



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E UTILIZAÇÃO DO CONCENTRADO DE MICROALGAS PRODUZIDO POR FLOCULAÇÃO COMO ALIMENTO SEGURO PARA LARVAS DE CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* E PARA O ROTÍFERO *Brachionus plicatilis*

ROBERTA PORTELLA FIGUEIRÓ

RIO GRANDE, RS

Março de 2019

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**Avaliação da viabilidade e utilização do concentrado de microalgas produzido por
floculação como alimento seguro para larvas de camarão *Litopenaeus vannamei* e
para o rotífero *Brachionus plicatilis***

Roberta Portella Figueiró

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de mestre em Aquicultura
no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Dr. Fabio Roselet

Coorientador: Dr. Wilson Wasielesky Jr.

Rio Grande – RS - Brasil

Março de 2019

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introdução	3
1.1. A importância da aquicultura na produção de alimentos	3
1.2. O uso de microalgas como alimento na aquicultura	3
1.2.1. Na alimentação de crustáceos.....	4
1.2.2. Na alimentação de rotíferos	6
1.3. Restrições ao uso de microalgas	8
1.4. Coleta de microalgas por floculação	8
2. Objetivos	10
2.1. Geral.....	10
2.2. Específicos	10
3. Materiais e Métodos.....	11
3.1. Produção da biomassa de microalgas.....	11
3.1.1. Cultivo de <i>Nannochloropsis oceanica</i>	11
3.1.2. Cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i>	12
3.2. Coleta e armazenamento da biomassa.....	12
3.2.1. Floculação da biomassa	12
3.2.2. Centrifugação da biomassa	13
3.2.3. Armazenamento da biomassa	14
3.3. Larvicultura de <i>Litopenaeus vannamei</i>	14
3.4. Produção de <i>Brachionus plicatilis</i>	15

3.5. Delineamento experimental	15
3.5.1. Experimento 1.....	15
3.5.2. Experimento 2.....	16
3.5.3. Experimento 3.....	16
3.6. Análise estatística.....	18
4. Resultados	18
4.1. Experimento 1	18
4.2. Experimento 2	21
4.3. Experimento 3	22
5. Discussão.....	24
5.1. Efeito dos flocculantes nas larvas de <i>L. vannamei</i>	24
5.2. Efeito dos flocculantes nos rotíferos <i>B. plicatilis</i>	27
6. Conclusões	30
7. Referências Bibliográficas	30

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos meus pais Wilson Figueiró (*in memorium*) e Rosa Maria, por toda dedicação, formação pessoal, amor incondicional e incentivo para seguir sempre em frente;

Ao meu orientador Fabio Roselet pelos ensinamentos ao longo de todo o mestrado;

Ao meu co-orientador, Wilson Wasielesky Jr., pela disponibilidade e ensinamentos nesta caminhada;

Ao professor Paulo Abreu por todo apoio sempre;

Aos meus amigos do Laboratório: Aline, Ana Paula, Ane, Cynthia, Duda, Faby, Flávia e Helly;

Aos servidores e amigos da EMA;

A toda equipe do Projeto camarão;

A todos os membros do laboratório de Produção de Microalgas;

Agradeço ao pessoal do LAPEM, por toda ajuda durante os experimentos, especialmente ao Thiago Pedrosa, Daniel Correia, Joel e Lucas Maltez pela disponibilidade e ensinamentos compartilhados. Um agradecimento especial ao professor Ricardo Vieira por toda atenção e conhecimento dividido, não tenho palavras para agradecer;

Aos professores do programa por terem sido sempre solícitos e por dividirem seus conhecimentos comigo, obrigada;

Ao professor Carlos Prentice e a toda sua equipe, por abrir as portas do seu laboratório e serem tão queridos, em especial a Aline Mássia;

Ao Professor Monserrat e a colega Paty por abrirem as portas do laboratório e contribuírem tanto para que meu trabalho pudesse ser realizado da melhor maneira possível;

À FURG e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura pela oportunidade;

A CAPES pelo apoio financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de desenvolvimento e sequência alimentar de larvas de camarões peneídeos (Cahu, 2001).....	4
Figura 2: Foto de um adulto do Camarão-Branco <i>Litopenaeus vannamei</i> (Fonte: GIA – Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais).	5
Figura 3: Foto de microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> (https://ncma.bigelow.org/ccmp1316).	6
Figura 4: Foto de uma fêmea ovada do rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d0/Brachionus_plicatilis.jpg).....	7
Figura 5: Foto de microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i> (https://phys.org/news/2018-05-dna-toolkit-alga-nannochloropsis.html).	7
Figura 6: Uso de biomassa floculada na alimentação direta (①) e indireta (②) de organismos aquáticos.	10
Figura 7: Foto do cultivo de <i>Nannochloropsis oceanica</i>	11
Figura 8: Foto do cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i> em crescimento exponencial (a) e no momento de coleta (b).....	12
Figura 9: Tanque de floculação.....	13
Figura 10: Centrifuga de piso modelo Supra 22K.	14
Figura 11: Imagem da estrutura usada no experimento (a) e detalhe da unidade experimental de volume útil de 2 litros (b).	17
Figura 12: Mortalidade de larvas de <i>L. vannamei</i> com adição de diferentes concentrações de Tanfloc (a) e Flopam (b) diretamente na água.	18
Figura 13: EC50 de Tanfloc (a) e Flopam (b) adicionados diretamente na água.	19
Figura 14: Fotos das larvas de <i>L. vannamei</i> observadas no experimento de adição de floculante no cultivo. (a) Controle, (b) Tanfloc e (c) Flopam. As setas indicam a presença de cordão fecal.....	19
Figura 15: Mortalidade de larvas de <i>L. vannamei</i> alimentadas com biomassa de <i>C. muelleri</i> concentrada por centrifugação (Controle) e por floculação com Tanfloc e Flopam.....	21

Figura 16: Fotos das larvas de <i>L. vannamei</i> observadas no experimento de alimentação. (a) Controle, (b) Tanfloc e (c) Flopam. As setas pretas indicam a presença de cordão fecal e as vermelhas indicam os aglomerados de células no corpo das larvas.	22
Figura 17: Efeitos dos flocculantes Tanfloc e Flopam na densidade de rotíferos (a) e na porcentagem de fêmeas ovadas (b). Os tratamentos Centrifugado e Jejum foram empregados como controle positivo e negativo, respectivamente. Sobrescritos diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de qualidade da água observados no experimento 1. Os dados são correspondentes a média de 3 repetições \pm desvio padrão.	20
Tabela 2: Parâmetros de qualidade da água observadas no experimento 2. Os dados são correspondentes a média de 5 repetições \pm desvio padrão.	22
Tabela 3: Parâmetros de qualidade da água observados no experimento 3. Os dados são correspondentes a média de 3 repetições \pm desvio padrão.	24
Tabela 4: Níveis recomendados dos parâmetros de qualidade de água para larvas do camarão <i>L. vannamei</i> de acordo com Boyd (1989, 2003).	25
Tabela 5: Níveis recomendados dos parâmetros de qualidade de água para rotíferos <i>Brachionus plicatilis</i> de acordo com Perumal (et al. 2015)	28

RESUMO

As microalgas têm grande importância na aquicultura, pois são alimentos de alto valor nutricional. Este trabalho avaliou o uso de 2 flocculantes orgânicos, Tanfloc e Flopam na obtenção de concentrado das microalgas, *Chaetoceros muelleri* e *Nannochloropsis oceanica* como fonte de alimento para larvas de *Litopenaeus vannamei* na fase de Protozoa I e *Brachionus plicatilis*, avaliando sobrevivência. Foram realizados 3 experimentos com adição das microalgas. No experimento 1, os camarões foram submetidos a 4 tratamentos, com diferentes concentrações de flocculantes adicionados diretamente na água (2.5, 5, 10 e 20 mg/L) e um tratamento controle sem a adição de flocculante. No experimento não houve diferença significativa em nenhum parâmetro de qualidade da água. Houve mortalidade nos tratamentos com uso de ambos os flocculantes nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/l. No experimento 2 os camarões foram submetidos a 3 tratamentos, tratamento controle com a microalga *C. muelleri* centrifugada, tratamento com uso de biomassa flocculada com Tanfloc e tratamento com uso de biomassa flocculada com Flopam. Não foi observada diferença significativa em nenhum parâmetro de qualidade da água. Houve mortalidade total nos tratamentos com uso dos dois flocculantes. No experimento 3, os rotíferos foram submetidos a 4 tratamentos, sendo um controle com a microalga *N. oceanica* centrifugada, um tratamento em jejum, um com biomassa flocculada com Tanfloc e um com biomassa flocculada com Flopam. Houveram diferenças significativas para amônia, nitrito, densidade de rotíferos e percentual de fêmeas ovadas. No parâmetro amônia e nitrito foram observados picos no tratamento controle, em virtude do elevado crescimento, existindo assim uma maior excreção de nitrogenados. Havendo o tratamento controle apresentado os melhores resultados de densidade populacional e porcentagem de fêmeas ovadas. Com base nestes resultados, conclui-se que o concentrado por flocculação não é aconselhado como alimento na larvicultura de camarão ou como alimento do rotífero.

Palavras-chave: *Chaetoceros muelleri*, Flocculante, Flopam, Larvicultura, *Nannochloropsis oceanica*, Tanfloc, Zooplâncton

ABSTRACT

Microalgae have great importance in aquaculture, since they are foods of high nutritional value. This work evaluated the use of two organic flocculants, Tanfloc and Flopam in obtaining microalgae concentrate, *Chaetoceros muelleri* and *Nannochloropsis oceanica* for use as a food source for larvae of *Litopenaeus vannamei* in the Protozoa I and *Brachionus plicatilis* phase, evaluating survival. Three experiments carried out were with microalgae addition. Experiment 1, the shrimps were submitted to 4 treatments, with different concentrations of flocculant inclusion directly in the water (2.5, 5, 10 and 20 mg / L) and a control treatment without the addition of flocculant. In the experiment, there was no significant difference in any parameter of water quality. There was mortality in treatments with both flocculants at concentrations of 5, 10 and 20 mg / l. In the experiment 2 the prawns submitted were to 3 treatments, control treatment with the microalgae *C. muelleri* centrifuged, treatment with the use of flocculated biomass with Tanfloc and treatment with the use of flocculated biomass with Flopam. No significant difference observed was in any parameter of water quality. There was total mortality in the treatments with the use of both flocculants. In experiment 3, the rotifers were submitted to 4 treatments, being a control with the microalgae *N. oceanica* centrifuged, a treatment in fast, one with biomass flocculated with Tanfloc and one with flocculated biomass with Flopam. There were significant differences for ammonia, nitrite, rotifers density and percentage of ovate females. In the parameter ammonia and nitrite, peaks observed were in the control treatment, due to the high growth, thus, there is a higher nitrogen excretion. If the control treatment presented the best results of population density and percentage of ovate females. Based on these results, it concluded is that the concentrate by flocculation advised is not as food in shrimp larviculture or as rotifer feed.

Keywords: *Chaetoceros muelleri*, Flocculant, Flopam, Larviculture, *Nannochloropsis oceanica*, Tanfloc, Zooplankton

1. Introdução

1.1. A importância da aquicultura na produção de alimentos

Conforme relatório das Nações Unidas, a atual população mundial é de 7,6 bilhões de pessoas e deverá atingir 8,6 bilhões em 2030, com a maior parte deste crescimento incidindo em regiões em desenvolvimento (UN, 2017). Com isso, garantir alimentação adequada e segurança nutricional para esta população em crescimento é um grande desafio. Desde meados da década de 1990, devido a exploração demasiada dos estoques pesqueiros, a produção anual de pescado se estabilizou em torno de 93 milhões de toneladas, não sendo capaz de abastecer a crescente demanda de alimentos de origem aquática. Por outro lado, a aquicultura é um setor de alimentos que possui um dos desenvolvimentos mais acelerados do mundo e com grande potencial para atender esta demanda. Segundo a FAO (2018), a produção global aquícola em 2016 foi de 110,2 milhões de toneladas, sendo que o grupo mais produzido foi o de peixes com 54,1 milhões de toneladas (USD 138,5 bilhões), seguido de plantas aquáticas, com 30,1 milhões de toneladas (USD 11,7 bilhões), moluscos com 17,1 milhões de toneladas (USD 29,2 bilhões), crustáceos com 7,9 milhões de toneladas (USD 57,1 bilhões) e 0,9 milhões de toneladas (USD 6,8 bilhões) de outros animais como tartarugas, pepinos do mar, ouriços do mar, sapos e águas-vivas.

1.2. O uso de microalgas como alimento na aquicultura

As microalgas são organismos unicelulares, fotossintetizantes, com dimensões que variam entre 2 e 100 μm e que podem estar organizados em colônias ou como células isoladas. Estes organismos são ricos em nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e pigmentos. Devido à sua alta qualidade nutricional, as microalgas exercem um papel importante na aquicultura, sendo empregadas na alimentação de moluscos bivalves e zooplâncton, e em estágios larvais de crustáceos e peixes (Mata et al. 2010). Além da qualidade nutricional, as microalgas também atuam como moduladores do sistema imunológico (Oliveira et al. 2013) e como agentes antimicrobianos anti-inflamatória e antioxidante (Bhagavathy et al., 2011).

1.2.1. Na alimentação de crustáceos

Um dos fatores mais importantes na produção de crustáceos é a disponibilidade de larvas de qualidade, pois apresentam alto crescimento e baixa mortalidade. Desta forma, é necessário oferecer alimentos em quantidade e qualidade suficiente para atender as exigências nutricionais das larvas (ABCC, 2012). Após a eclosão, as larvas de crustáceos passam por diferentes estágios de desenvolvimento, primeiro como Náuplio, seguido por Zoea, Misis e finalmente Pós-larva (Figura 1). Durante o estágio de Náuplio, que dura dois dias, a larva possui uma alimentação estritamente endógena, consumindo apenas suas reservas vitelínicas. No estágio de Zoea, com o fim destas reservas, a larva passa então a consumir alimentos exógenos. Durante este estágio, que dura cinco dias, a larva se alimenta principalmente de microalgas. Nos estágios seguintes outros alimentos são introduzidos, como *Artemia* e rações, para complementar a dieta com microalgas (ABCC, 2012).

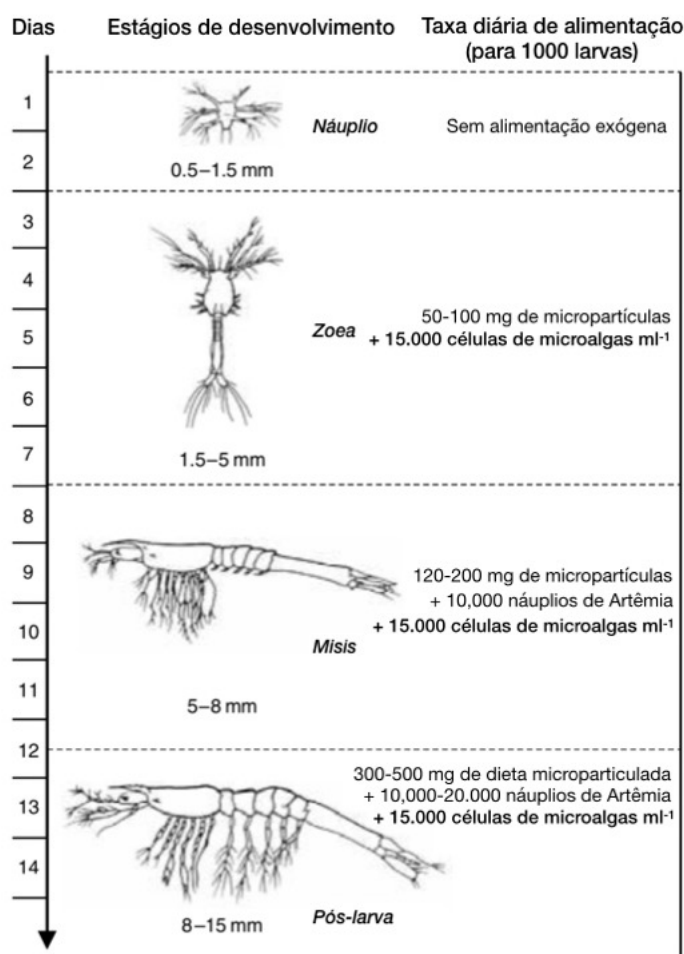


Figura 1: Estágios de desenvolvimento e sequência alimentar de larvas de camarões penéides (Cahu, 2001).

O Camarão-Branco (*Litopenaeus vannamei*, Figura 2) é o crustáceo mais cultivado na aquicultura, com uma produção de 4,1 milhões de toneladas em 2016, equivalendo a 53% da produção total (FAO, 2018). Pertencente à família *Penaeidae*, *L. vannamei* é uma espécie marinha e distribui-se ao longo da costa do Pacífico da América Central e do Sul. Possui alta importância econômica devido a sua alta adaptabilidade a diferentes condições climáticas, à sua rusticidade, rapidez no crescimento, ampla faixa de tolerância à salinidade, à sua capacidade em aproveitar dietas com níveis proteicos baixos e elevada resistência a baixos teores de oxigênio na água (Zhou et al. 2009). Os machos atingem a maturidade sexual medindo em média 17 cm e pesando em torno de 20 g e as fêmeas medindo cerca de 23 cm e com peso de 28 g, o que acontece a partir dos 6-7 meses de vida (Gao et al. 2016). Na região Sul do Brasil, a produção de camarões geralmente fica limitada a uma safra por ano, ocorrendo nos meses com maior temperatura, geralmente com duração de 75 dias (ciclo curto) ou 150 dias (ciclo longo). Assim, os cultivos de camarões nessa região são comumente realizados do início da primavera até o início do outono.



Figura 2: Foto de um adulto do Camarão-Branco *Litopenaeus vannamei* (Fonte: GIA – Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais).

As larvas *L. vannamei*, possuem altas exigências de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), especialmente da família n-3 e n-6. Esta exigência é suprida com o fornecimento de microalgas ricas em PUFAs, principalmente em ácidos docosahexanóico

(DHA) e eicosapentanóico (EPA). A diatomácea *Chaetoceros muelleri* (Figura 3) é uma das espécies mais utilizadas na alimentação de larvas de *L. vannamei*, devido ao seu tamanho adequado (8-20 μm), rápido crescimento e alto valor nutricional, apresentando cerca de 27% de PUFA's (Jaime-Ceballos et al. 2006).

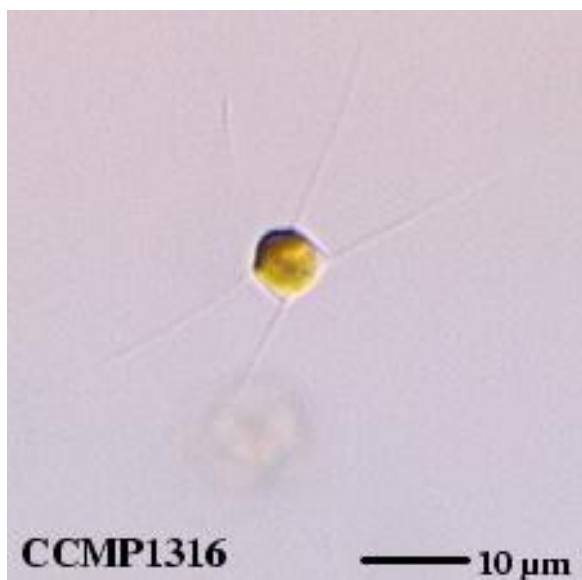


Figura 3: Foto de microalga *Chaetoceros muelleri* (<https://ncma.bigelow.org/ccmp1316>).

1.2.2. Na alimentação de rotíferos

Assim como na produção de crustáceos, a qualidade das larvas é um dos fatores mais importantes na produção de peixes pois larvas bem alimentadas apresentam melhor crescimento, ganho de peso e sobrevivência. No entanto, diferente de crustáceos, larvas de peixes não se alimentam diretamente de microalgas, mas de rotíferos que se alimentam destas. Os rotíferos são organismos invertebrados aquáticos, pertencentes ao filo *Rotifera*, pseudocelomados, não segmentados e com simetria bilateral. A classe *Monogononta* contém mais de 90% de todas as espécies de rotíferos e a família *Brachionidae* é composta seis gêneros, incluindo *Brachionus* com cerca de 25 espécies. Poucas espécies são marinhas, sendo *Brachionus plicatilis* (Figura 4) uma das mais empregadas como alimento na larvicultura de peixes por ter um tamanho adequado para consumo (100-280 μm), motilidade relativamente baixa, alta taxa de reprodução, curto ciclo de vida (3-5 dias) e tolerância a uma ampla faixa de salinidade e temperatura. Além disso, a qualidade nutricional de *B. plicatilis* pode ser facilmente manipulada (bioencapsulação) para atender as exigências nutricionais das larvas, principalmente de PUFA's (Ferreira, 2009). Estas características tornam a espécie ideal para cultivos massivos.



Figura 4: Foto de uma fêmea ovada do rotífero *Brachionus plicatilis* (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d0/Brachionus_plicatilis.jpg).

Em geral, o valor nutritivo de rotíferos depende da espécie de microalga da qual se alimenta. Embora vários gêneros possam ser empregados, como *Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, *Chaetoceros*, *Rhodomonas* e *Isochrysis*, foi observado que *Nannochloropsis* é o melhor em termos de conteúdo nutritivo, pois contém alto conteúdo de PUFA's (Ronquillo et al. 2012). Apenas cinco espécies compõem o gênero, todas de ambiente marinho, sendo *Nannochloropsis oceanica* uma delas (Figura 5). Esta espécie possui células esféricas de pequeno tamanho (2 – 4 μm), apresenta altas taxas de crescimento, tolerância a uma ampla faixa de condições ambientais como temperatura e salinidade, e acumula até 50% do seu peso seco na forma de lipídio (Grima et al., 2003; Mata et al., 2010).

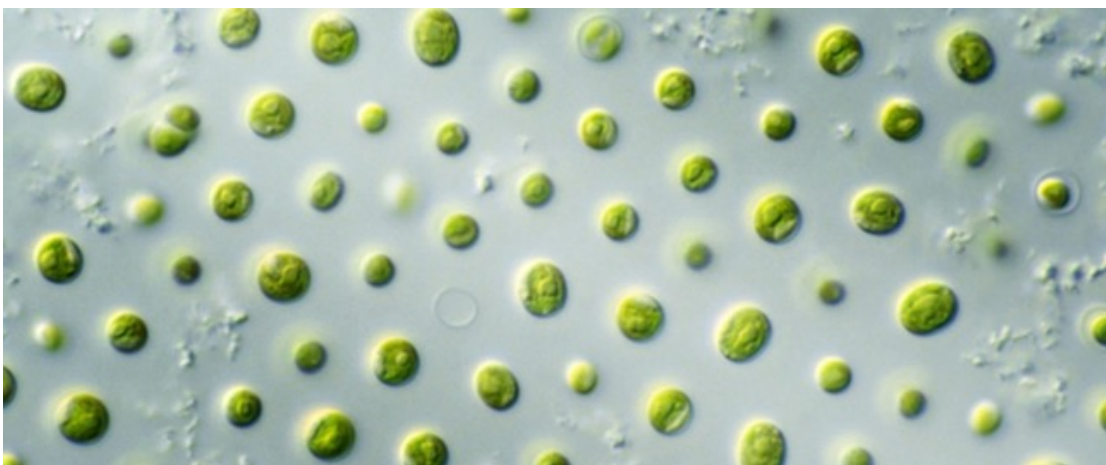


Figura 5: Foto de microalga *Nannochloropsis oceanica* (<https://phys.org/news/2018-05-dna-toolkit-alga-nannochloropsis.html>).

1.3. Restrições ao uso de microalgas

Apesar da produção de microalgas ser de fundamental importância na larvicultura de organismos aquáticos, ela também é trabalhosa e onerosa. Como as microalgas são produtos intermediários e não um produto final comercializável, ao contrário das larvas, os investimentos necessários em infraestrutura e na contratação de pessoal qualificado são geralmente ignorados (Muller-Feuga et al. 2000; Perumal et al. 2015). Por exemplo, as técnicas de produção comumente empregadas na aquicultura não são eficientes, resultando em baixas produtividades e requerendo grandes volumes de cultivo para atender a demanda da larvicultura. As microalgas geralmente são cultivadas em sistemas abertos, sem grandes controles dos parâmetros ambientais, como temperatura, luminosidade ou pH. Além disto, os meios de cultivo empregados geralmente são a base de fertilizantes agrícolas, de custo mais barato e contendo apenas os macronutrientes mais importantes, como nitrogênio, fósforo e, no caso de diatomáceas, sílica. Conseqüentemente, a produção de microalgas raramente alcança valores superiores a 1 g/L, o que equivale a apenas 0,1% do volume do cultivo. Como são necessárias grandes concentrações de microalgas, os cultivos requerem muito espaço, que poderia ser empregado para outras finalidades. Além disto, devido ao seu tamanho microscópico (2-100 µm) e densidade semelhante ao do meio, as microalgas não são facilmente coletadas, requerendo técnicas específicas. Geralmente a coleta é realizada empregando-se centrifugas de alta capacidade (Heasman et al., 2000). No entanto, devido ao grande volume a ser centrifugado, o consumo energético é muito elevado, podendo representar até 50% do custo total da produção e tornando o procedimento muito caro (Greenwell et al., 2010). O custo da biomassa seca pode chegar a US\$ 1.000 o quilo (Rawat et al., 2013). Além do mais, manter cultivos de microalgas em paralelo à da espécie-alvo pode ser desastroso pois, se os cultivos sofrerem alguma queda na produção, seja por falha na manutenção ou por contaminação com outros organismos, a larvicultura ficará sem alimento.

1.4. Coleta de microalgas por floculação

A floculação é uma tecnologia promissora e de baixo custo para a coleta de microalgas (Vandamme et al., 2013). Como as microalgas possuem uma carga superficial negativa, a adição de um agente de carga positiva (catiônicos) resulta na neutralização da

carga das microalgas, possibilitando a agregação das células. Como estes agregados são maiores e mais pesados que as células isoladas, eles sedimentam rapidamente. Diversos estudos do Laboratório de Produção de Microalgas, da Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), demonstraram que a floculação é um processo eficiente na concentração de microalgas (Roselet et al., 2015, 2016, 2017; Sales e Abreu, 2014, König et al., 2014). A floculação pode ser empregada para pré-concentrar o cultivo, reduzindo o volume a ser centrifugado e, conseqüentemente, reduzindo os custos de produção. No entanto, a floculação é obtida pela adição de produtos químicos, que podem ser inorgânicos ou orgânicos. Dentre os flocculantes inorgânicos, os baseados em sais metálicos como cloreto férrico e sulfato de alumínio não são recomendados para a concentração de microalgas para uso alimentar, pois contaminam a biomassa com metais, causando riscos à saúde dos organismos (Farooq et al., 2015).

Atualmente, os flocculantes orgânicos a base de poliacrilamida são amplamente usados para a concentração de microalgas. A acrilamida é uma matéria-prima utilizada em diversos setores da indústria química, incluindo produtos para tratamento de água (Gregory, 2013; Lu et al., 2014). Apesar da poliacrilamida não ser tóxica, os monômeros de acrilamida formados pela sua degradação são (Bolto, 2007). A acrilamida é uma substância neurotóxica e classificada como carcinogênica para humanos, segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (Obon-Santacana et al. 2015). Estudos com animais associaram a presença de acrilamida na água tratada ao surgimento de tumores (Neri, 2004). A preocupação com a presença de acrilamida na água tratada levou diversas nações a estabelecerem limites permissíveis. Os EUA estabeleceram um limite residual 0,5 µg/L, enquanto que a União Europeia estabelece limite de 0,1 µg/L. No Brasil, a portaria nº 1469 de 29 de dezembro de 2000 do Ministério da Saúde, que normatiza a qualidade da água para consumo humano, estabelece um valor máximo de 0,5 µg/L (BRASIL, 2000). Roselet et al. (2017) testaram a toxicidade de um flocculante a base de poliacrilamida em microalgas de água doce e marinha, em concentrações variando de 2 a 100 mg L⁻¹. De acordo com os autores, o flocculante apresentou toxicidade apenas para a espécie de água doce.

Uma opção aos flocculantes sintéticos a base de poliacrilamida são os naturais, pois são considerados biodegradáveis e não tóxicos, sendo promissores na concentração de

microalgas para a alimentação animal. A quitosana é um exemplo, derivada da quitina extraída da casca de crustáceos. No entanto, Roselet et al. (2015) avaliaram os custos deste flocculante para a concentração de microalgas e concluíram que o seu uso não seria economicamente viável, devido ao alto preço de mercado (US\$ 10.000 t⁻¹) e baixa eficiência em água salgada. Os mesmos autores avaliaram um novo produto natural disponível no mercado nacional, a base de taninos extraídos da árvore Acacia-Negra (*Acacia mearnsii*), concluindo ser tanto eficiente na coleta de microalgas marinhas quanto economicamente viável. Em outro estudo, foi observado que este flocculante não apresentou toxicidade para microalgas de água doce e marinhas em concentrações até 100 mg L⁻¹ (Roselet et al., 2017).

Apesar dos flocculantes orgânicos a base de tanino não serem considerados tóxicos para organismos aquáticos, não existem trabalhos demonstrando o seu efeito em organismos alimentados com concentrados de microalgas produzidas por flocculação, como larvas de camarão ou rotíferos. Tampouco existem trabalhos que verificaram o efeito de magnificação trófica, pois os rotíferos servem de alimento para larvas de peixes (Figura 6).

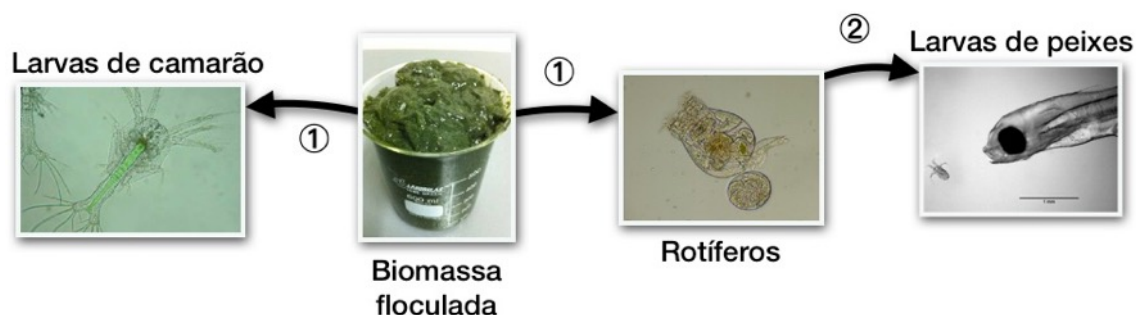


Figura 6: Uso de biomassa flocculada na alimentação direta (①) e indireta (②) de organismos aquáticos.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Verificar o efeito de concentrados de microalgas, produzidos por flocculação com polímeros orgânicos sintéticos e naturais, como alimento para organismos aquáticos.

2.2. Específicos

- Verificar a sobrevivência de larvas de *L. vannamei* na presença de flocculante na água.

- Verificar a sobrevivência de larvas de *L. vannamei* alimentadas com biomassa floculada.
- Verificar a sobrevivência de *B. plicatilis* alimentados com biomassa floculada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Produção da biomassa de microalgas

3.1.1. Cultivo de *Nannochloropsis oceanica*

O inoculo da microalga *N. oceanica* foi proveniente do Laboratório de Produção de Microalgas da FURG. A microalga foi cultivada em água marinha natural (salinidade 28), previamente filtrada em filtro cartucho de polipropileno de 1,0 µm de poro. Em seguida, a água foi esterilizada com adição de hipoclorito de sódio 12% (0,15 mL/L) por 24 horas e declorada com a adição de 30 mg/L de ácido ascórbico, por 30 minutos. Após o processo de esterilização, a água foi enriquecida com meio fertilizante composto de sulfato de amônio (150,0 mg/L), ureia (7,5 mg/L), superfosfato de cálcio (25,0 mg/L), cloreto férrico (1,6 mg/L) e suplementado com vitaminas B₁ (0,1 mg/L), B₇ (0,5 µg/L) e B₁₂ (0,5 µg/L). Após a inoculação, o cultivo de *Nannochloropsis oceanica* foi mantido em suspensão pela injeção contínua de ar atmosférico (20 L/min), sob luz e fotoperíodo naturais em um tanque circular de 1.600 L (Roselet et al., 2013, Figura 7). O crescimento do cultivo foi monitorado a cada dois dias através de contagens celulares, usando-se uma câmara de Neubauer e microscópio. A coleta da biomassa foi realizada quando o cultivo alcançou o final da fase exponencial, quando a densidade celular foi máxima. A metodologia da coleta está descrita na Seção 3.2.



Figura 7: Foto do cultivo de *Nannochloropsis oceanica*.

3.1.2. Cultivo de *Chaetoceros muelleri*

O inoculo da microalga *C. muelleri* foi obtido na coleção do Laboratório de Produção de Microalgas da FURG. Esta microalga foi cultivada em água marinha natural (salinidade 30) esterilizada de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.1.1. A água foi enriquecida com meio f/2 suplementado com 30 mg/L de metassilicato de sódio (Guillard, 1975). O cultivo foi inoculado em um fotobiorreator cilíndrico de 330 L (Figura 8), mantido em suspensão pela injeção contínua de ar atmosférico (20 L/min), sob iluminação artificial proporcionada por duas lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia de 40 W (3200 luxes) e com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. O crescimento e a coleta da biomassa foram realizados conforme descrito na Seção 3.1.1.

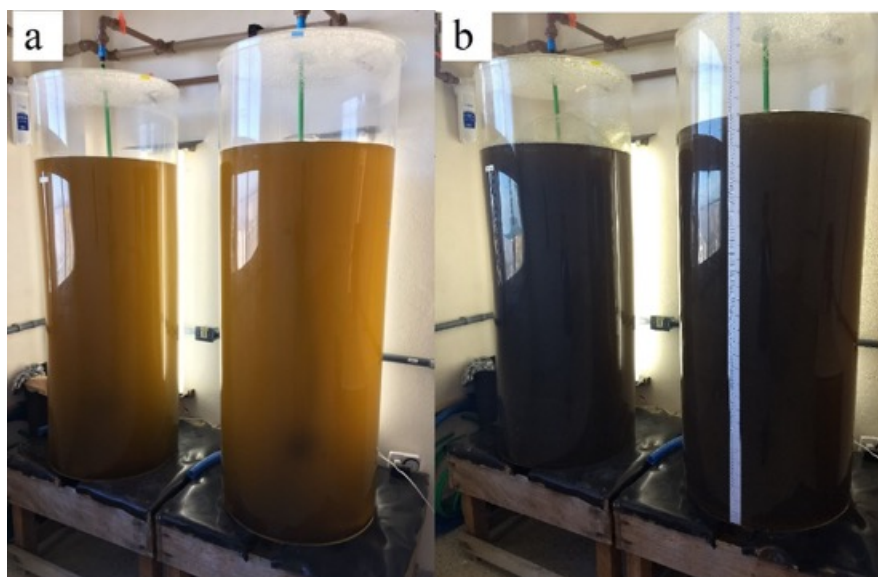


Figura 8: Foto do cultivo de *Chaetoceros muelleri* em crescimento exponencial (a) e no momento de coleta (b).

3.2. Coleta e armazenamento da biomassa

3.2.1. Flocculação da biomassa

A biomassa de *N. oceanica* e de *C. muelleri* foi concentrada por flocculação empregando-se dois flocculantes orgânicos comerciais usados no tratamento de água. Flopam FO 4990 SH é um flocculante sintético a base de poliacrilamida produzido pela empresa SNF Floerger (França), e Tanfloc SG é um flocculante natural a base de tanino produzido pela empresa TANAC (Brasil). Ambos os flocculantes foram anteriormente empregados com sucesso na coleta de microalgas marinhas (Roselet et al., 2015, 2016, 2017).

A coleta da biomassa foi realizada em um tanque de floculação contendo 250 litros de cultivo, equipado com sistema elétrico de homogeneização (Figura 9). *Nannochloropsis oceanica* foi floculada adicionando-se a concentração ótima de cada floculante (Tanfloc: 10 mg/L, Flopam: 5 mg/L), enquanto que para *C. muelleri* foi usada a concentração ótima de 5 mg/L de cada floculante. As concentrações ótimas foram previamente determinadas utilizando-se a metodologia de teste de jarros, conforme descrita em Roselet et al. (2016). Após a adição dos floculantes, a dispersão foi realizada por agitação mecânica a uma rotação de 80 RPM por 5 minutos, seguida de uma rotação de 20 RPM por 15 minutos para estimular a formação dos flocos. Ao final desta etapa, a agitação foi suspensa para permitir a sedimentação dos flocos, seguida pela remoção do sobrenadante por sifonagem e coleta da biomassa.



Figura 9: Tanque de floculação.

3.2.2. Centrifugação da biomassa

Além da biomassa concentrada por floculação, uma parte foi concentrada por centrifugação para ser usada como um tratamento controle, sem adição de floculante. Para isto, foi empregada uma centrífuga de piso refrigerada da alta capacidade (Supra 22K, Hanil, Coréia do Sul, Figura 10). A biomassa foi centrifugada por 10 minutos, 9000 RPM e 15 °C. O sobrenadante não foi totalmente removido para manter a biomassa em forma líquida para uso posterior.



Figura 10: Centrifuga de piso modelo Supra 22K.

3.2.3. Armazenamento da biomassa

Os concentrados de *N. oceanica* e *C. muelleri*, tanto por floculação quanto por centrifugação, foram armazenados em potes e mantidos refrigerados (4 °C) até o momento da sua utilização, não superior a 30 dias. Previamente e durante os experimentos foi verificada a viabilidade dos concentrados, através da observação da estrutura celular usando um microscópio ótico. Foram consideradas como viáveis quaisquer células que não apresentaram rompimento celular e mantiveram a sua coloração típica.

3.3. Larvicultura de *Litopenaeus vannamei*

Os náuplios do camarão *L. vannamei* foram adquiridos do laboratório comercial Aquatec Ltda. (Rio Grande do Norte). Ao chegarem no laboratório, os náuplios passaram por uma aclimação de temperatura (30 °C), pH (8,4), salinidade (34) e por um teste de fototaxia positiva para verificação do estado sanitário. Após isto, os náuplios foram estocados nas unidades experimentais de 2 L na densidade de 100 náuplios/L, com aeração e temperatura constantes. Os experimentos foram iniciados apenas quando as larvas atingiram o estágio de Protozoa I, momento em que esgotam as reservas vitelínicas e iniciam a alimentação exógena.

3.4. Produção de *Brachionus plicatilis*

O cultivo do rotífero *B. plicatilis* foi obtido do Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha da FURG. Os rotíferos foram cultivados em sistema de batelada, em tanques cilíndricos cônicos de 40 litros de volume útil, com temperatura de 24 °C, em salinidade de 25, com aeração e luminosidade contínuas. Os rotíferos foram alimentados diariamente com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (0,6 g/10⁶ rotíferos). A cada 4 dias os rotíferos foram lavados com água salgada esterilizada, usando-se uma malha de 50 µm, e inoculados na densidade de 200 rotíferos/mL (Pousão-Ferreira, 2009).

3.5. Delineamento experimental

3.5.1. Experimento 1

Este experimento foi realizado no Laboratório de Carcinocultura da FURG e teve como objetivo verificar o efeito do floculante, adicionado diretamente na água, na sobrevivência de larvas de *L. vannamei*. Para isto, as larvas foram submetidas a quatro concentrações diferentes dos floculantes Tanfloc e Flopam (2,5, 5, 10 e 20 mg/L), separadamente. Um tratamento sem adição de floculante foi empregado como controle. As unidades experimentais tinham um volume útil de 2 litros, instaladas em um tanque com temperatura controlada (30 °C). A aeração foi suave e constante, porém não foi possível determinar o fluxo. Todos os tratamentos foram realizados com três repetições.

Durante o experimento as larvas foram alimentadas normalmente, com adição diária da biomassa centrifugada de *C. muelleri*. Para isto, foram realizadas contagens celulares no concentrado centrifugado e nas unidades experimentais para determinar o volume de concentrado e ser adicionado para atingir a densidade de 5×10^4 células/mL nas unidades. O experimento teve duração de três dias.

A resposta monitorada neste experimento foi a mortalidade, através da contagem diária de larvas subtraída da contagem inicial. As contagens foram feitas empregando-se um microscópio. Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente para garantir que a resposta não foi influenciada por qualquer variação fora dos limites tolerados pela espécie, de acordo com Boyd (1989, 2003). Os parâmetros monitorados foram temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro, YSI, 550A, EUA), pH (Mettler Toledo, Five Easy FE 20, EUA), amônia total e nitrito (UNESCO, 1983).

3.5.2. Experimento 2

Este experimento foi realizado no Laboratório de Carcinocultura da FURG e teve como objetivo verificar o efeito da biomassa de *C. muelleri* concentrada por floculação na sobrevivência de larvas de *L. vannamei*. Para isto, as larvas foram submetidas a dois tratamentos referentes aos floculantes Tanfloc e Flopam, conforme descrito na Seção 3.2.1. Um tratamento coletado por centrifugação e sem adição de floculante foi empregado como controle. As unidades experimentais tinham um volume útil de 2 litros, instaladas em um tanque com temperatura controlada (30 °C). A aeração foi suave e constante, porém não foi possível determinar o fluxo. Todos os tratamentos foram realizados com cinco repetições.

Durante o experimento as larvas foram alimentadas normalmente, com adição diária das diferentes biomassas de *C. muelleri* (centrifugada, Tanfloc e Flopam). Para isto, foram realizadas contagens celulares dos concentrados e nas unidades experimentais para determinar o volume de concentrado e ser adicionado para atingir a densidade de 5×10^4 células/mL nas unidades. O experimento teve duração de seis dias.

A resposta monitorada neste experimento foi a mortalidade, através da contagem diária de larvas subtraída da contagem inicial. As contagens foram feitas empregando-se um microscópio. Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente para garantir que a resposta não foi influenciada por qualquer variação fora dos limites tolerados pela espécie, de acordo com Boyd (1989, 2003). Os parâmetros monitorados foram temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro, YSI, 550A, EUA), salinidade com refratômetro digital (Atago, PAL-06S, Japão), pH (Mettler Toledo, Five Easy FE 20, EUA), amônia total e nitrito (UNESCO, 1983).

3.5.3. Experimento 3

Este experimento foi realizado no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha da FURG e teve como objetivo verificar o efeito da biomassa de *N. oceanica* concentrada por floculação na sobrevivência de rotíferos *B. plicatilis*. Para isto, os rotíferos foram submetidos a dois tratamentos referentes aos floculantes Tanfloc e Flopam, conforme descrito na Seção 3.2.1. Um tratamento coletado por centrifugação e sem adição de floculante foi empregado como controle positivo, enquanto que um tratamento sem adição de alimento (jejum) foi empregado como controle negativo. As unidades

experimentais tinham um volume útil de 2 litros com uma densidade de 50 rotíferos/mL, instaladas em um tanque com temperatura controlada em 25 °C (Figura 11). A aeração foi suave e constante, porém não foi possível determinar o fluxo. Todos os tratamentos foram realizados com três repetições.

Durante o experimento os rotíferos foram alimentados normalmente, com seis adições diárias das diferentes biomassas de *N. oceanica* (centrifugada, Tanfloc e Flopam), exceto no tratamento em jejum. Para isto, foram realizadas contagens celulares dos concentrados e nas unidades experimentais para determinar o volume de concentrado e ser adicionado para manter a densidade de 20×10^4 células/rotífero nas unidades. O experimento abrangeu dois ciclos de produção, cada tendo uma duração de 5 dias devido ao curto ciclo de vida da espécie (Ferreira, 2009). No total, o experimento teve uma duração de 10 dias.

As respostas monitoradas neste experimento foram o número de rotíferos e a porcentagem de fêmeas ovadas. As contagens foram feitas empregando-se um microscópio. Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente para garantir que a resposta não foi influenciada por qualquer variação fora dos limites tolerados pela espécie, de acordo com Boyd (1989, 2003). Os parâmetros monitorados foram temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro, YSI, 550A, EUA), salinidade com refratômetro digital (Atago, PAL-06S, Japão), pH (Mettler Toledo, Five Easy FE 20, EUA), amônia total e nitrito (UNESCO, 1983).

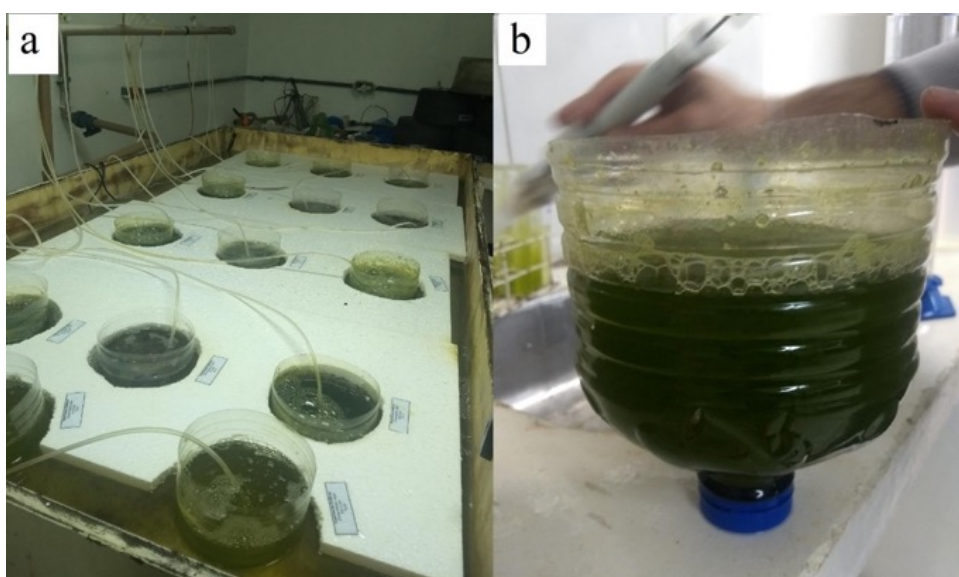


Figura 11: Imagem da estrutura usada no experimento (a) e detalhe da unidade experimental de volume útil de 2 litros (b).

3.6. Análise estatística

Os dados de qualidade de água, mortalidade de larvas, contagem de rotíferos e de fêmeas ovadas foram analisados por Análise de Variância ($\alpha = 0,05$), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Para o cálculo da concentração de flocculante necessária para induzir a metade da mortalidade máxima (EC50), os dados de concentração de flocculante do experimento 1 foram transformados para \log_{10} . Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 7.

4. Resultados

4.1. Experimento 1

Este experimento teve como objetivo verificar o efeito do flocculante, adicionado diretamente na água, na sobrevivência das larvas de *L. vannamei*. A adição de diferentes concentrações dos flocculantes Tanfloc e Flopam (2,5, 5, 10, 20 mg/L) não teve efeito em nenhum dos parâmetros de qualidade de água, pois não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). No entanto, foi observado efeito significativo ($p < 0,05$) dos flocculantes na sobrevivência das larvas de *L. vannamei* (Tabela 1). O tratamento controle não apresentou mortalidade ao longo do experimento. Da mesma forma, os tratamentos com 2,5 mg/L de flocculante também não apresentaram mortalidade ao longo dos três dias de experimento. Aumentando as concentrações dos flocculantes para 5 mg/L resultou numa mortalidade média de 11,65%. Concentrações superiores a 5 mg/L resultaram em mortalidade total das larvas 48 horas após a adição dos flocculantes.

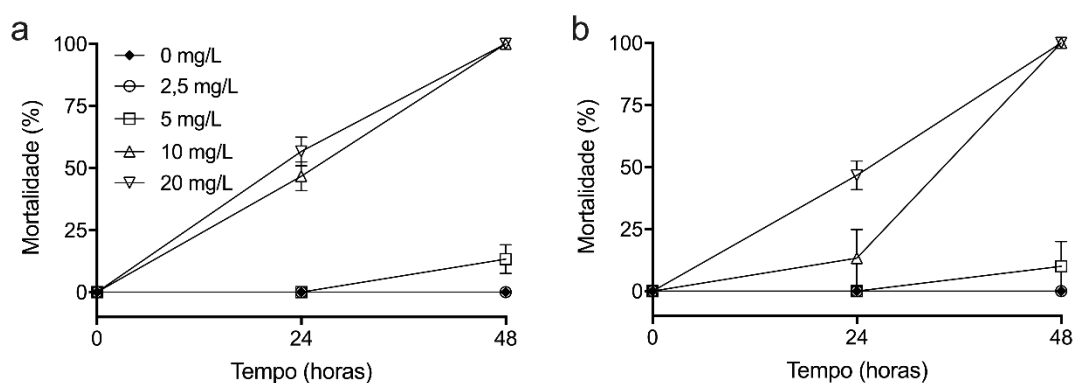


Figura 12: Mortalidade de larvas de *L. vannamei* com adição de diferentes concentrações de Tanfloc (a) e Flopam (b) diretamente na água.

A Figura 13 apresenta os gráficos da concentração de floculante necessária para induzir a metade da mortalidade máxima (EC50). Para ambos os floculantes, a EC50 obtida foi de aproximadamente 5,3 mg/L.

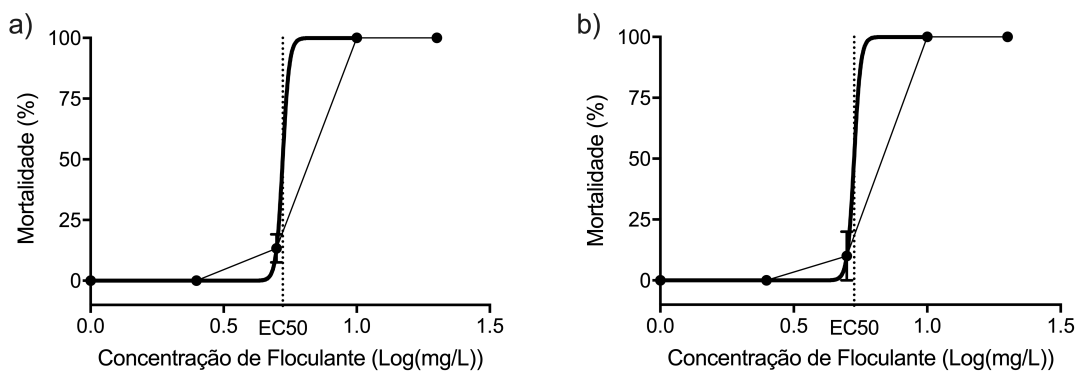


Figura 13: EC50 de Tanfloc (a) e Flopam (b) adicionados diretamente na água.

A análise visual das larvas demonstrou que elas se alimentaram da biomassa centrifugada de *C. muelleri*, pois foi observada a presença de cordões fecais em todos os tratamentos ao longo do experimento (Figura 14).

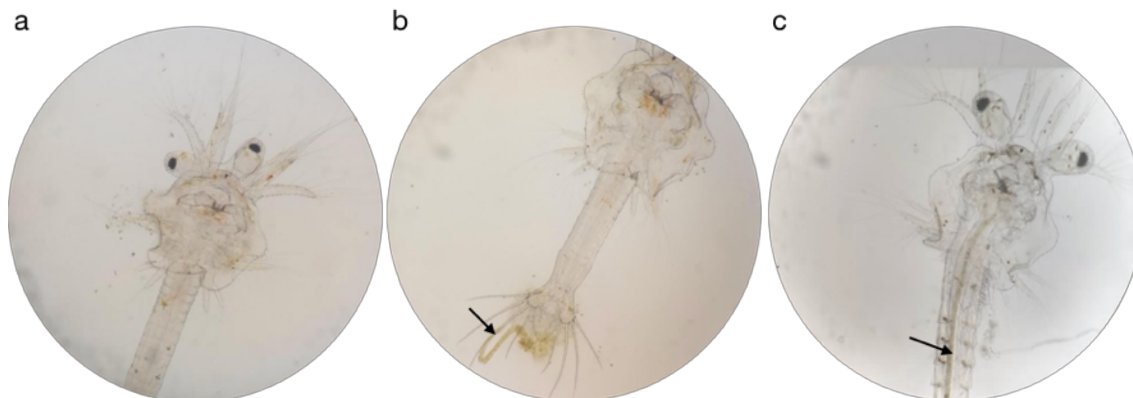


Figura 14: Fotos das larvas de *L. vannamei* observadas no experimento de adição de floculante no cultivo. (a) Controle, (b) Tanfloc e (c) Flopam. As setas indicam a presença de cordão fecal.

Ao contrário da mortalidade, a adição dos floculantes não teve efeito algum nos parâmetros de qualidade de água, pois não foram observadas diferenças significativas (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros de qualidade da água observados no experimento 1. Os dados são correspondentes a média de 3 repetições \pm desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos								
	Controle		Tanfloc			Flopam			
	0 mg/L	2,5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	2,5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,20 \pm 0,18	5,02 \pm 0,10	5,09 \pm 0,20	5,00 \pm 0,10	5,28 \pm 0,41	5,10 \pm 0,25	5,18 \pm 0,43	5,07 \pm 0,30	5,24 \pm 0,36
Temperatura (°C)	31,8 \pm 0,64	31,6 \pm 0,23	31,5 \pm 0,24	31,6 \pm 0,48	31,1 \pm 1,37	32,9 \pm 1,01	32,7 \pm 1,07	32,7 \pm 1,05	31,6 \pm 1,50
pH	8,36 \pm 0,20	8,25 \pm 0,13	8,32 \pm 0,25	8,29 \pm 0,15	8,21 \pm 0,08	8,34 \pm 0,27	8,41 \pm 0,23	8,29 \pm 0,21	8,42 \pm 0,24
Amônia (mg/L)	0,15 \pm 0,21	0,16 \pm 0,23	0,21 \pm 0,32	0,24 \pm 0,35	0,28 \pm 0,42	0,16 \pm 0,23	0,22 \pm 0,32	0,22 \pm 0,31	0,29 \pm 0,43
Nitrito (mg/L)	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01

Parâmetros acima demonstrados não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

4.2. Experimento 2

Este experimento teve como objetivo verificar o efeito dos concentrados por floculação na sobrevivência das larvas de *L. vannamei*. Os resultados obtidos foram semelhantes aos do experimento anterior, com mortalidade total das larvas ao fim do experimento para ambos os floclulantes (Figura 15). O tratamento controle não apresentou mortalidade ao longo do experimento. O concentrado com Flopam foi o que apresentou a maior mortalidade inicial, de cerca de 50% já nas primeiras 48 horas de experimento. Em 72 horas, todas as larvas estavam mortas. O concentrado com Tanfloc, em comparação, apresentou 50% de mortalidade em apenas 96 horas de experimento, atingindo 100% de mortalidade em 120 horas.

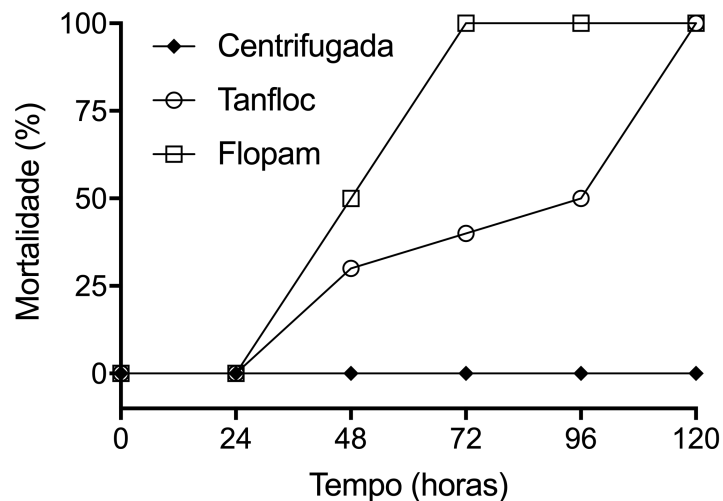


Figura 15: Mortalidade de larvas de *L. vannamei* alimentadas com biomassa de *C. muelleri* concentrada por centrifugação (Controle) e por floculação com Tanfloc e Flopam.

A Figura 16 apresenta fotos das larvas nos diferentes tratamentos. Pode-se observar a presença de cordões fecais nos tratamentos com microalgas flocluladas (Tanfloc e Flopam), demonstrando que houve consumo da biomassa. Também pode-se observar a presença de flocos aderidos na superfície das larvas, principalmente no tratamento com Flopam.

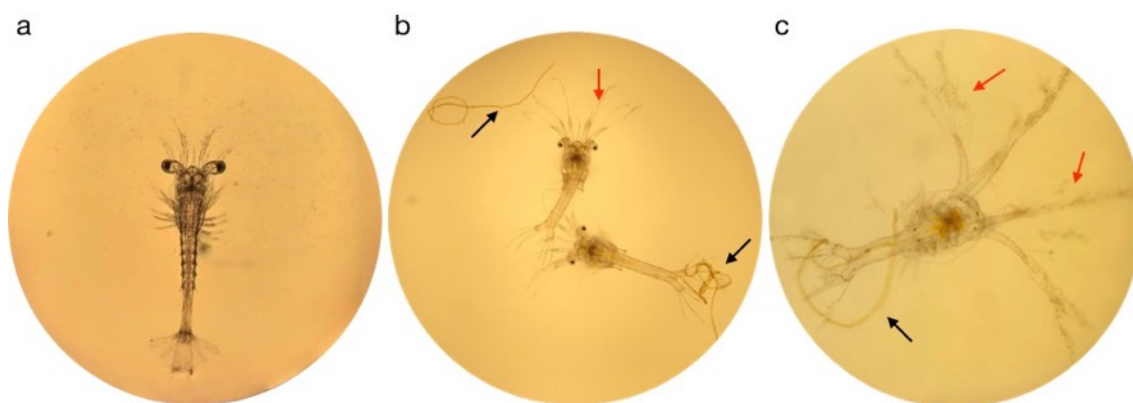


Figura 16: Fotos das larvas de *L. vannamei* observadas no experimento de alimentação. (a) Controle, (b) Tanfloc e (c) Flopam. As setas pretas indicam a presença de cordão fecal e as vermelhas indicam os aglomerados de células no corpo das larvas.

Como no experimento anterior, a adição dos concentrados não teve efeito nos parâmetros de qualidade de água, pois não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros de qualidade da água observadas no experimento 2. Os dados são correspondentes a média de 5 repetições \pm desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos		
	Controle	Tanfloc	Flopam
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,08 \pm 0,19	5,12 \pm 0,29	5,03 \pm 0,17
Temperatura (°C)	32,00 \pm 1,03	31,70 \pm 1,31	32,20 \pm 0,95
pH	8,34 \pm 0,03	8,34 \pm 0,05	8,35 \pm 0,04
Salinidade	32,83 \pm 0,03	33,6 \pm 1,84	34,0 \pm 1,74
Amônia (mg/L)	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
Nitrito (mg/L)	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01

Parâmetros acima demonstrados não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

4.3. Experimento 3

Este experimento teve como objetivo verificar o efeito dos concentrados por floculação na densidade de rotíferos e na porcentagem de fêmeas ovadas. A densidade variou significativamente ($p < 0,5$) entre os tratamentos (Figura 17a). O tratamento

controle (biomassa centrifugada) apresentou a maior densidade, com uma média de 273/mL. O tratamento Tanfloc apresentou uma densidade inferior (120/mL) ao controle, porém maior que o tratamento Flopam (42/mL). Os rotíferos mantidos em jejum apresentaram a mesma densidade do tratamento Flopam (42/mL). A porcentagem de fêmeas ovadas (Figura 17b) apresentou o mesmo comportamento da densidade, com o controle apresentando médias maiores (48%). O tratamento com Tanfloc apresentou uma porcentagem inferior de fêmeas ovadas (24%). Tanto o tratamento Flopam quanto o Jejum apresentaram as menores porcentagens (4,5%).

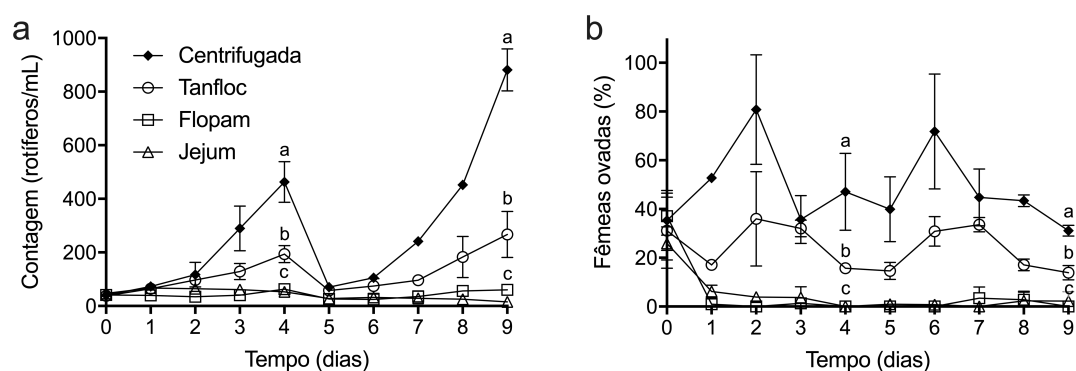


Figura 17: Efeitos dos flocculantes Tanfloc e Flopam na densidade de rotíferos (a) e na porcentagem de fêmeas ovadas (b). Os tratamentos Centrifugado e Jejum foram empregados como controle positivo e negativo, respectivamente. Sobrescritos diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Referente aos parâmetros de qualidade de água, a adição dos concentrados de Tanfloc e Flopam teve efeito significativo ($p < 0,5$) apenas nas concentrações de amônia e de nitrito, que foram menores em comparação com o tratamento controle (Tabela 3). O tratamento jejum também apresentou concentrações menores de amônia e nitrito. Quanto aos demais parâmetros, não houveram diferenças entre os tratamentos.

Tabela 3: Parâmetros de qualidade da água observados no experimento 3. Os dados são correspondentes a média de 3 repetições \pm desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	Tanfloc	Flopam	Jejum
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,54 \pm 0,44 ^a	6,63 \pm 0,37 ^a	6,71 \pm 0,34 ^a	6,73 \pm 0,28 ^a
Temperatura (°C)	25,7 \pm 0,33 ^a	25,7 \pm 0,30 ^a	25,7 \pm 0,30 ^a	25,7 \pm 0,27 ^a
pH	7,46 \pm 0,47 ^a	7,50 \pm 0,48 ^a	7,51 \pm 0,46 ^a	7,48 \pm 0,41 ^a
Amônia (mg/L)	4,26 \pm 5,77 ^a	0,54 \pm 0,60 ^b	0,35 \pm 0,41 ^b	0,21 \pm 0,24 ^b
Nitrito (mg/L)	0,03 \pm 0,04 ^a	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b

Parâmetros com sobrescritos diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

5. Discussão

5.1. Efeito dos floclantes nas larvas de *L. vannamei*

Os experimentos 1 e 2 demonstraram de formas diferentes que os floclantes possuem efeito deletério na sobrevivência de larvas de *L. vannamei*. No experimento 1 os floclantes foram adicionados diretamente na água, sendo observada a mortalidade total das larvas em quarenta e oito horas para as maiores concentrações de ambos os floclantes (10 e 20 mg/L). Ao contrário, no tratamento onde não houve adição de floclantes (Controle) a sobrevivência foi de 100%. Este resultado demonstra que as condições de cultivo não foram estressantes para as larvas, pois os parâmetros de qualidade de água estavam dentro da faixa considerada ideal para a espécie (Tabela 4). Além do mais, foi observado em todos os tratamentos que as larvas se alimentaram da biomassa centrifugada, demonstrado pela presença de cordões fecais. De acordo com os resultados obtidos, a concentração de 2,5 mg/L não resultou na mortalidade das larvas. Este resultado é interessante pois, na prática, não se espera observar concentrações tão altas de floclante na água. A concentração ótima de floclante necessário para concentrar *C. muelleri* foi de 5 mg/L, tanto para Tanfloc quanto para Flopam. Como o floclante fica fortemente adsorvido nas microalgas, espera-se que a concentração na água seja bem inferior, porém estudos futuros deverão confirmar esta hipótese.

Tabela 4: Níveis recomendados dos parâmetros de qualidade de água para larvas do camarão *L. vannamei* de acordo com Boyd (1989, 2003).

Parâmetros	Faixa ideal
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,0 – 9,0
Temperatura (°C)	28 – 32
pH	7,0 – 8,3
Salinidade	25 – 35
Amônia (mg/L)	< 1,0
Nitrito (mg/L)	15 – 25

De acordo com o fabricante, Tanac S.A., o Tanfloc é um extrato aquoso da casca da Acácia-Negra, com a adição de amina e aldeído para conferir carga positiva. A ficha de segurança do produto informa que a EC50, em 48 horas, é de 12 mg/L para a microalga *Scenedesmus subspicatus*. O fabricante não informa se o floculante persiste no ambiente ou se possui potencial de bioacumulação. Quanto ao Flopam, a SNF Floerger informa que se trata de um copolímero de acrilamida e cloreto de acrilóil-oxietil-trimetilamônio, dois componentes que possuem toxicidade. A EC50 para *Scenedesmus subspicatus* é de 48 mg/L para o ácido aminosulfônico, não havendo informação para o metacrilato de cloreto de trimetilamônio de etila. A EC50 obtida no experimento 1 foi de 5,3 mg/L, consideravelmente inferior às informadas pelos fabricantes. Ainda de acordo com o fabricante, Flopam é facilmente biodegradável em pH natural (>6), levando 28 dias para se hidrolisar em 70%. O produto da hidrólise não é considerado prejudicial aos organismos aquáticos. Quanto ao potencial de bioacumulação, o fabricante apenas informa que não é esperado. Apesar das informações dos fabricantes, os resultados do experimento 1 demonstram haver uma toxicidade química dos floculantes nas larvas de *L. vannamei*.

No experimento 2, os floculantes foram adicionados na biomassa, que então foi ofertada como alimento às larvas de *L. vannamei*. Os resultados deste experimento foram semelhantes aos do experimento anterior, com mortalidade total das larvas exceto no controle. Porém, contrário ao experimento anterior, as larvas sobreviveram por mais tempo. Este resultado sugere que a quantidade de floculante dissolvido na água foi

potencialmente inferior, sugerindo que a hipótese levantada no experimento anterior possa estar certa. No presente experimento, as larvas entraram em contato com o floculante apenas quando se alimentaram da biomassa. Novamente, a observação de cordões fecais demonstrou que as larvas efetivamente consumiram a biomassa (Figura 16). Porém, diferente do experimento 1, foram observados agregados de microalgas (flocos) aderidos nas superfícies das larvas (Figura 16). É possível supor que a mortalidade observada neste experimento seja devida a uma toxicidade física, pois as larvas com flocos aderidos podem ter tido um gasto energético maior para se manterem em suspensão na coluna d'água. Em relação à qualidade de água, os valores observados ficaram dentro da faixa considerada ideal para a espécie (Tabela 4).

Em ambos os experimentos, o uso de biomassa centrifugada não afetou negativamente a sobrevivência das larvas, corroborando estudos anteriores que usaram concentrados de microalgas produzidos por centrifugação na alimentação de larvas de camarão (Heasman et al. 2000, Robert et al. 2001). Diferentemente de resultados encontrados por Millamena et al. (1990), que alimentaram *Penaeus monodon* com biomassa floculada com sulfato de alumínio e posteriormente seca ao sol como meio de conservação da biomassa, e um tratamento controle com o uso do cultivo fresco, sem o floculante. Foram utilizadas as seguintes microalgas, duas diatomáceas, *Chaetoceros calcitrans* e *Skeletonema costatum*, e duas flageladas: *Tetraselmis chui* e *Isochrysis galbana*. Utilizando as concentrações de floculantes de 0, 10, 50, 100 e 200 mg/L. A melhor taxa de sobrevivência foi atingida com biomassa de *Chaetoceros* seca (68%), seguido por *Tetraselmis* seca (44%) que era comparável com o controle. D'Souza et al. (2002), utilizando como agente floculante uma solução de polieletrólito a base de poliacrilamida, na dieta floculada concentrada de quatro espécies de microalgas, *Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans*, *Skeletonema* sp. e *Thalassiosira pseudonana*, como alimento para as larvas de *Penaeus monodon*, comparando-as com suas culturas frescas. O tratamento com uso de *C. muelleri* promoveu maior sobrevivência, maior ganho de peso e desenvolvimento mais rápido para misis 1. Larvas alimentadas com esta dieta foram duas vezes mais pesadas do que as alimentadas com a maioria das outras dietas. Os tratamentos floculados de *C. muelleri* ou *T. pseudonana* promoveram taxas de sobrevivência similares às de larvas alimentadas com *C. muelleri*, embora as taxas de desenvolvimento tenham sido mais lentas. Larvas alimentadas com *C. calcitrans* frescas

tiveram alta sobrevivência (>99%) e desenvolvimento intermediário, mas aquelas alimentadas com o concentrado floculado, obtiveram sobrevivência de menos de 17% e desenvolvimento muito ruins, vindo de acordo com nosso trabalho. A espécie *Skeletonema* sp. seja na forma fresca ou concentrada, foi uma dieta pobre para larvas de camarão, resultou em alta mortalidade e desenvolvimento lento. Concentrados de algas floculadas são promissores como substitutos de algas frescas. Beim e Beim (1994) compararam floculantes comerciais a base de acrilamida em adultos do peixe de água doce *Phoxinus phoxinus*. Os autores observaram alterações do epitélio das brânquias e células do fígado e do rim. Também foi observada a adsorção do floculante na superfície do corpo seguido por aumento mucificação. Os autores concluíram que o mecanismo de ação dos floculantes é membranotrópico. É possível que o mecanismo de ação dos floculantes Tanfloc e Flopam seja semelhante ao observado por Beim e Beim (1994).

Este estudo demonstrou que o uso dos floculantes Tanfloc e Flopam para a produção de concentrados da microalga *C. muelleri* não são seguros para larvas de *L. vannamei*, pois podem acarretar tanto em toxicidade química quanto física. No entanto, aconselha-se que trabalhos futuros avaliem quais os efeitos adversos provocados nas larvas de *L. vannamei*.

5.2. Efeito dos floculantes nos rotíferos *B. plicatilis*

O experimento 3 demonstrou que os floculantes Tanfloc e Flopam possuem efeitos deletérios no crescimento e na reprodução de rotíferos *B. plicatilis*. Os rotíferos foram alimentados com a microalga *N. oceanica* durante dois ciclos de produção. Os melhores resultados foram obtidos para o tratamento com biomassa centrifugada (controle positivo), sendo esta a forma de coleta mais citada na literatura (Mccausland et al., 1999; Robert et al., 2001). Ao comparar a densidade máxima de rotíferos obtida com o concentrado de microalga centrifugada, observa-se que a densidade deste trabalho (881 rotíferos/mL) foi superior à relatada por Guevara et al. (2011) que utilizaram *Rhodomonas salina* na alimentação de *B. plicatilis*, obtendo uma concentração de 316 rotíferos/mL. Contrariamente, o tratamento em jejum apresentou o pior resultado de crescimento, com uma média de apenas 42 rotíferos/mL. Curiosamente, o tratamento com Flopam não apresentou diferença estatística com o jejum. O tratamento com Tanfloc apresentou resultados intermediários, mas bem abaixo do concentrado por centrifugação.

Guevara et al. (2011) alimentaram rotíferos com diferentes concentrados da microalga *Rhodomonas salina*, um tratamento centrifugado, um tratamento floculado com quitosana e um tratamento com cultura fresca. Os autores obtiveram como resultado que o tratamento centrifugado foi superior ao tratamento floculado, apresentando uma densidade populacional de 315,7 rotíferos/ml enquanto no tratamento floculado foram encontrados 212,4 rotíferos/ml.

No tratamento com biomassa centrifugada, foram observados picos nas concentrações de amônia e nitrito a partir do segundo dia, em ambos os ciclos de cultivo. Este aumento significativo da concentração destes dois compostos pode ser explicado pelo alto crescimento populacional observado neste tratamento. Da mesma forma, a ausência de amônia e nitrito nos tratamentos com Tanfloc, Flopam e jejum é devida ao baixo crescimento populacional. Os valores observados estão dentro dos limites recomendados para a espécie, que é até 1mg/L de amônia gasosa e 10 mg/L de nitrito Perumal (et al. 2015).

Tabela 5: Níveis recomendados dos parâmetros de qualidade de água para rotíferos *Brachionus plicatilis* de acordo com Perumal (et al. 2015)

Parâmetros	Faixa ideal
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,0 – 8,0
Temperatura (°C)	15 – 25
pH	7,1 – 7,5
Salinidade	25 – 35
Amônia (mg/L)	< 1,0
Nitrito (mg/L)	6 – 10

Neste experimento ficou claro que a utilização de floculantes catiônicos para a obtenção de biomassa para alimentação dos rotíferos não teve sucesso, pois tanto a densidade quanto a porcentagem de fêmeas ovadas apresentaram resultados significativamente inferiores. No caso de Flopam, especificamente, não houve diferença com o tratamento em jejum. Estes resultados podem ser devido à toxicidade química dos floculantes para *B. plicatilis*. Pereira et al. (2018) testaram cinco floculantes catiônicos a

base de poliacrilamida, de diferentes características (como densidade de carga e peso molecular) e observaram toxicidade para *D. magna* em todos. Beim e Beim (1994) também comparam flocculantes comerciais a base de acrilamida, mas de diferentes cargas elétricas (catiônicos, aniônicos e não iônico) e observaram seus efeitos na pulga d'água *Daphnia magna*. Os autores não observaram efeitos dos flocculantes na qualidade de água (oxigênio dissolvido, carbono orgânico dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio e pH), mas observaram efeitos de curto e longo prazo em *D. magna*. Além disto, os autores observaram que os flocculantes catiônicos tiveram maior a toxicidade, tanto em curto como a longo prazo. Kleinow (1986) estudou o efeito da toxicidade da acrilamida em *B. plicatilis*, observando que o mecanismo de ação é no bloqueio da atividade neuromuscular. De acordo com Letterman e Pero (1990), a acrilamida apresenta atividade neurotóxica e que pode acumular no organismo se continuamente ingerida. Como a taxa de alimentação dos rotíferos é muito elevada, é possível que a acrilamida presente na biomassa oferecida como alimento tenha se acumulado no organismo, resultando em efeitos neurotóxicos. Curiosamente, Sales et al. (2016) cultivaram juvenis do Cavalo-Marinho *Hippocampus reidi* por 15 dias com biomassa de *N. oculata* flocculada com Flopam, obtendo uma sobrevivência de 55%. No entanto, além da biomassa flocculada, também foram adicionados outros alimentos vivos para *H. reidi*, como os crustáceos *Tisbe biminiensis* e *Artemia salina*, o que pode ter contribuído para a maior sobrevivência observada.

Infelizmente a literatura sobre a toxicidade de taninos em organismos aquáticos é escassa. De acordo com Kegley et al. (2010) a EC50 de taninos para *D. magna* é de 26 mg/L enquanto que a ficha de segurança do Tanfloc informa ser de 13,2 mg/L. Quanto ao Flopam, a EC50 do metacrilato de cloreto de trimetilamônio de etila e o ácido aminosulfônico é 20 – 50 mg/L e 71,6 mg/L, respectivamente. Yamasaki et al. (2002) estudaram o efeito de taninos no crustáceo *A. salina*, observando decomposição das paredes do intestino e das gônadas. Quando analisamos o percentual de fêmeas ovadas no experimento 3, podemos observar que o tratamento controle apresentou os maiores valores. Segundo Dhert (2001), o *B. plicatilis* é uma espécie que apresenta um ciclo de vida curto com duração de 3 a 4 dias, atingindo o estado adulto aos em 24 horas (Ferreira, 2009). O sucesso reprodutivo das fêmeas está relacionado com a qualidade do alimento

que consomem, desta forma, além dos concentrados flocculados interferirem no crescimento dos adultos, também interferem na geração de novos indivíduos.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os flocculantes Tanfloc e Flopam não são adequados para a produção de concentrados de microalgas para uso como alimento, tanto para larvas do camarão *L. vannamei* quanto para os rotíferos *B. plicatilis*. Os concentrados produzidos resultaram em altas mortalidades para *L. vannamei* e redução do crescimento e da reprodução de *B. plicatilis*.

7. Referências Bibliográficas

- ABCC. 2012. Boas práticas de manejo e biossegurança para a Carcinicultura marinha nacional.
- BEIM, A. A.; BEIM, A. M. 1994. Comparative ecological – Toxicological data on determination of maximum permissible concentrations (MPC) for several flocculants. *Environmental Technology*, Vol. 15. pp 195-198.
- BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY, S. B. I. 2011. Green algae *Chlorococcum humicola*- a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. 11-17.
- BOLTO, B.; GREGORY, J. 2007. Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Research*, 41, 2301.
- BOYD, CE. 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and allied aquacultures department. Serie n. 2. Alabama Exp. Station. Auburn University, AL. February, p. 83.
- BOYD, C. E. 2003. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. In: HAWS, M. C.; BOYD, C. E. (Eds.). Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. Managua: Imprenta UCA, p. 1-30.
- BRASIL. Portaria nº1469 de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

- CAHU, C. 2001. Nutrition and feeding of peaneid prawn larvae. In: Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans (Ed. by J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot & R. Métailler), pp. 253–262. Springer Parxis, Heidelberg.
- DHERT, P. 1996. Rotífers in: Lavens P, Sorgeloos P (eds). Manual on the production and use of live food for aquaculture. (FAO technical paper). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp 61-98.
- DHERT, P.; ROMBAUT, G.; SUANTIKA, G.; SORGeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200, 129–146.
- D’SOUZA, F. M. L.; KNUCKEY, R. M.; HOHMANN, S.; PENDREY, R. C. 2002. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture Nutrition*, v 8, 113-120.
- FAO. 2016. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO, 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016, Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma.
- FAROOQ, W.; MOON, M.; RYU, B. GON.; SUH, W.I.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M.S.; MISHRA, S.K.; YANG, J.W. 2015. Effect of harvesting methods on the reusability of water for cultivation of *Chlorella vulgaris*, its lipid productivity and biodiesel quality. *Algal Research*. 8, 1–7.
- FERREIRA, P. 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. IPIMAR.
- GAO, W.; TIAN, L.; HUANG, T.; YAO, M.; HU, W.; XU, Q. 2016. Effect of salinity on the growth performance, osmolarity and metabolism-related gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, v. 4, p. 125-129, 11.
- GUILLARD, R. R. L. 1975. Cultura do fitoplâncton para alimentação de invertebrados marinhos. In: Smith, ML e Chanley, MH, Eds., *Cultura de Animais Invertebrados*
- GREENWELL, H.C.; LAURENS, L.M.L.; SHIELDS, R.J.; LOVITT, R.W.; FLYNN, K.J. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges, *Journal of the Royal Society Interface*. 7, 703–726.
- GREGORY, J. 2013. Flocculation Fundamentals, in: *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 459–491.

- GRIMA E.M.; BELARBI E.H.; FERNANDEZ F.G.A.; MEDINA A.R.; CHISTI Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.* 20 (7-8):491-515.
- GUEVARA, M.; BASTARDO, L.; CORTEZ, R.; ARREDONDO-VEJA, B.; ROMERO, L.; GÓMEZ, P. 2011. Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Rev. Biol. Trop.* Vol. 59 (4): 1503-1515.
- HEASMAN, M.; DIEMAR, J.; O'CONNOR, W.; SUSHAMES, T.; FOULKES, L. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. *Aquaculture Research*, v. 31, p. 637- 659.
- JAIME-CEBALLOS, B. J.; HERNÁNDEZ-LLAMAS, A.; GARCIA-GALANO, T.; VILLARREAL, H. 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v 260, 215-220.
- KEGLEY, S. E.; HILL, B. R.; ORME, S.; CHOI, A. H. 2010. Pan Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, ca), <http://www.pesticideinfor.org>.
- KLEINOW, W. 1986. Effects of acrylamide on *Brachionus Plicatilis* (Rotifera). *Camp. Biochem. Physiol.* Vol. 84C, No. 2, pp. 243-246.
- KÖNIG, R.B.; SALES, R.; ROSELET, F.; ABREU, P.C. 2014. Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants. *Biomass and Bioenergy* 68, 1–6.
- LETTERMAN, R. D.; PERO, R. W. 1990. Contaminants in Polyelectrolytes used in Water Treatment. RESEARCH AND TECHNOLOGY AN American Water Works Association.
- LU, L.; PAN, Z.; HAO, N.; PENG, W. 2014. A novel acrylamide-free flocculant and its application for sludge dewatering. *Water Research.* 57, 304- 312.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217-232. ISSN 1364-0321.
- McCAUSLAND, M. A.; BROWN, M. R.; BARRETT, S. M.; DIEMA, J. A.; HEASMAN, M. P. 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as

- supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, v. 174, p. 323-342.
- MILLAMENA, O. M.; AUJERO, E. J.; BORLONGAN, I. G. 1990 Techniques on algae harvesting and preservation for use in culture and as larval food. *Aquacultural Eng.*, v 9, 295-304.
- MULLER-FUEGA, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12:527-534.
- NERI, V. C. DE C. 2004. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz.
- OBÓN-SANTACANA, M.; LUJAN-BARROSO, L.; TRAVIS, R. C.; FREISLING, H.; FERRARI, P.; SEVERI, G.; BAGLIETTO, L.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; FORTNER, R. T.; OSE, J.; BOEING, H.; MENÉNDEZ, V.; SÁNCHEZ-CANTALEJO, E.; CHAMOSA, S.; CASTAÑO, J. M.; ARDANAZ, E.; KHAW, K. T.; WAREHAM, N.; MERRITT M. A.; GUNTER, M. J. TRICHOPOULOU, A.; PAPATESTA, E. M.; KLINAKI, E.; SAIÉVA, C.; TAGLIABUE, G.; TUMINO, R.; SACERDOTE, C.; MATTIELLO, A.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; PEETERS, P. H.; ONLAND-MORET, N. C.; IDAHL A, LUNDIN, E.; WEIDERPASS, E.; VESPER, H. W.; RIBOLI, E.; DUELL, E. J. 2015. Acrylamide and Glycidamide Hemoglobin Adducts and Epithelial Ovarian Cancer: A Nested Case-Control Study in Nonsmoking Postmenopausal Women from the EPIC Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Jan;25(1):127-34.
- OLIVEIRA, C. A.; CAMPOS, A. A. O.; RIBEIRO, S. M. R.; OLIVEIRA, W. C.; NASCIMENTO, A. G. 2013. Nutritional, functional and therapeutic potential of cyanobacterium *Spirulina*. *Revista da Associação Brasileira de Nutrição*. São Paulo, SP, Ano 5, n. 1, p. 52-59.
- PEREIRA, J. L.; VIDAL, T.; GONÇALVES, F. F. J M.; GABRIEL, R. G.; COSTA, R.; RASTEIRO, M. G. 2018. Is the aquatic toxicity of cationic polyelectrolytes predictable from selected physical properties? *Chemosphere* 202 (2018) 145 – 153.
- PERUMAL, S.; THIRUNAVUKKARASU, A. R.; PACHIAPPAN, P. 2015. *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*. Springer India 2015
- POUSÃO-FERREIRA, P., 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. *Ipimar*. ISSN: 1647-1504 35-163p.

- ROBERT, R.; PARISI G.; RODOLFI L.; POLI B. M.; TREDICI M. R. 2001. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*. v.192, 333-346.
- RAWAT, I.; Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy* 103, 444–467.
- RONQUILLO, J. D.; FRASER, J.; MCCONKEY, A. J. 2012. Effect of mixed microalgal diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 360-361, p. 64-68.
- ROSELET, F.; VANDAMME, D.; ROSELET, M.; MUYLAERT, K.; ABREU, P.C.; 2015. Screening of commercial natural and synthetic cationic polymers for flocculation of freshwater and marine microalgae and effects of molecular weight and charge density. *Algal Research*. 10, 183–188.
- ROSELET, F.; BURKERT, J.; ABREU, P.C.; 2016. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot scale reproducibility. *Biomass and Bioenergy* 87, 55–60
- ROSELET, F.; VANDAMME, D.; ROSELET, M.; MUYLAERT, K.; ABREU, P.C., 2017. Effects of pH, salinity, biomass concentration, and algal organic matter on flocculant efficiency of synthetic versus natural polymers for harvesting microalgae biomass. *BioEnergy Research* 10, 427–437.
- SALES, R.; ABREU, P.C. 2014. Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175, 2012–2019.
- SALES, R.; MÉLO, R. C. S.; JUNIOR, R. M. M.; SILVA, R. C. S.; CAVALLI, R. O.; NAVARRO, D. M. A. F.; SANTOS, L. P. S. 2016. Production and use of a flocculated paste of *Nannochloropsis oculata* for rearing newborn seahorse *Hippocampus reidi*. *Algal Research* 17 (2016) 142–149.
- SNF DO BRASIL. Ficha de informações de segurança de produto químico – FLOPAM™ FO 4990 SH. 2018.
- TANAC. Ficha de informações de segurança de produto químico – TANFLOC SG™. 2018.

- UN, 2017. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2017. World Population Prospects: 2017 – Data Booklet (ST/ESA/SER.A/401).
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission.
- VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. Trends in Biotechnology. 31, 233–239.
- YAMASAKI, T.; SATO, M.; MORI, T.; MOHAMED, A. S. A.; FUJII, K.; TSUKIOKA, J. 2002. Toxicity of tannins towards the free-Living Nematode *Caenorhabditis elegans* and the brine shrimp *Artemia salina*. Journal of Natural Toxins, volume 11, number 3.
- ZHOU, J.; WANG, W.N.; WANG, A.L.; HE, W.Y; ZHOU, Q.T.; LIU, Y.; XU, J. 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 150, 224–230.