 24 horas de luz. Diariamente foi feita a contagem do número de células em câmara de Neubauer.

Os dados de densidade de células por dia foram plotados em gráfico e a curva de crescimento foi confeccionada utilizando o software CurveExpert Professional 2.2.0. Para ajustar os valores à curva, se aplicou o modelo logístico de PINDYCK E RUBINFELD (1981), que melhor se aproxima dos dados de crescimento de cultivo de microalgas, usando a fórmula a seguir:

$$Y = \frac{a}{[1 + b * exp^{-ct}]} \quad (3)$$

Onde:

Y = densidade celular

a = primeiro parâmetros da curva logística.

b = segundo parâmetros da curva logística.

c = velocidade de crescimento.

t = duração do cultivo (dias).

3.2.4 Taxa de ressuspensão

Como a pasta foi produzida por floculação, algumas células permaneceram agregadas mesmo após a sua ressuspensão em meio de cultivo. Dessa forma, a partir do experimento anterior (item 3.2.3) foram contadas as células sozinhas e as células ainda floculadas, sendo considerada como uma célula sozinha até três células unidas, esse número foi definido para separar as células em divisão das células floculadas. A partir de quatro células, estas eram contabilizadas como um floco e contadas uma só vez. Assim, foi possível avaliar a taxa de ressuspensão (R%) por dia de cultivo a partir da fórmula:

$$\mathrm{R\%} = \frac{[(\mathrm{Ct}-\mathrm{Cf})*100]}{\mathrm{Ct}} \quad (4)$$

Sendo Ct a concentração total de células (sozinhas e floculadas) e Cf a concentração de células floculadas.

3.2.5 Parâmetros de crescimento

Para averiguar se houve mudança no desenvolvimento do cultivo entre a pasta recém produzida e na quarta semana de armazenamento, foram determinados os parâmetros de crescimento: velocidade de crescimento diária e total (k_d e k_t) e Densidade Celular Máxima (DCM).

A velocidade de crescimento (k) representa o número de divisões celulares por dia e foi calculada usando a fórmula (STEIN, 1973):

$$k = \left(\frac{3{,}322}{\mathrm{T_2} - \mathrm{T_1}}\right) * \mathrm{Log}\frac{N_2}{N_1} \quad (5)$$

Onde:

k = velocidade de crescimento.

3,233 = fator de conversão do logaritmo de base 2 para base 10.

($T_2 – T_1$) = intervalo de tempo (dias).

N_1 = densidade celular inicial.

N_2 = densidade celular final.

Log = logaritmo em base 10.

A velocidade de crescimento diária (k_d) foi calculada relacionando a densidade de células de um dia para o seguinte usando a mesma fórmula de *k*. Assim foi determinado o dia em que o cultivo atinge a fase estacionária, ou seja, k_d é aproximadamente zero.

Para o cálculo da velocidade de crescimento total (k_t) considerou-se o primeiro dia (T_1), o dia em que a taxa de ressuspensão do cultivo atingiu aproximadamente 100%, uma vez que, nos primeiros dias, a diferença no número de células foi influenciada principalmente pela desagregação dos flocos e não pela divisão celular. O último dia (T_2) foi considerado o dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária.

A DCM representa a concentração máxima de células alcançada pelo cultivo antes de atingir a fase estacionária, não importando o tempo. Esse parâmetro foi calculado usando a curva de crescimento (item 3.2.3) e o valor de k_d. A partir destes valores, determinou-se o dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária. Então os dados de densidade celular foram organizados em ordem crescente do primeiro até um dia antes ao dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária, assim foi calculada a média dos três maiores valores de densidade de células.

3.2.6 Estatística

Primeiramente os resultados de concentração de proteínas e carboidratos, porcentagem de células vivas, taxa de ressuspensão, DCM e *k* foram submetidos aos testes de Kolgomorov-Smirnov e Cochran para verificar normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Por fim, as médias dos valores das semana foram comparados usando o teste t-Student, com nível de significância de 5%.

3.3 Experimento com juvenis de *H. reidi*

3.3.1 Produção de alimento vivo

O copépode *Tisbe biminiensis* foi cultivado em volumes de 15L de acordo com o protocolo de cultivo massivo descrito por RIBEIRO e SOUZA-SANTOS (2014). A cada dois dias, o conteúdo das caixas de adultos era passado por peneiras de 63 e 250 μm de porosidade, onde eram retidos a prole e os adultos respectivamente. Os copépodes adultos eram devolvidos

para a mesma caixa, a água do cultivo era renovada e 1 g de ração para peixe era adicionado novamente. Já a prole do copépode era colocada em uma nova caixa e adicionado 1 g de ração para peixe, nesta caixa a água só era trocada depois de 5 dias, quando a prole já havia crescido e se reproduzido. Diariamente adicionava-se 1 g de ração para peixe em todas as caixas.

Um dia antes de se ofertar a prole de copépode para os juvenis de cavalo-marinho, todas as caixas foram peneiradas, os adultos devolvidos às caixas e a prole separada em um balde de 20L, com aeração fraca e alimentados com a diatomácea *Chaetoceros muelleri* cultivada em meio f/2 (GUILLARD, 1975) em temperatura de 28 °C e fotoperíodo 12C:12E. Esse enriquecimento durou 24 horas.

Foram produzidos também náuplios de *Artemia sp.* (INVE Aquaculture, USA) recém eclodidos para alimentar os juvenis de cavalo-marinho do experimento até o quinto dia de experimento. A partir do sexto dia, ofertou-se os metanáuplios de artêmia enriquecidos por 24 horas com o enriquecedor Dan's Feed (Seahorse Source®) na concentração de 0,2 g/L de água salgada para 100.000 náuplios, com aeração constante e trocas de água feitas a cada 12 horas.

Para alimentar os machos reprodutores, foram ofertadas artêmias adultas (aproximadamente 3 semanas). Estas foram cultivadas em caixas d'água com 200 L de água salgada e aeração constante no centro da caixa, o cultivo foi mantido em ambiente aberto sem controle de temperatura e fotoperíodo. Estas foram alimentadas utilizando Spirulina em pó (INVE Aquaculture, USA) intercalando com a microalga viva *Nannochloropsis oculata*.

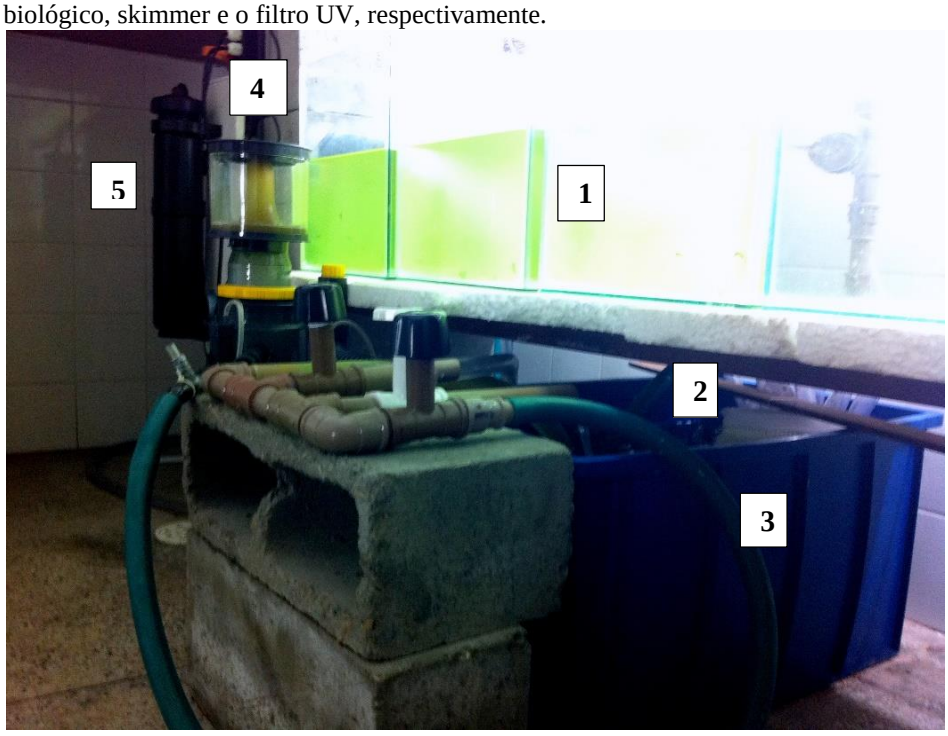
3.3.2 Obtenção e manutenção dos machos reprodutores

Os machos grávidos de *H. reidi* foram coletados no Canal de Santa Cruz, Pernambuco – Brasil (Lat 7º48'40" S; Lon 34º 53' 3.7" W), respeitando as normas da autorização SISBIO nº 43370-2. Os organismos foram trazidos para o Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia da UFPE, e mantidos em aquários de 120L conectado a um sistema de recirculação de água salgada. Esse sistema conta com filtros físicos tipo bag e cunos (25 e 5 µm), filtro biológico e filtros ultravioletas (UV). Os reprodutores eram alimentados duas vezes ao dia com artêmia adulta *ad libidum*.

3.3.3 Cultivo de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi*

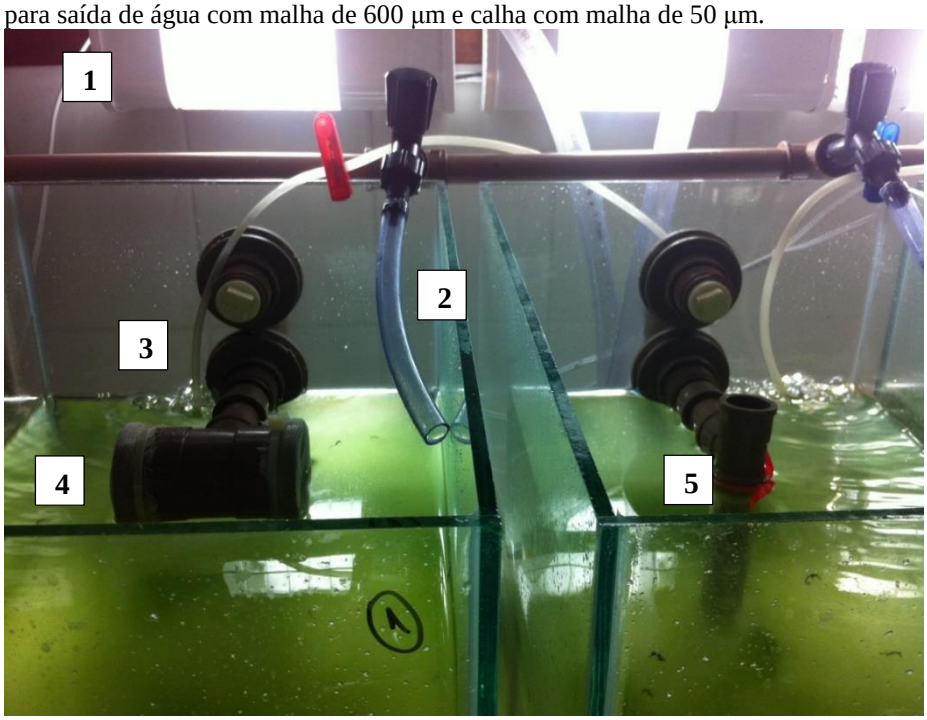
O experimento com os juvenis de *H. reidi* foi realizado em dez aquários contendo 20 litros de água salgada, conectados por um sistema de recirculação com capacidade de troca d'água de 74 litros por hora. O mesmo era equipado com filtros tipo bag e cuno (25 µm), filtro biológico, skimmer e filtro UV. Em cada aquário havia aeração fraca na borda para provocar vibração e evitar que os organismos ficassem aprisionados na superfície (WILLADINO et al., 2012). A iluminação foi feita por lâmpadas fluorescentes individuais de 20 W e fotoperíodo 12C:12E (Figura 2 e Figura 3).

Figura 2 - Sistema de recirculação de água salgada do experimento com juvenis de *H. reidi*. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam os aquários, o filtro tipo bag, filtro biológico, skimmer e o filtro UV, respectivamente.



Fonte: o autor.

Figura 3 - Aquários do experimento com juvenis de *H. reidi*. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam as lâmpadas, a torneira de entrada de água, aeração superficial, calha para saída de água com malha de 600 μm e calha com malha de 50 μm.



Fonte: o autor.

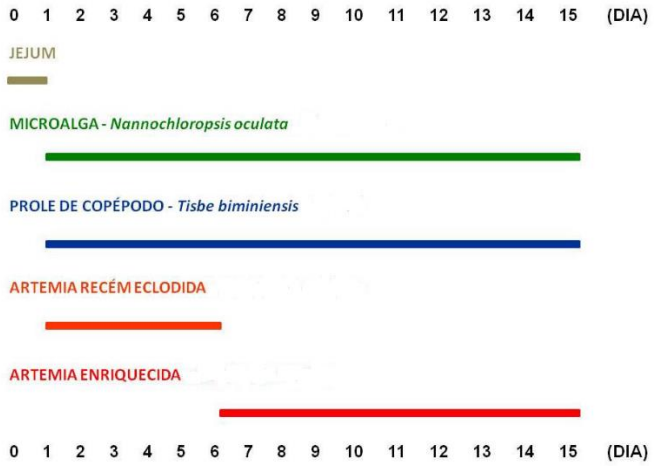
Foi comparada eficiência da nova pasta de microalgas, produzida por floculação e armazenada por quatro semanas (PF; n=4), com a pasta comercial Instant Algae® Reed Mariculture Inc. (PC; n=3), importada dos EUA, e também com a microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada paralelamente ao experimento (MV; n=3).

Logo após o nascimento, 60 cavalos-marinhos foram adicionados em cada aquário. Para se determinar a condição física dos recém nascidos, 3 amostras contendo 10 indivíduos da mesma prole foram fixadas em formol 4% e posteriormente pesados e medidos.

A alimentação seguiu o protocolo desenvolvido por MELO et al. (em preparação) e foi iniciada somente 24 horas após o nascimento (dia 1). Diariamente, artêmia e a microalga *N. oculata* eram adicionadas aos aquários. A concentração de microalgas foi estimada por contagem em microscópio usando câmara de Neubauer e mantida entre 0,3 – 1,4 x 10^6 células/mL. Foram ofertados 5,4 copépodes/mL ou 100 copépodes/cm^2 e também 3,8 náuplios de artêmia recém eclodida por mL. Como o objetivo era avaliar o efeito da microalga no cultivo, o sistema ficava desligado durante o dia e na calha para saída de água havia uma malha com porosidade 50 μm para evitar a saída do plâncton. À noite, o sistema era ligado e a malha de 50 μm era trocada por outra de 600 μm, assim eram removidas as microalgas e as artêmias, a água de cada aquário era renovada cerca de 45 vezes por noite (Figura 3). Os copépodes

permaneciam no aquário, pois apresentam hábito bentônico e a troca de água não promovia a sua remoção. Por isso, no sétimo dia, o fundo dos aquários foi sifonado para a retirada dos copépodes. Então, novamente a prole de *T. biminiensis* foi adicionada permanecendo até o fim do experimento. A partir do sexto dia foi ofertado Artêmia enriquecida 24h na mesma concentração (3,8 ind/mL) em substituição à Artêmia recém eclodida (Figura 4).

Figura 4 - Protocolo de cultivo de juvenis de *H. reidi*.



Fonte: MELO et al. (em preparação).

Foi estabelecido fotoperíodo de 12C:12E. A temperatura da sala controlada em 28°C. A temperatura da água, oxigénio dissolvido (OD), pH e salinidade foram medidos a cada três dias e apresentaram valores médios (± desvio padrão) de 26,0°C (± 0,9), 6,9 mg/L (± 0,8), 8,0 (± 0,07) e 35,6 (± 0,7), respectivamente. As concentrações de amônia total e nitrito foram medidas duas vezes por semana utilizando kits comerciais Labcon®, Alcon, Brasil. Os valores de NH_4^+ e NO^{2-} se mantiveram abaixo de 0,25 mg/L e 0,5 mg/L.

Diariamente os cavalos-marinhos mortos eram retirados e contabilizados, assim foi possível determinar a sobrevivência total ao longo dos 15 dias. Ao fim dos 15 dias de experimento, todos os organismos foram sacrificados após serem anestesiados usando 100 mg/L de óleo de cravo (AQUI-S®, Chile). Estes organismos foram medidos e posteriormente secados em estufa (60°C por 24h) para que se determinasse o peso seco (PS). As medições dos tamanhos de cada indivíduo foram feitas em uma lupa ZEISS AxioCam ERc5s, acoplada a um computador com o processador de imagens ZEN, onde foi possível traçar a altura (h) e o comprimento total (CT) (LOURIE; VINCENT; HALL, 1999).

Figura 5 - Medições de altura (h) = distância da ponta da cauda até a coroa e comprimento total (CT) = distância da cauda até a extremidade do focinho, de cavalos-marinhos *H. reidi*, estrelas representam as marcações do início e fim das medições.

Fonte: o autor.

3.3.4 Taxa de ingestão

A taxa de ingestão no 15º dia foi estimada para avaliar se o tipo de microalga no cultivo afetou o comportamento de caça dos juvenis de *H. reidi*. A metodologia foi adaptada de SOUZA-SANTOS et al. (2013) adicionando prole de copépode e *Artemia* enriquecida 24h, na proporção 0,3:0,7 apresentando densidade final de 7 itens por mL (70 itens por cm^2). Manteve-se a salinidade 35 e temperatura 27 - 28ºC. A superfície da água foi levemente aerada e a contou com iluminação natural lateralmente ao beaker. O design experimental consistiu em nove grupos com 7 cavalos-marinhos, três réplicas para cada tratamento, e mais três como controle (sem cavalos-marinhos, só o alimento). As concentrações finais de alimento foram estimadas amostrando, três vezes, 10 mL de cada beaker. A taxa de ingestão (TI) foi calculada a partir da fórmula:

$$TI = \frac{(Ccontrole - Cteste)x\ volume\ de\ água\ (mL)}{(número\ de\ juvenis\ x\ tempo\ de\ exposição\ (h)} \quad (6)$$

Sendo, Ccontrole e Cteste representam as concentrações iniciais e finais de itens no beaker.

3.3.5 Estatística

Os valores de sobrevivência final, altura, comprimento total, peso seco e taxa de ingestão foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, usando os testes de Kolgomorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Por fim as médias foram comparadas usando ANOVA e quando havia diferença significativa foi aplicado o teste post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). Para tornar os resultados de taxa de sobrevivência mais homogêneos, estes foram submetidos à transformação arco seno da raiz quadrada antes de aplicar ANOVA.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da durabilidade da pasta

A pasta da microalga *Nannochloropsis oculata* produzida por floculação usando NaOH e o floculante FLOPAM apresentou eficiência de floculação média de 97,0% (± 2,0). Inicialmente a biomassa estava diluída em 20 L de meio de cultivo e ao fim do processo foi reduzida para 200 mL, ou seja, concentração de 100x, resultando em peso seco de 18 g/L.

Comparando as características bioquímicas da pasta, não houve diferença significativa entre as semanas ($p > 0,05$) (Tabela 1) para a concentração de proteínas. No entanto, esta apresentou decréscimo na concentração de carboidrato na quarta semana de estocagem ($p < 0,05$) (Tabela 1). Em ambas as semanas analisadas, obteve-se 100% de células vivas ($p > 0,05$), (Tabela 1).

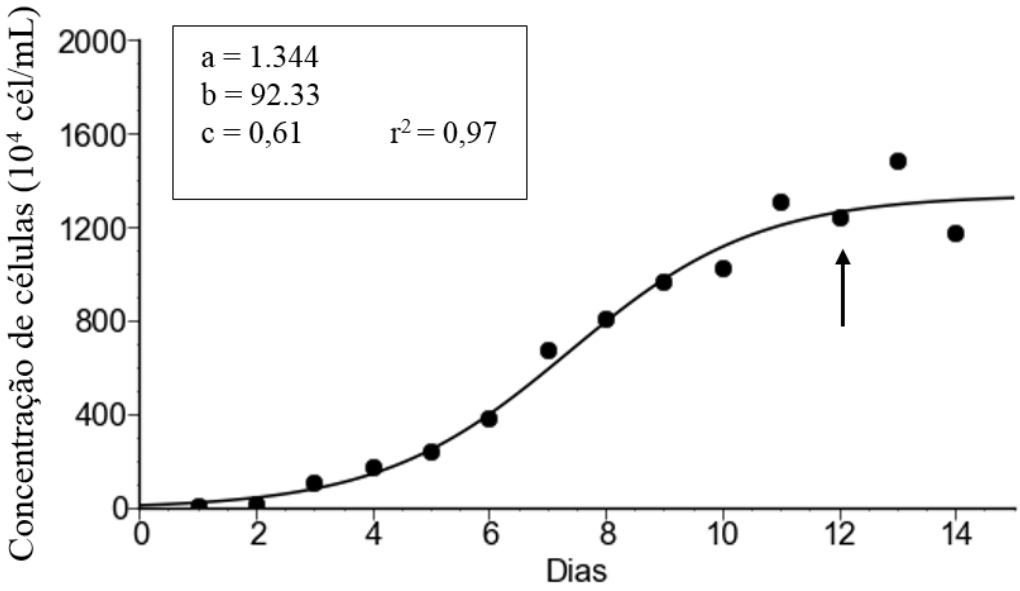
Tabela 1- Média (± desvio padrão) dos valores de concentração de proteínas e carboidratos (%), porcentagem de células vivas (%), DCM (cel.10^7/mL) e velocidade de crescimento total (k_t) presentes na pasta da microalga *N. oculata* recém produzida e na quarta semana de armazenamento. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

	Proteínas	Carboidratos	% vivas	DCM	k_t
Após a floculação	38,18 [a] (± 17,0)	21,19% [a] (± 2,0)	100,0 [a]	1,338[a] (± 0,151)	0,367 [a] (± 0,034)
4ª semana	48,00 [a] (± 12,0)	13,50% [b] (± 2,0)	100,0 [a]	1,358 [a] (± 0,202)	0,447 [a] (± 0,052)

Fonte: o autor.

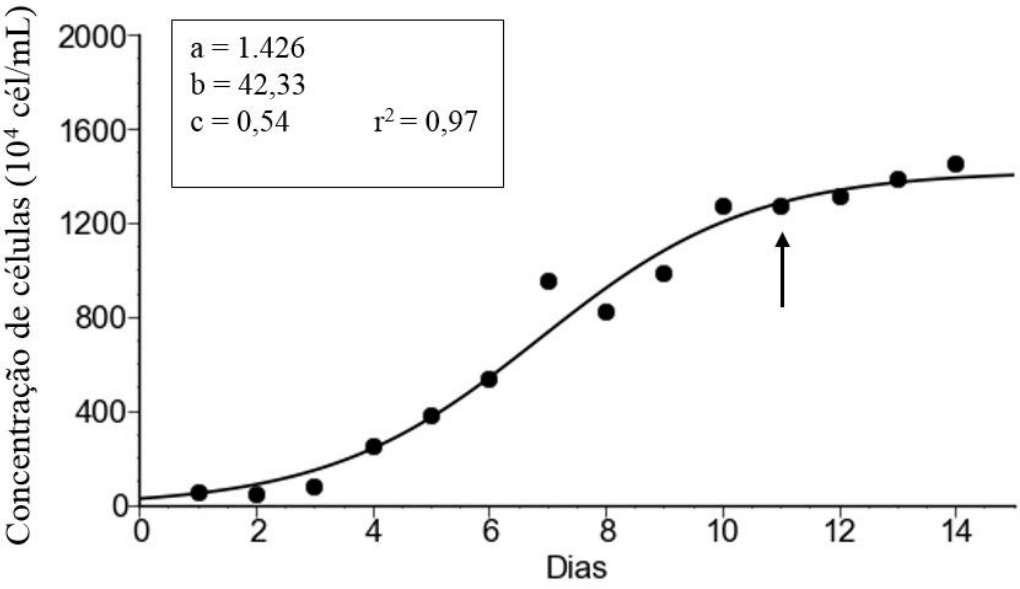
Para calcular a densidade celular máxima foi preciso confeccionar as curvas de crescimento para a pasta recém produzida e na quarta semana e também calcular a taxa de crescimento diário (k_d). O coeficiente de determinação (r^2) foi acima de 0,95, indicando boa correlação entre os dados reais e o modelo. O k_d, do cultivo da pasta recém produzida, atingiu o menor valor médio de -0,08 (± 0,11) no 12º dia. Para a quarta semana de armazenamento, no 11º dia a velocidade de crescimento diária atingiu o menor valor médio 0,03 (± 0,4). Juntamente com as curvas de crescimento Figura 6 e Figura 7 pôde ser observado que os cultivos atingiram a fase estacionária no 12º e 11º dia, para a pasta recém produzida e para a quarta semana. Os valores de máxima densidade de células não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as semanas (Tabela 1).

Figura 6 - Curva de crescimento do cultivo da microalga *N. oculata* proveniente da pasta recém produzida. Os círculos representam os valores médios de densidade celular, a linha representa a aproximação usando o modelo logístico e a seta equivale ao dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária.



Fonte: o autor.

Figura 7 - Curva de crescimento do cultivo da microalga *N. oculata* proveniente da pasta na quarta semana de estocagem. Os círculos representam os valores médios de densidade celular, a linha representa a aproximação usando o modelo logístico e a seta equivale ao dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária.ao dia em que o cultivo atingiu a fase estacionária.



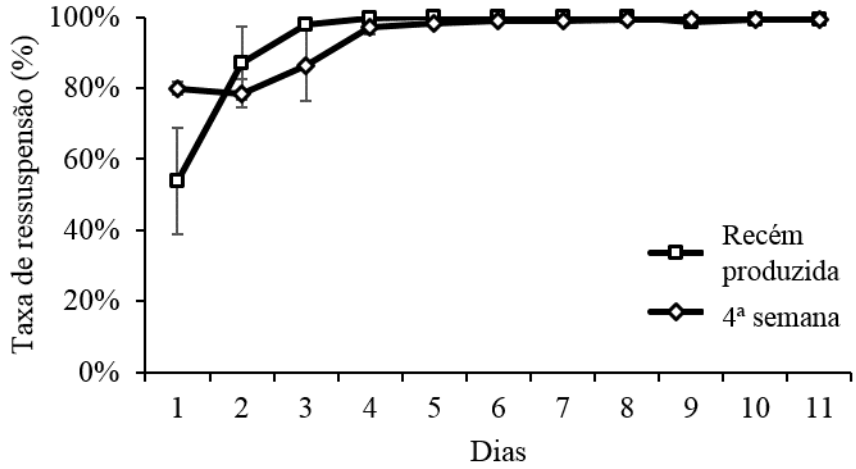
Fonte: o autor.

Ao ressuspender a pasta em meio de cultivo, parte das células permaneceram agregadas. Tanto na pasta recém produzida quanto na quarta semana de armazenamento a taxa de

ressuspensão foi significativamente menor nos dois primeiros dias (recém produzida 54,0 e 87,0%, 4ª semana 80,0 e 79,0%). Além disso, taxa de ressuspensão no primeiro dia de cultivo referente à pasta recém produzida foi significativamente menor que no primeiro dia da 4ª semana ($p < 0,05$). A partir do terceiro dia o cultivo apresentou taxas de 98,0 e 86,0% para a pasta recém produzida e para a 4ª semana, não sendo diferentes entre si e também em relação aos outros dias do cultivo ($p > 0,05$) (Figura 8).

Após ter sido determinado o dia em que os cultivos atingiram a fase estacionária, foi calculada a velocidade de crescimento, adotando-se como T_1 o terceiro dia de cultivo, e como T_2 o 12º e o 11º dia para a pasta recém produzida e quarta semana, respectivamente. Não houve diferença significativa na velocidade de crescimento do cultivo entre as semanas ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Figura 8 - Taxa de ressuspensão diária (%) do cultivo de *N. oculata* proveniente da pasta de alga recém produzida semana (quadrado) e na quarta (losango).

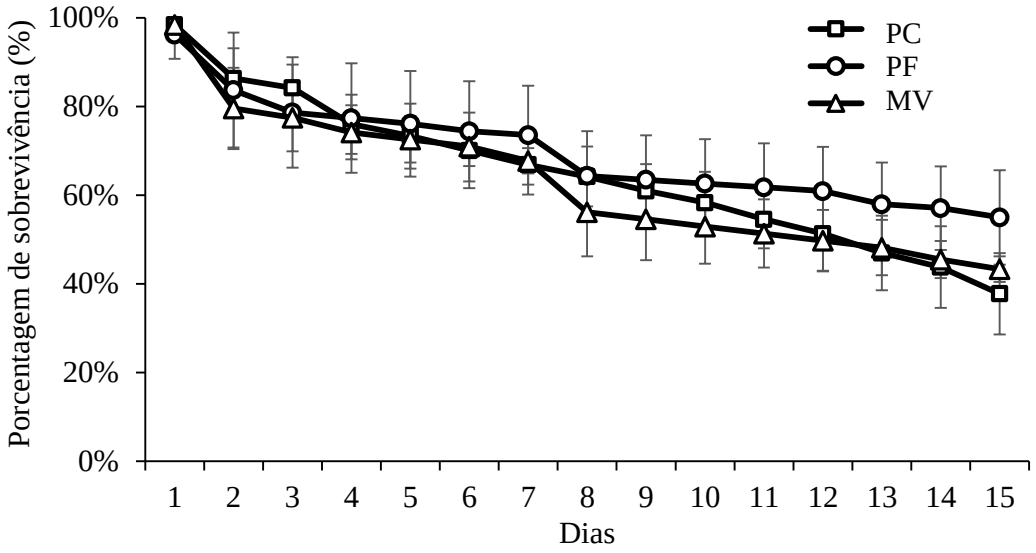


Fonte: o autor.

4.2 Experimento com juvenis de *H. reidi*

A sobrevivência diária não apresentou picos de maior mortalidade (Figura 9). Os valores de sobrevivência final dos juvenis de *H. reidi* não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Figura 9 - Média (± desvio padrão) da sobrevivência diária dos juvenis de *H. reidi* nos 15 dias de experimento. Os tratamentos PC, PF e MV estão representados por quadrado, círculo e triângulo.



Fonte: o autor.

A média dos valores de altura e comprimento total apresentaram-se significativamente iguais nos tratamentos PF e MV e maiores que o tratamento PC (Tabela 2). Por outro lado, os valores de peso seco e taxa de ingestão não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os três tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Média (± desvio padrão) dos valores de sobrevivência (%), altura (mm), comprimento total (mm), peso seco (mg) e taxa de ingestão (presa juvenil^{-1} h^{-1}) dos juvenis de *H. reidi* no 15º dia de experimento para os tratamentos PC, PF e MV. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

	Sobrevivência	Altura	Comprimento total	Peso seco	Taxa de ingestão
PC	37,78 [a] (± 7,0)	17,98 [b] (± 0,92)	20,14 [b] (± 1,17)	6,23 [a] (± 1,61)	68,41 [a] (± 0,99)
PF	55,00 [a] (± 11,00)	19,99 [a] (± 0,55)	22,56 [a] (± 0,6)	8,09 [a] (± 0,65)	65,24 [a] (± 4,27)
MV	43,33 [a] (± 2,00)	19,85 [a] (± 0,86)	22,36 [a] (± 0,85)	8,03 [a] (± 1,36)	66,19 [a] (± 3,99)

Fonte: o autor.

5. DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da durabilidade da pasta

A fabricação de uma pasta da microalga *Nannochloropsis oculata* por floculação é um processo inédito. Além disso, a floculação utilizando hidróxido de sódio é um método barato e não tóxico (SHEN; CUI; YUAN, 2013; SCHLESINGER et al., 2012). Resíduos tóxicos deixados na biomassa ao flocular um cultivo com substâncias como sulfato de alumínio e cloreto de ferro inviabilizam sua utilização como alimento para animais e humanos (SCHLESINGER et al., 2012). SALES e ABREU (2015) atingiram eficiência de floculação de 70%, adicionando 1 mM de NaOH e 5 mg/L do polímero catiônico FLOPAM FO 4800SH. A concentração de floculantes deste último estudo foi adaptada para produzir a pasta de algas. No presente estudo usou-se menor quantidade de FLOPAM (1 mg/L), mesmo assim a eficiência de floculação (97%) foi maior que a obtida por SALES e ABREU (2015).

Na fabricação da pasta foram utilizados equipamentos simples que podem ser facilmente encontrados. Esse método poderia ser utilizado para produzir a biomassa de algas em períodos de entressafra, quando há menos trabalho, estocar a pasta e usá-la posteriormente. A concentração, em peso seco, da pasta foi de 18 g/L, inferior às comerciais como por exemplo a Instant Algae® Nanno 3600 que, de acordo com os fabricantes, apresenta 180 g/L. A fim de se obter uma pasta mais compacta, centrifugar a biomassa pré-concentrada por floculação seria uma alternativa para tornar a pasta equivalente às disponíveis comercialmente.

A capacidade de manutenção das características nutricionais foi apontada como a principal exigência dos aquicultores na escolha da pasta de microalgas (BOROWITZKA, 1997). A pasta produzida manteve constante sua concentração de proteína nas quatro semanas analisadas (Tabela 1). A concentração média de proteína 38 a 48% é próxima à especificada na pasta PC, cerca de 58%. Por outro lado, a concentração de carboidratos apresentou diferente comportamento com relação ao tempo de estocagem, uma vez que na quarta semana sua concentração diminuiu de 21 para 13%. Isso pode ser explicado pelo processo de respiração celular, que tem como consequência o gasto de energia. Como a pasta foi armazenada no escuro, as microalgas não eram capazes de realizar a fotossíntese, por isso parte dos carboidratos podem ter sido metabolizados. O consumo de carboidratos já foi observado em uma pasta de *Tetraselmis suecica* (MONTAINI et al., 1995) e também para outras diatomáceas e haptofitas

(BROWN, 2002). A pasta PC apresenta 20% de carboidratos em sua composição semelhante à pasta em estudo com uma semana de estocagem.

A composição bioquímica das microalgas pode variar de acordo com a fase do cultivo. No fim da fase exponencial, utilizada neste estudo, microalgas eustigmatofíceas contêm cerca de 15 a 35% de proteína e 5 a 10% de carboidratos em cultivos (BROWN et al., 1997). No presente estudo, foram encontradas maiores concentrações destes elementos na pasta PF.

Outro parâmetro importante de uma pasta de algas, avaliado por aquicultores australianos, se trata da viabilidade das microalgas da pasta (BOROWITZKA, 1997). No presente estudo a viabilidade celular foi máxima (100%). Resultado semelhante foi obtido por HEASMAN et al. (2000) em uma pasta de *N. oculata* produzida por super-centrifugação e desnatadeira, 100 e 99% respectivamente. A característica da parede celular de cada espécie de microalga é o principal fator que influencia a capacidade da pasta de resistir ao processo de concentração do cultivo e ao seu armazenamento. Pastas de espécies com parede celulares mais sensíveis como microalgas haptofitas *Pavlova lutheri* e *Isochrysis sp.* apresentaram menores taxas de viabilidade celular (HEASMAN et al., 2000).

A forma de armazenamento também interfere na viabilidade das células. As maiores taxas de viabilidade da pasta de *Isochrysis galbana* foram por resfriamento em geladeira. O congelamento ou liofilização da biomassa promoveram decréscimo considerável na concentração de células vivas logo após os primeiros dias de armazenamento (GRIMA et al., 1994).

Além de se determinar a viabilidade das células da pasta, é interessante saber se elas continuam a se reproduzir, e assim poderiam ser usadas como inóculo. Ao reinocular a pasta em meio de cultivo elas continuaram a se reproduzir e atingiram densidade celular máxima (DCM) de 1,3 x 10^7 células/mL. GALVÃO; YAMANAKA; TANJI (1996) conseguiram estocar uma pasta de *N. oculata* por até 15 meses a 8ºC e -5ºC, ao ser novamente reinoculada manteve-se o padrão de crescimento do cultivo. WAHIDIN et al. (2013), trabalhando com inóculos não concentrados, obtiveram densidades mais elevadas (DCM = 1,3 a 6,5 x 10^7 células/mL) em cultivos de *Nannochloropsis sp.* submetidos a intensidades luminosas de 5 a 200 µmol m^{-2} s^{-1} e fotoperíodos de 12C:12E, 16C:8E e 24C:0E. Já ROSELET et al. (2013), em cultivos em batelada de *N. oculata*, conseguiu atingir densidades máximas de 1,52 a 3,44 x 10^7 cel/mL, somente após quarenta dias de cultivo. Essa variação da DCM pode ser explicada pela diferença nos parâmetros (temperatura e fotoperíodo) e no tipo de inóculo entre o presente estudo e os citados anteriormente.

A velocidade de crescimento total (k_t), outro parâmetro para avaliar o desenvolvimento do cultivo, apresentou valores (0,37 e 0,45) similares aos encontrados por WAHIDIN et al. (2013), que variaram de 0,26 a 0,34. No entanto, o experimento de avaliação do crescimento da pasta apresenta características muito específicas, que dificultam a comparação com outros estudos. Nos dois primeiros dias após a inoculação da pasta a velocidade de crescimento era influenciada tanto pela divisão celular quanto pela desagregação das células do floco. Por isso foi estabelecido que o dia (T_1) de início da contagem do k_t, não seria no primeiro dia de cultivo, e sim no dia em que a velocidade de crescimento não fosse afetada pela taxa de ressuspensão das células (R%). Caso esse ajuste não tivesse sido feito a velocidade de crescimento do cultivo seria superestimada.

O destino da pasta é a alimentação de organismos filtradores, como artêmias e copépodes, cuja capacidade de captura do alimento é limitada a um tamanho máximo das partículas (HANSEN; BJØRNSEN; HANSEN, 1994). Por isso, após a floculação, é necessário que as células sejam desagregadas para que apresentem tamanho compatível ao aparato bucal dos organismos zooplânctonicos. Caso elas permaneçam agregadas não vão ser ingeridas. Por isso foi calculada a taxa de ressuspensão da pasta.

A taxa de ressuspensão depende da espécie de microalga. PONIS et al. (2003) obtiveram taxa de de-floculação ineficiente para a haptófita *Pavlova lutheri*, por outro lado, KNUCKEY et al. (2006) conseguiram facilmente ressuspender uma pasta da diatomácea *Chaetoceros calcitrans forma pumilum*. No presente estudo a ressuspensão das células foi feita apenas adicionando meio de cultivo e agitando o mesmo. Quando a simples adição de meio de cultivo e agitação não são suficientes para promover a dispersão das células da pasta, podem ser utilizados solventes como os ácidos cítrico, tartárico, acético entre outros que atuam diretamente no floculante, diminuindo a ligação entre as células promovendo a ressuspensão destas (HEASMAN et al., 2000). Estes autores obtiveram bons resultados usando ácido tartárico e ácido cítrico. Por outro lado esses aditivos podem alterar a viabilidade da biomassa.

5.2 Experimento com juvenis de *H. reidi*

Os primeiros experimentos mostraram ser possível produzir uma pasta de microalgas por floculação e estocá-la por pelo menos quatro semanas. Ainda era necessário saber se esta pasta poderia ser usada para substituir a microalga viva, cultivada juntamente ao organismo alvo e se apresentaria a mesma eficiência que a pasta comercial Intant Algae® Nanno 3600.

Dessa forma cultivou-se juvenis de cavalo-marinho *H. reidi* em sistema água-verde aplicando-se a microalga *N. oculata* na forma viva e em pastas.

Uma das fases mais críticas do cultivo é até os 15 dias (MELO et al., em preparação), provavelmente devido à falta de um alimento que supra todas as necessidades nutricionais dos organismos e que seja atrativo. Já que o uso de alimentos inertes ou congelados para recém-nascidos de cavalos-marinhos não apresentou bons resultados (WOODS, 2003).

No meio ambiente, os cavalos-marinhos têm hábito alimentar generalista, se alimentando de pequenos crustáceos e nematódeos quando pequenos (COSTA CASTRO et al., 2008). Em cativeiro foi observado que os juvenis de *H. reidi* são altamente seletivos, preferindo, ao nascer, náuplios de copépodes e rotíferos (SOUZA-SANTOS et al., 2013). Estes organismos zooplânctonicos se alimentam normalmente de microalgas. Os náuplios de artêmias são mais ingeridos posteriormente pelos juvenis de *H. reidi.* Esse alimento deve ser enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), devido ao seu baixo valor nutricional (OLIVOTTO; HOLT; CALADO, 2011). As microalgas são organismos ricos em PUFA, então uma forma de melhorar a composição bioquímica das artêmias é o enriquecimento usando microalgas (PALMTAG; FALUK; HOLT, 2006; VISMARA et al., 2003).

Copépodes harpacticóides, inclusive *T. biminiensis* são capazes de produzir ácidos graxos essenciais como EPA e DHA, mas também devem ser enriquecidos através de uma dieta rica (LIMA; NAVARRO; SOUZA-SANTOS, 2013). Além disso, dada à peculiaridade do protocolo de cultivo do presente estudo, no qual os copépodes são adicionados e retirados somente no 6º dia, eles necessitam de alimento dentro do aquário. Dessa forma, a presença da microalga é essencial para alimentar os copépodes e artêmias usados no cultivo de juvenis de cavalos-marinhos (MELO et al., em preparação).

As microalgas proporcionam também ação antibacteriana, tanto na formação da flora intestinal, quanto na própria água do cultivo (RINGØ et al., 2014). AUSTIN e DAY (1990) observaram a diminuição do crescimento de patógenos *Vibrio spp.* e de doenças bacterianas, em cultivos de camarões peneídeos alimentados com biomassa seca de *Tetraselmis suecica*. A diminuição do número de bactérias oportunistas, que poderiam causar doenças, foi notada em cultivos de *N. oculata* quando o número total de bactérias aumentava, essa seleção de certos tipos de bactérias se deve à maior competição entre os microrganismos (SALVESEN; REITAN; SKJERMO, 2000).

Usando artêmia enriquecida (24h) e prole de copépode *T. biminiensis* e a microalga *N. oculata* desde o nascimento, WILLADINO et al., (2012) obtiveram aproximadamente 40% de

sobrevivência até o 14º dia de cultivo de *H. reidi.* MELO et al. (em preparação) adaptaram o protocolo anterior utilizando náuplios de artêmia recém eclodidos e prole de copépode a partir do segundo dia de vida dos cavalos-marinhos e obtiveram melhores valores de sobrevivência até o 15º dia de cultivo. Comparou-se também neste último estudo, o cultivo em sistema água verde (com microalga) e água clara (sem microalga), obtendo-se maior taxa de sobrevivência em água verde (76,4%) que em água clara (25%), demonstrando a importância das microalgas em cultivos de juvenis de *H. reidi*.

O presente estudo utilizou o protocolo desenvolvido por MELO et al (em preparação). Comparando os resultados aqui obtidos com os deste estudo pode-se verificar que as taxas de sobrevivência obtidas aqui foram inferiores (38 a 55%) até o 15º dia. Já o peso seco obtido por estes autores (5,92 mg) foi menor que os obtidos neste estudo (cerca de 8 mg).

Por outro lado, HORA e JOYEUX (2009), sem utilizar microalga, obtiveram taxa de sobrevivência superiores ao presente estudo, aproximadamente 95% até o 15º dia. Os juvenis foram alimentados com plâncton natural, que são naturalmente enriquecidos, dispensando o uso das microalgas. Muito embora a sobrevivência tenha sido alta, altura obtida por esses autores por volta dos 15 dias (~ 19 mm) de cultivo foi similar à obtida no presente estudo (Tabela 2). A desvantagem do uso de zooplâncton natural é que a abundância e sua composição desse zooplâncton pode variar entre as estações do ano.

Outro papel das microalgas nos aquários pode ser o de sombreamento, relevante na larvicultura de peixes (NAAS; NAESS; HARBOE, 1992). Também foi observado que quando as artêmias eram adicionadas aos aquários sem a microalga, elas se concentravam na borda próximo à luz, por apresentarem ao fototropismo positivo. Com a adição das microalgas as artêmias se dispersavam, o que provavelmente facilitava a sua captura pelos cavalos-marinhos. No entanto, isso não foi confirmado por MELO et al. (em preparação), que não encontrou diferença significativa na taxa de ingestão de *H. reidi* recém nascidos cultivados em sistema água-verde.

PHAM & LIN (2013) obtiveram sobrevivência máxima de 84,3% sendo os juvenis de *H. reidi* alimentados com rotífero *Brachionus plicatilis* e metanáuplios de artêmia enriquecidos (24h) com Dan's Feed, em aquários com a microalga *Isochrysis galbana.* Destacando a importância do uso de zooplâncton enriquecido e também da alga para alimentá-lo no aquário. A altura obtida no presente estudo (Tabela 2) foi similar à encontrada por estes autores (12 a 22 mm).

OLIVOTTO et al. (2008) cultivou juvenis de *H. reidi* aplicando fotoperíodo 24h claro, ofertando rotífero *Brachionus plicatilis* e náuplio de *Tisbe spp*. do 1º ao 6º dia, copepoditos e adultos de *Tisbe spp.* e metanáuplios de *Artemia* do 7º ao 21º dia. Evidenciando a importância do uso de copépodes no início do cultivo. Além disso, o fotoperíodo 24h claro aumentou o crescimento (altura de 12 a 20 mm), valor similar ao presente estudo (Tabela 2). Os juvenis de *H. reidi* apresentaram sobrevivência máxima de aproximadamente 40%, inferior aos tratamentos PF e MV (Tabela 2).

Na literatura foram encontrados registros quanto à capacidade de caça de juvenis de *H. reidi* apenas até o 10º dia após o nascimento. SOUZA-SANTOS et al., (2013) no 5º dia de cultivo, usando o mesmo tipo de alimento ofertado, artêmia enriquecida 24h e prole de copépode, obtiveram, taxas de ingestão de aproximadamente 20 itens juvenil^{-1} hora^{-1}. As taxas obtidas no presente estudo são maiores que a destes autores uma vez que no 5º dia os organismos eram menores (altura média = 8.45 mm) em relação ao presente estudo (Tabela 2). A taxa de ingestão no primeiro dia de cultivo é de 10 a 20 itens juvenil^{-1} hora^{-1} (MELO et al., em preparação), consideravelmente menor que após os 15 dias. Como os tratamentos PF, PC e MV não apresentaram diferença significativa da taxa de ingestão, pode-se afirmar que os organismos estavam igualmente saudáveis.

Os resultados de sobrevivência e crescimento (altura, comprimento total e peso seco) do presente estudo, contribuem para confirmar a hipótese de que a PF pode ser usada como um substituto tanto para a microalga viva quanto para a pasta comercial Instant Algae® Nanno 3600. Apesar da taxa de sobrevivência ser menor que as obtidas por HORA e JOYEUX (2009); PHAM e LIN (2013) e MELO et al. (em preparação), os valores de altura foram similares aos obtidos por OLIVOTTO et al. (2008), HORA e JOYEUX (2009) e PHAM e LIN (2013) e maiores que aqueles de WILLADINO et al. (2012) (12 a 15 mm).

Esse resultado já era esperado, uma vez que a composição bioquímica em proteínas e carboidratos da pasta floculada (PF) é similar aos outros tratamentos. Além do mais, suas células continuam viáveis e se reproduzem, características exclusivas das microalgas não concentradas. A pasta Instant Algae® Nanno 3600 apresenta células intactas, mas não vivas e não se reproduzem. Dessa forma, elas não vão exercer outras funções das microalgas nos cultivos, como a manutenção da qualidade da água, ao consumir os compostos nitrogenados e produzir oxigênio.

A possibilidade de substituição da microalga viva pela pasta representa um avanço para o cultivo de juvenis de cavalos-marinhos *H. reidi*, e também de qualquer peixe que necessite

de zooplâncton. A aplicação desta pasta pode diminuir o trabalho de produzir a biomassa de algas, além de garantir a segurança da cadeia produtiva e reduzir os gastos, uma vez que o método de produção da pasta requer produtos de baixo custo.

6. CONCLUSÕES

Foi possível produzir uma pasta da microalga *Nannochloropsis oculata* por floculação, utilizando uma metodologia simples.

Sua composição bioquímica (proteínas e carboidratos) se manteve estável por até quatro semanas. Além disso, as células continuaram vivas e se reproduzindo de forma semelhante, podendo ser utilizada como inóculo para novos cultivos.

Os juvenis de *H. reidi* cultivados em sistema água-verde, utilizando a microalga viva e a pasta floculada apresentaram os parâmetros de crescimento (altura e comprimento total) iguais entre si e maiores que a pasta comercial. A sobrevivência, o peso seco e a taxa de ingestão foram semelhantes entre as diferentes fontes de microalga. Sendo assim, concluiu-se que a pasta floculada pode ser usada para substituir a microalga viva e também a pasta comercial.

Apesar de ter sido possível produzir a pasta de microalgas por floculação, alguns ajustes são necessários para tornar o produto competitivo, como:

- Avaliar o efeito da estocagem desta pasta por longo tempo, usando ou não aditivos para aumentar sua durabilidade.

- Deve ser aprimorada a forma de aplicação da pasta, visando aumentar a taxa de ressuspensão das células, usando solventes para promover a desagregação dos flocos.

- Avaliar o papel de bactérias na pasta, podendo estas estarem atuando positivamente, como probiótico ou fonte extra de proteínas, mas também negativamente promovendo a degradação das células ou propagação de doenças.

- Também deve se testar o aumento do grau de compactação da pasta, por centrifugação, e avaliar os efeitos no tempo de estocagem e na viabilidade das células.

REFERÊNCIAS

AUSTIN, B.; DAY, J. G. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio spp*. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. **Aquaculture**, v. 90, p. 389–392, 1990.

BAUM, J. K.; VINCENT, A. C. J. Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America. **Environmental Conservation**, v. 32, p. 1–15, 2005.

BENEMANN, J. R.; HWY, O. D.; PIERCE, F. Microalgae aquaculture feeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 233–245, 1992.

BIEDENBACH, J. M.; SMITH, L. L.; LAWRENCE, A. L. Use of a New Spray-Dried Algal Product in Penaeid Larviculture. v. 86, p. 249–257, 1990.

BONALDO, A. et al. Use of centrifuged and preserved microalgae for feeding juvenile Manila clam (*Tapes philippinarum*): effects on growth and fatty acid composition. **Italian Journal of Animal Science**, v. 4, p. 375–384, 2005.

BORGES, L. et al. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um "mecanismo de desenvolvimento limpo". **Atlântica, Rio Grande**, v. 29, n. 1, p. 35–46, 2007.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae for aquaculture : Opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 393–401, 1997.

BROWN, M. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 207, p. 289–309, 2002.

BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, n. 1-4, p. 315–331, 1997.

CITES. **Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna. Appendices I, II and III**. Disponível em: <www.cites.org>. Acesso em: 13 mar. 2015.

COSTA CASTRO, A. L. et al. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) as a study-case. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 4, p. 637–644, 2008.

D'SOUZA, F. M. L. et al. Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Penaeus monodon* Fabricius larvae. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 661–670, 2000.

D'SOUZA, F. M. L. et al. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 113–120, 2002.

DAUGHERTY, Z. N. **Effects of Algae Paste Substitutes on the Larval Rearing Performance and Microbial Communities in the Culture of Cobia (*Rachycentron canadum*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*)**. [s.l.] University of Miami, 2013.

DHERT, P. et al. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. **Aquaculture**, v. 200, n. 1-2, p. 129–146, 2001.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

GALVÃO, M. S. N.; YAMANAKA, N.; TANJI, S. Preservação de duas microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis tetrale* por resfriamento e congelamento. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v. 23, p. 1 – 11, 1996.

GASPARINI, J. L. et al. Marine Ornamental Trade in Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, n. 12, p. 2883–2899, 2005.

GIWOJNA, P. Ocean rider: a horse of a different color. **Fresh. Mar. Aquarium**, v. 3, p. 122–150, 2002.

GRIMA, E. M. et al. Preservation of the marine microalga *Isochrysis galbana* : influence on the fatty acid profile. **Aquaculture**, v. 123, p. 377–385, 1994.

GUEVARA, M. et al. Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotifera). **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, p. 1503–1515, 2011.

GUILLARD, R. R. L. Culture of marine invertebrate animals. In: New York, USA: Plenum, 1975. p. 6–29.

HANSEN, B.; BJØRNSEN, P. K.; HANSEN, P. J. The size ratio between planktonic predators and their prey. **Limnology and Oceanography**, v. 39, p. 395–403, 1994.

HEASMAN, M. et al. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 637–659, 2000.

HORA, M. D. S. C.; JOYEUX, J.-C. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 292, p. 37–41, 2009.

HOLT, G. J.; FAULK, C. K.; SCHWARZ, M. H. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 181–187, 2007.

KNUCKEY, R. M. et al. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300–313, 2006.

KOLDEWEY, H. J.; MARTIN-SMITH, K. M. A global review of seahorse aquaculture. **Aquaculture**, v. 302, p. 131–152, 2010.

LIMA, L. C. M.; NAVARRO, D. M. A. F.; SOUZA-SANTOS, L. P. Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 33, p. 372–381, 2013.

LOURIE, S. A. .; VINCENT, A. C. J. .; HALL, H. J. **Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation**. London: Project Seahorse, 1999.

LOWRY, O. H. et al. Protein mesurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 1951.

LUBZENS, E.; SUKENIK, A. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis sp*.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. v. 33, p. 295–309, 1995.

MCCAUSLAND, M. A. et al. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (Crassostrea gigas). **Aquaculture**, v. 174, p. 323-342, 1999.

MILIONE, M.; ZENG, C. The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. **Aquaculture**, v. 273, n. 4, p. 656–664, 2007.

MILLAMENA. Techniques on Algae Harverting and Preservation and as Larval Food. **Aquaculture Engeneering**, v. 9, p. 295–304, 1991.

MONTAINI, E. et al. Long-term preservation of *Tetraselmis suecica* : influence of storage on viability and fatty acid profile. **Aquaculture**, v. 134, p. 81–90, 1995.

MULLER-FEUGA, A. The role of microalgae in aquaculture : situation and trends. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 527–534, 2000.

NAAS, K. E.; NAESS, T.; HARBOE, T. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. **Aquaculture**, v. 105, p. 143–156, 1992.

NELL, J. A.; CONNOR, W. A. O. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster , *Succostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. **Aquaculture**, v. 99, p. 277–284, 1991.

NICOLAISEN, O.; CUNY, M.; BOLLA, S. Factorial experimental designs as tools to optimize rearing conditions of fish larvae. **Aquaculture**, v. 422-423, p. 253–260, 2014.

OLIVOTTO, I. et al. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 92–96, 2008.

OLIVOTTO, I.; HOLT, G. J.; CALADO, R. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 2, p. 135–166, 2011.

PALMTAG, M. R. .; FALUK, C. K. .; HOLT, G. J. Highly unsaturated fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* fed various enrichments. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 1, p. 126–131, 2006.

PAPANDROULAKIS, N.; DIVANACH, P.; ANASTASIADIS, P. The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture International**, v. 9, p. 205–216, 2001.

PAPANDROULAKIS, N.; KENTOURI, M.; MAINGOT, E. Mesocosm: a reliable technology for larval rearing of *Diplodus puntazzo* and *Diplodus sargus sargus*. **Aquaculture International**, v. 12, p. 345–355, 2004.

PHAM, N. K.; LIN, J. The effects of different feed enrichments on survivorship and growth of early juvenile longsnout seahorse, *Hippocampus reidi*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, n. 3, p. 435–446, 2013.

PINDYCK, R. S.; RUBINFELD, D. C. Econometric models and economic forecasts. In: 2 ed. ed.New York: McGraw-Hill, 1981. p. 492.

PONIS, E. . et al. Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. **Aquaculture International**, v. 11, p. 69–79, 2003.

PONIS, E.; ROBERT, R.; PARISI, G. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 491–505, 2003.

PONIS, E. et al. *Pavlova lutheri*: Production , preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture**, v. 282, p. 97–103, 2008.

RIBEIRO, A. C. B.; SOUZA-SANTOS, L. P. Mass culture of the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* fed inert diets. **Blue Biotechnology Journal**, v. 2, n. 4, p. 1–11, 2014.

RINGØ, E. et al. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 24, p. 1005–1032, 2014.

ROCHA, R. J. et al. Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture? **Aquaculture Research**, v. 39, n. 4, p. 362–369, 2008.

ROSELET, F. et al. Comparison of open-air and semi-enclosed cultivation system for massive microalgae production in sub-tropical and temperate latitudes. **Biomass and Bioenergy**, v. 59, p. 418–424, 2013.

SALES, R.; ABREU, P. C. Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 2012–2019, 2015.

SALVESEN, I.; REITAN, K. I.; SKJERMO, J. Microbial environments in marine larviculture : Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. **Aquaculture International**, v. 8, p. 275–287, 2000.

SCHLESINGER, A. et al. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1023–1030, 2012.

SEYCHELLES, L. H. et al. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Müller) using frozen-concentrated microalgae. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, p. 431–439, 2009.

SHEN, Y.; CUI, Y.; YUAN, W. Flocculation optimization of microalga *Nannochloropsis oculata*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 7, p. 2049–63, 2013.

SILVEIRA, R. B. Registros de cavalos-marinhos (Syngnathidae: *Hippocampus*) ao longo da costa brasileira. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 2, p. 316–325, 2011.

SOUZA-SANTOS, L. P. et al. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. **Aquaculture**, v. 404-405, p. 35–40, 2013.

STEIN, J. R. Handbook of Phycological Methods: culture methods and growth measurements. In: Cambridge: Cambridge University, 1973. p. 448.

UDUMAN, N. et al. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, p. 1–15, 2010.

VINCENT, A. C. J.; FOSTER, S. J.; KOLDEWEY, H. J. Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae. **Journal of Fish Biology**, v. 78, p. 1681–1724, 2011.

VINCENT, A. C. J. et al. The role of CITES in the conservation of marine fishes subject to international trade. **Fish and Fisheries**, v. 15, p. 563 – 592, 2014.

VISMARA, R. et al. Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 75–80, 2003.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7–11, 2013.

WALNE, P. R. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. In: London v. 25: Fishery Investiment, 1956. p. 1–53.

WILLADINO, L. et al. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. **Aquaculture**, v. 360-361, p. 10–16, 2012.

WOODS, C. M. C. Growth and survival of juvenile seahorse *Hippocampus abdominalis* reared on live, frozen and artificial foods. **Aquaculture**, v. 220, p. 287–298, 2003.