



**Efeito dos modos de preservação da microalga
Rhodomonas baltica (Karsten, 1898) no cultivo do
copépode *Acartia tonsa* (Dana, 1849)**

Henrique José Jesus Pinto

[2018]

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



**Efeito dos modos de preservação da microalga
Rhodomonas baltica (Karsten, 1898) no cultivo do
copépode *Acartia tonsa* (Dana, 1849)**

Henrique José Jesus Pinto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Professor Doutor Sérgio Miguel Martins Leandro Franco e coorientação da Professora Doutora Sónia Cotrim Marques

[2018]

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Título: Efeito dos modos de preservação da microalga *Rhodomonas baltica* (Karsten, 1898) no cultivo do copépode *Acartia tonsa* (Dana, 1849)

Copyright © Henrique José Jesus Pinto

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2018

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Agradecimentos

Quero desde já agradecer a todos os que se cruzaram comigo nesta importante jornada, proporcionando a sua conclusão com sucesso. Um especial obrigado,

- Ao orientador Professor Doutor Sérgio Leandro, por todos os conselhos, oportunidades e ensinamentos. Um muito obrigado!

- À coorientadora Professora Doutora Sónia Cotrim, pela ajuda diária e por todos os conselhos que sem dúvida foram essenciais na concretização deste trabalho!

- À empresa PenWave, empresa que se dedica à produção de microalgas e copépodes e ao João Carneiro, pela disponibilidade, ensinamento e preciosas dicas no cultivo das microalgas;

- À Marta Neves e à Alina Sousa pela preciosíssima ajuda na parte da bioquímica. Um grande obrigado!

- À Joana Falcão, pela alegria diária e pela grande ajuda na identificação de fases de copépodes!

- À casa mais louca de Peniche! Simão Maia e João Reis, um grande obrigado pela vossa amizade, companheirismo e pela vossa energia!

- Ao resto da Equipa de Investigação SL, Daniel Marques, Joana Figueira, Inês Duarte e Estevão, um muito obrigado pela troca de conhecimentos ao longo deste percurso;

- À Beatriz Trindade e Andreia Raposo, por todos os conselhos e pela vossa amizade e boa disposição contínua!

- À Ana Torres e à Ana Rita Ferreira pela amizade e por todo o apoio que demonstraram neste percurso!

- A toda a equipa CETEMARES, um grande obrigado pela vossa disponibilidade sempre que precisava;

- À minha família académica pelas amizades construídas ao longo deste percurso e que se prolongue durante longos anos!

- Aos meus parceiros de dança TOP, por todas as danças, boa disposição e amizade!

- E por último, aos melhores, Pai, Mãe, Irmã e Avós, que estiveram sempre ao meu lado ao longo deste percurso. Sem eles nada disto seria concretizável!

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Resumo

A alimentação em maternidades de aquacultura para primeiros estádios de vida das larvas marinhas ainda depende de alimento vivo (fitoplâncton e zooplâncton). As microalgas são utilizadas não só como fonte direta de alimento para diversas fases larvares marinhas, como também na produção de zooplâncton, como por exemplo, rotíferos, artémia e copépodes que posteriormente são fornecidos a larvas. Tradicionalmente, a artémia e os rotíferos são usados como alimento vivo contudo, não possuem um perfil nutricional ótimo como alimento para larvas de peixes sendo assim necessário o seu enriquecimento com ácidos gordos. Uma possível solução é a utilização de copépodes, por exemplo *Acartia tonsa*, organismos que são a principal fonte de alimento natural de larvas de peixe, sendo um alimento rico em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e de fácil cultivo em aquacultura. Dentro das espécies de microalgas usualmente utilizadas como alimento no cultivo de copépodes, *Rhodomonas* spp. é referida essencial como alimento para espécies de *Acartia*. Contudo, o cultivo desta microalga pode ser problemático devido à sua instabilidade, estando propensa à morte repentina da mesma, levando a prejuízos para as instalações. Assim sendo, é necessário encontrar alternativas ao modo de preservação desta microalga, de fácil administração e longo armazenamento, levando assim à simplificação e melhoramento dos protocolos de alimentação nos cultivos de copépodes. Assim sendo, o presente estudo caracterizou-se pela observação do efeito do modo de preservação da microalga *Rhodomonas baltica* - viva, congelada e liofilizada, na taxa de eclosão de ovos, crescimento, sobrevivência, desenvolvimento das fases do ciclo de vida e na produção de ovos em copépodes calanóides *A. tonsa*, sendo também analisado o perfil bioquímico (ácidos gordos e lípidos totais) das três diferentes dietas. Observou-se assim que a microalga viva leva a melhores efeitos na taxa de eclosão, sobrevivência, desenvolvimento, biomassa total e produção de ovos, quando comparado com as dietas com microalga congelada e liofilizada, podendo assim afirmar que é essencial efetuar cultivos de microalga viva, *Rhodomonas* sp., paralelos ao cultivo de copépodes. Contudo, observou-se um maior número na percentagem de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) da microalga *R. baltica*, no estado liofilizado, levando assim a uma potencial utilização para o sucesso dos processos produtivos em maternidades de bivalves e de peixes que mantenham o cultivo de alimento vivo, mais propriamente de rotíferos.

Palavras-chave: Copépode; *Acartia tonsa*, *Rhodomonas baltica*, Modos de preservação, Ciclo de vida

Abstract

Feeding in aquaculture hatcheries for the first life stages of larvae still depends on live food, phytoplankton and zooplankton. Microalgae are used as a direct food source for the various larval stages, as well as in the production of zooplankton, such as rotifers, artemia and copepods, which are supplied for larvae. Traditionally artemia and rotifers are used as live food, however they don't possess an optimal nutritional profile as food for fish larvae being thus necessary their enrichment in fatty acids. A possible solution is in fact the use of copepods, for example, *Acartia tonsa*, organisms that are the main source of natural food for many fish larvae, being an organism rich in polyunsaturated fats (PUFA) and easy to grow in aquaculture. Within the species of microalgae used as a diet in copepods, *Rhodomonas* spp. is presented as an essential food for the species of *Acartia*. However, the culture of this microalga can be problematic due to its instability being prone to sudden death of it, leading to losses to the facility. Thus, it is crucial to find alternatives to the preservation mode of this microalga, of easy administration and long storage, thus leading to the simplification and improvement of feeding protocols in copepod cultures. Therefore, the present study was characterized by the observation of the effect of the preservation mode of *Rhodomonas baltica* – live, frozen and freeze-dried on egg hatching rate, growth, survival, life cycle stages development and production of eggs in calanoid copepods *A. tonsa*, and also the biochemical profile of the fatty acids of the three diets. It was observed that live microalgae lead to better effects on the hatching rate, survival, development, total biomass and egg production, when compared to the diets with frozen and freeze-dried microalgae, thus being able to affirm that it is essential to produce live microalgae, *Rhodomonas* sp., parallel to the copepod culture. However, it was observed an increase in the percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the microalga *R. baltica* in the freeze-dried form, thus leading to a potential of use for the success of the productive processes in bivalve and fish hatcheries that maintain the culture of live food, more properly rotifers.

Keywords: Copepods, *Acartia tonsa*, *Rhodomonas baltica*, Preservation mode, Life cycle

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Lista de figuras

Figura 1 - Representação esquemática das capturas mundiais da pesca e da produção em aquacultura; Fonte: FAO, 2016	1
Figura 2 - Produção em aquacultura em Portugal de 2015 a 2016, demonstrando a quantidade e o valor correspondido; Fonte: INE & DGRM, 2018.....	2
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida dos copépodes; Fonte: Adaptado de Pompei [24 de Setembro 2018].....	7
Figura 4 - Representação da diferenciação sexual em <i>Acartia</i> ; Fonte: Murphy & Cohen, 1978.....	8
Figura 5 – Organismos adultos (1- macho e 2- fêmea) de <i>Acartia tonsa</i>	9
Figura 6 - Cultivo de microalgas; A) e B) Cultivo de <i>Rhodomonas baltica</i> em balões de menor volume (500mL, 1000mL e 2000mL) e em Carboys de 9000mL; C) Diversas soluções para elaboração do meio F/2 modificado.....	13
Figura 7 - Mapa do Estuário do Mondego, demonstrando a localização da estação de amostragem (C1)	14
Figura 8 - Ilustração figurativa do desenho experimental do ensaio: A) Sistema de Recirculação de água; B) Presença do arejamento nos copos que continham <i>Acartia tonsa</i>	15
Figura 9 - Ilustração figurativa do desenho experimental do ensaio ao longo do tempo; Legenda: ○ - Copos em ensaio; ● - Copos retirados para amostragem	16
Figura 10 - Microfotografias efetuadas dos organismos <i>Acartia tonsa</i> em diferentes fases do ciclo de vida no microscópio invertido a uma ampliação de 10x (imagens superiores) e 20x (imagens inferiores); A) Náuplio; B) Copépodito; C) Adulto Fêmea; D) Adulto Macho.....	18
Figura 11 – A) Crescimento da microalga <i>Rhodomonas baltica</i> (número de células por mililitro ao longo do tempo de cultivo); B) Curva de calibração com base na evolução da densidade ótica a $\lambda=450\text{nm}$ e do número de células por mililitro.	23
Figura 12 - Taxa de eclosão (% , média±DP) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> quando fornecidas as diferentes dietas	24
Figura 13 – Taxa de sobrevivência relativa ao rendimento do cultivo (% , média±DP) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas, ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo	26

Figura 14 – Taxa de sobrevivência entre dias de amostragem (% , média±DP) de organismos <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas; a e b indica as diferenças estatisticamente significativas a um p-value <0.05, entre dietas, em cada intervalo de tempo.....	27
Figura 15 – Biomassa Total (µg Peso Seco, média±DP) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas; a e b indica as diferenças estatisticamente significativas a um p-value <0.05, em cada tempo.....	28
Figura 16 – Taxa de produção de ovos (ovos/fêmea, média±DP) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas.....	31
Figura 17 - Teor lipídico (% , média ± DP) obtido dos diferentes modos de preservação da microalga; as letras a e b indica as diferenças estatisticamente significativas a um p-value <0.05.....	32
Figura 18 - Cromatograma ilustrativo dos resultados obtidos na análise dos ácidos gordos dos diferentes modos de preservação com <i>Rhodomonas baltica</i> . As letras identificam os ácidos gordos mais significativos, onde A é ácido mirístico (C14:0), B é ácido palmítico (C16:0), C é ácido palmitoleico (C16:1 n7), D é ácido elaídico (C18:1 n9 trans), E é ácido oleico (C18:1 n9 cis), F é ácido vacénico (C18:1 n7), G é ácido linoleico (C18:2 n6), H é γ-ácido linoleico (C18:3 n6), I é α-ácido linoleico (ALA) (C18:3 n3), J é ácido estearidónico (C18:4 n3), L é ácido araquidónico (AA) (C20:4 n6), M é ácido eicosapentaenónico (EPA) (C20:5 n3) e o N é ácido docosa-hexaenónico (DHA) (C22:6 n3).	33

Lista de tabelas

Tabela I - Taxa de eclosão (% , média±DP) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> quando fornecidas as diferentes dietas	24
Tabela II - Rendimento do cultivo (% , média±DP) de organismos <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas, ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo.....	25
Tabela III - Taxa de sobrevivência entre dias de amostragem (% , média±DP) de organismos <i>Acartia tonsa</i> alimentados com as diferentes dietas	26
Tabela IV - Biomassa Total (µg PS, média±DP) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> alimentados com as diferentes dietas ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo	28
Tabela V - Distribuição (% , média±DP) das diferentes fases de desenvolvimento de <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas, ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo	30
Tabela VI – Taxa de produção de ovos (Ovos/fêmea) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas.....	30
Tabela VII – Teor lipídico (% , média±DP) dos organismos <i>Acartia tonsa</i> quando alimentados com as diferentes dietas	31
Tabela VIII – Perfil de ácidos gordos das diferentes dietas (média % ácidos gordos totais ± DP), fornecidas aos copépodes <i>Acartia tonsa</i>	36

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Lista de siglas

FAO	Food and Agriculture Organization
PUFAS	<i>Polysaturated Fatty Acids</i> - Ácidos gordos polinsaturados
DHA	<i>Docosahexaenoic Acid</i> - Ácido docosa-hexaenóico
EPA	<i>Eicosapentaenoic Acid</i> - Ácido eicosapentaenóico
ARA	Ácido araquidónico
USA	<i>United States of America</i> , Estados Unidos da América
F/2	Meio de cultivo de <i>Guillard</i>
UV	Ultravioleta
mL	Mililitro
L	Litro
CT	Comprimento total
P	Prossoma
CHCl₃:MeOH	Clorofórmio: Metano
°C	Graus Celsius
NaCl	Cloreto de sódio
CHCl	Clorofórmio
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
DP	Desvio-padrão
ANOVA	Método de análise de variância entre grupos
PS	Peso seco
N	Náuplio
C	Copépodo
SFA	<i>Saturated Fatty Acid</i> – Ácidos gordos saturados
MUFA	<i>Monounsaturated Fatty Acid</i> – Ácidos gordos monoinsaturados

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Índice

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	IX
<i>ABSTRACT</i>	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE SIGLAS	XVII
ÍNDICE	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estado global da Aquacultura	1
1.2. Aquacultura em Portugal	2
1.3. Maternidades e alimento vivo	3
1.3.1. Microalgas	4
1.3.2. Copépodes	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. Cultivo de microalgas	13
2.2. Recolha do copépode <i>Acartia tonsa</i> e cultivos <i>stock</i> em laboratório	14
2.3. Dieta congelada e liofilizada	15
2.4. Desenho experimental	15
2.5. Métodos Analíticos	18
2.5.1. Preparação das amostras	18
2.5.2. Extração e quantificação de lípidos totais	19
2.5.3. Análise do perfil de ácidos gordos	20
2.6. Análise estatística	21

3.	RESULTADOS	23
3.1.	Curva de calibração da microalga <i>Rhodomonas baltica</i>	23
3.2.	Taxa de eclosão	24
3.3.	Rendimento de cultivo e sobrevivência	25
3.4.	Biomassa Total	27
3.5.	Crescimento do cultivo	29
3.6.	Taxa de produção de ovos	30
3.7.	Teor lipídico das dietas	31
3.8.	Perfil de ácidos gordos	32
4.	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	37
	BIBLIOGRAFIA	43

1. Introdução

1.1. Estado global da Aquacultura

Com o aumento da população mundial de 7,4% entre 2009 e 2014, podendo alcançar os 9,7 bilhões de pessoas até 2050, uma das principais problemáticas que se enfrenta atualmente é a alimentação humana. Sabendo que cada vez mais os stocks de recursos marinhos naturais enfrentam uma diminuição drástica, é necessário encontrar alternativas sustentáveis para contrabalançar este fenómeno: Aquacultura (FAO, 2016). Aquacultura é o cultivo de peixes, crustáceos, moluscos e outros organismos em tanques, lagos ou outros locais confinados, para recolha direta do organismo, sendo o intuito principal a sua utilização na área alimentar, cosmética e industrial (Ike & Roseline, 2007). A sobre-exploração de *stocks* de populações selvagens de peixe tem levado ao aumento da importância da aquacultura como fonte de proteína animal (Piasecki *et al.*, 2004). Em 2014, cerca de 44% (73.8 milhões de toneladas) (Fig. 1) do total de pescado capturado, provém de aquacultura com um valor estimado de 140 mil milhões de euros (FAO, 2016).

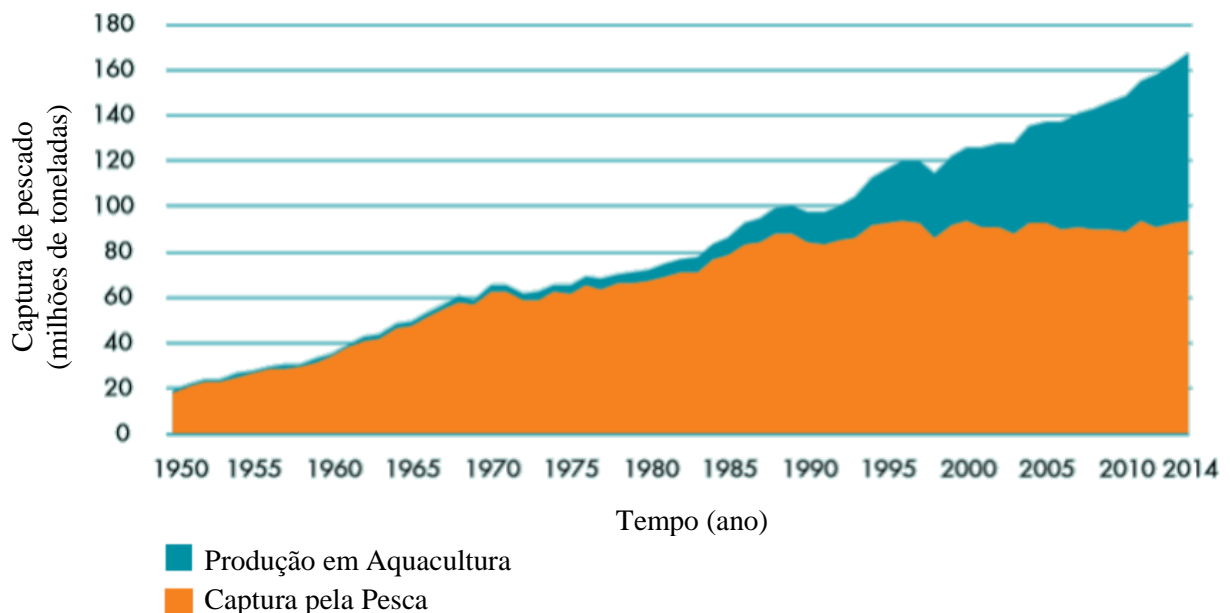


Figura 1 - Representação esquemática das capturas mundiais da pesca e da produção em aquacultura; Fonte: FAO, 2016

Cerca de 600 espécies diferentes (Troell *et al.*, 2014) são produzidas em sistemas de aquacultura, entre os quais peixes ósseos, crustáceos e moluscos de águas marinhas e dulciaquícolas, répteis, anfíbios e invertebrados aquáticos cuja produção varia na sua intensidade, capacidades tecnológicas e finalidade, destinando-se quer ao consumo humano quer ao repovoamento dos *stocks* selvagens. A produção mundial é dominada pela produção de pescado (cerca de 44.1% do total), seguida pela produção de crustáceos (cerca de 22% do total) (FAO, 2016).

1.2. Aquacultura em Portugal

O contributo da aquacultura nacional para o fornecimento de pescado para consumo humano é ainda relativamente baixo. Dentro da União Europeia, Portugal é o país que consome mais proteína oriunda de pescado podendo alcançar os 55 kg/habitante/ano (European Commission, 2018). Deste valor de peixe consumido, apenas 3% corresponde a pescado oriundo de aquacultura. Sendo assim, torna-se um grande problema pois, desde 2010, Portugal diminuiu cerca de 20% nas suas capturas por parte da atividade pesqueira, sabendo que em 2017 Portugal capturou cerca de 175 mil toneladas de pescado (INE & DGRM, 2018). A produção em aquacultura em 2016 foi de aproximadamente 12 mil toneladas gerando assim uma receita de cerca de 75 milhões de euros (Eurostat, 2018). Estes resultados traduzem-se num aumento em quantidade de pescado de 18%, e um acréscimo em valor de cerca de 40% relativamente a 2015 (INE & DGRM, 2018) (Fig. 2).

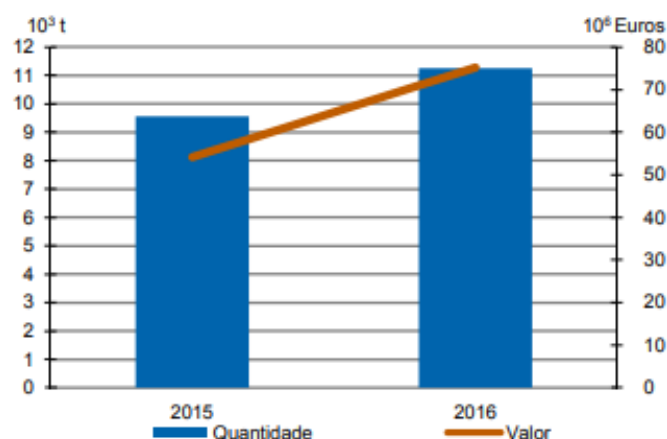


Figura 2 - Produção em aquacultura em Portugal de 2015 a 2016, demonstrando a quantidade e o valor correspondido; Fonte: INE & DGRM, 2018

Atualmente em Portugal, a principal espécie produzida é a amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*). Em 2018, entre as cerca de 18 espécies marinhas produzidas em Portugal, o pregado (*Psetta maxima*), a dourada (*Sparus aurata*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) de água doce foram das espécies mais produzidas. Relativamente aos regimes de exploração, a produção de aquacultura em águas doces manteve-se exclusivamente intensiva. O regime extensivo para produção de espécies de águas marinhas e salobras representou cerca de 60% do volume total tendo sido utilizado sobretudo para o cultivo de moluscos bivalves. Em relação ao regime intensivo, no ano de 2016 representou aproximadamente 33% da produção total em Portugal, enquanto o regime semi-intensivo, representou cerca de 11% do total de pescado produzido (INE & DGRM, 2018).

1.3. Maternidades e alimento vivo

O constante declínio dos *stocks* mundiais de pescado levou ao ímpeto do rápido crescimento de aquaculturas de peixe e crustáceos e consecutivamente de maternidades destes mesmo organismos (Naylor *et al.*, 2000). As maternidades de peixe, moluscos e crustáceos têm vindo a ser cada vez mais uma fase de elevada importância para as aquaculturas. Sendo assim, o fornecimento de dietas adequadas para as primeiras fases larvares é uma das principais dificuldades durante o cultivo larvar principalmente em larvas de tamanho reduzido (Franco *et al.*, 2017). Na primeira alimentação o sistema digestivo permanece simples sendo por vezes incapaz de processar dietas inertes de uma maneira que permita a sobrevivência e o crescimento larvar. Sendo assim é essencial o fornecimento de alimento vivo para o sucesso do cultivo de larvas principalmente após o consumo das reservas vitelinas (Sorgeloos & Léger, 1992; Conceição *et al.*, 2010). Na realidade, apesar do recente avanço no desenvolvimento de dietas inertes para larvas de peixe e crustáceos, a alimentação da maioria das espécies de interesse para a aquacultura ainda depende de alimento vivo (fitoplâncton e zooplâncton) durante os primeiros estádios de vida (Conceição *et al.*, 2010).

1.3.1. Microalgas

As microalgas constituem o primeiro elo na cadeia alimentar oceânica, isto é, o produtor primário, devido à sua capacidade de sintetizar moléculas orgânicas utilizando energia solar. Em aquacultura, as microalgas são produzidas como uma fonte direta de alimento para diversas fases larvares de organismos filtradores como por exemplo moluscos bivalves, de fases larvares de gastrópodes marinhos e de fases larvares iniciais de crustáceos marinhos (Heasman *et al.*, 2000). Estes organismos microscópicos também são usados como fonte de alimento indireto na produção de zooplâncton, como por exemplo, rotíferos, artémia e copépodes que posteriormente são fornecidos como alimento vivo a larvas carnívoras (Conceição *et al.*, 2010). Para o cultivo de larvas de organismos marinhos, é por vezes usado o método da água-verde, ou seja, a introdução direta nos tanques de cultivo. Esta técnica potencia o aumento do crescimento larvar, sobrevivência e taxas de ingestão devido ao fornecimento direto de nutrientes, da preservação da qualidade nutricional da presa e da diversificação da microflora quer nos tanques quer no aparelho digestivo das larvas (Spolaore *et al.*, 2006; Seychelles *et al.*, 2009).

As microalgas devem possuir atributos essenciais para ser uma espécie de sucesso em aquacultura: devem possuir um tamanho celular adequado para a espécie em cultivo, sendo assim facilmente ingeríveis; devem possuir um ciclo de vida curto possuindo assim rápidas taxas de crescimento; ser de fácil cultivo a densidades elevadas, possuir capacidade de tolerância a qualquer alteração de temperatura, luminosidade e nutrientes e por fim deve possuir um valor nutricional adequado para a espécie em questão (Brown, 2002). Para as larvas de peixe e crustáceos é necessário um alimento rico em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) ácidos gordos polinsaturados (PUFA) tais como o ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6 *n*-3) e o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 *n*-3) (Tocher, 2010).

De acordo com Becker (2004), mais de 40 espécies de 16 géneros de microalgas são cultivadas como cultivos puros em sistemas intensivos. A maior parte das espécies de microalgas usadas como alimento em organismos aquáticos comercialmente importantes, como diatomáceas e microalgas flageladas, possuem tamanhos compreendidos entre os 2µm (*Nannochloropsis* sp.) e os 100µm (*Spirulina* sp.). Os organismos da Classe Bacillariophyceae, denominadas de diatomáceas, são geralmente fornecidas a larvas de moluscos bivalves e de crustáceos, devido à sua composição elevada de silicatos,

constituintes principais das suas paredes celulares sendo necessário para a formação de estruturas rígidas. Os organismos das Classes Prasinophyceae (por exemplo *Tetraselmis suecica* e *T. chuii*) e Chrophyceae (por exemplo, *Dunaliella tertioleta* e *Chrorella minutíssima*) são constituintes essenciais das dietas fornecidas a larvas de crustáceos quando complementados com diatomáceas. Os organismos da Classe Prymnesiophyceae (por exemplo *Isochrysis galbana*) são frequentemente usados em maternidades de larvas de peixes. Os organismos da classe Cryptophyceae e género *Rhodomonas* (*Rhodomonas baltica*, *R. salina*, *R. reticulata* e *R. lens*) são usados nas dietas de zooplâncton marinho como por exemplo copépodes e também em larvas de crustáceos (Conceição, 2010; Priyadarshani & Rath, 2012; Vu *et al.*, 2015).

O cultivo de microalgas em larga escala pode variar entre cultivos extensivos pouco controlados ou cultivos mono-específicos intensivos. Atualmente, diversas maternidades de peixe e crustáceos produzem microalgas em cultivo *indoor* ou *outdoor* nas suas instalações como alimento de larvas de peixes e crustáceos, contudo o investimento desta matéria-prima pode ser elevado, podendo representar 20%-50% dos custos da maternidade (D'Souza *et al.*, 2000; Heasman *et al.*, 2000; Seychelles *et al.*, 2009; Guevara *et al.*, 2011). Outras dificuldades que estes cultivos acarretam para as maternidades são a ocorrência de fatores ambientais adversos, como temperaturas ambientais elevadas e ocorrência de chuva, intensidade luminosa, variação da composição química das águas utilizadas nos cultivos e ocorrência de contaminações (bactérias, outras microalgas, fungos) (Heasman *et al.*, 2000).

Os custos elevados associados à produção de microalgas, os riscos de contaminação e as variações climáticas continuam a ser um dos grandes problemas de aquaculturas que dependem de culturas extensivas de microalgas para alimentação de larvas. De forma a ultrapassar ou reduzir os problemas e limitações associados a cultivos de microalgas é necessário desenvolver métodos de preservação para estes organismos. Neste sentido, o objetivo principal é manter o nível do valor nutricional da microalga ao longo do tempo, ou seja, fornecer valores apropriados de ácidos gordos polinsaturados que correspondem aos requisitos nutricionais dos consumidores do nível trófico seguinte (Seychelles *et al.*, 2009). Navarro & Sarasquete (1998) e Cañavate & Fernández-Díaz (2001), referem a substituição de microalga viva por dietas artificiais como suplemento ou como fonte principal de alimento, estas incluem, microalga preservada, micro-encapsulados e alimentos à base de leveduras. Uma alternativa possível ao cultivo de microalgas nas maternidades é o fornecimento de concentrados de microalgas, sendo posteriormente, preservados a

condições ótimas até à sua utilização. Outras formas de preservação de microalgas, sendo o intuito principal de reduzir os custos das maternidades, são a floculação, refrigeração, congelação e liofilização (Borowitzka, 1997). Estas formas de preservação contêm diferentes quantidades de humidade sendo assim necessário o armazenamento a várias temperaturas. Sendo assim, os procedimentos nas maternidades ficam simplificados, reduzindo, portanto, os custos (D'Souza *et al.*, 2000; Spolaore *et al.*, 2006).

1.3.2. Copépodes

Tradicionalmente são usados como alimento vivo rotíferos (*Brachionus* spp.) e artémia (*Artemia* spp.) (Jepsen *et al.*, 2007). Contudo, Drillet *et al.* (2006), Camus & Zeng (2009), Pan *et al.*, (2012) e Barroso *et al.*, (2013) demonstraram que os rotíferos e a artémia possuem um perfil nutricional pobre como alimento para larvas de peixes sendo assim necessário o seu enriquecimento em ácidos gordos (Knuckey *et al.*, 2005). As larvas de peixes e de crustáceos requerem presas que contenham aminoácidos e ácidos gordos essenciais como o DHA, EPA e ARA, sendo estes uns dos principais fatores para a sobrevivência e o seu crescimento (Wilson, 2003; Fahardian *et al.*, 2008),

Noventa por cento dos cistos de artémia usados em aquaculturas provêm de Great Salt Lake (Utah, USA) onde as mudanças climáticas podem levar a uma diminuição de alimento vivo induzindo assim prejuízos ao nível do produtor (Drillet *et al.*, 2006). As maiores desvantagens do uso de artémia como alimento vivo para larvas são as variações marcadas do custo, devido às mudanças climáticas, tamanho inadequado para a boca das larvas e a fraca qualidade nutricional levando assim ao enriquecimento da artémia com microalgas ou com preparações comerciais como o Selco® (Fahardian *et al.*, 2008). Como consequência do seu elevado custo tem-se vindo cada vez mais a procurar alternativas a este alimento vivo (Conceição *et al.*, 2010; Anzueto-Sánchez, 2014). Uma possível solução é a utilização de outros organismos como alimento vivo, por exemplo, copépodes (Fahardian *et al.*, 2008). Os copépodes, metazoa mais comum nos oceanos, são consumidores primários que servem de ligação entre matéria orgânica a consumidores secundários nos ecossistemas marinhos (Calliari *et al.*, 2006; Holste & Peck, 2006) (Fig. 3). De acordo com Alver *et al.*, (2011) e Peck *et al.*, (2008) estes organismos são a principal fonte de alimento natural de muitas larvas de peixe sendo um alimento rico em nutrientes essenciais, especialmente ácidos gordos polinsaturados (PUFA) tais como o DHA e o EPA (Stottrup *et al.*, 1999).

Segundo Ohs *et al.*, (2009) o fornecimento de copépodes nas dietas de diversas larvas de peixe leva a efeitos benéficos na sobrevivência e no crescimento das mesmas, por exemplo, quando combinados com artémia e/ou rotíferos ou quando fornecidos exclusivamente em larvas de peixe judeu da espécie *Glaucosoma hebraicum*, de pargo da espécie *Pagrus auratus* (Payne *et al.*, 2001) e em solhas da espécie *Platichthys flesus* (Engell-Sørensen *et al.*, 2004). Hamre (2006) demonstrou que larvas de bacalhau (*Gadus morhua*) alimentadas com copépodes apresentam uma taxa de sobrevivência substancialmente maior e menores deformações quando comparados às alimentadas com artémia e rotíferos (Payne & Rippingale, 2000; Drillet *et al.*, 2008; Alajmi & Zeng, 2015).

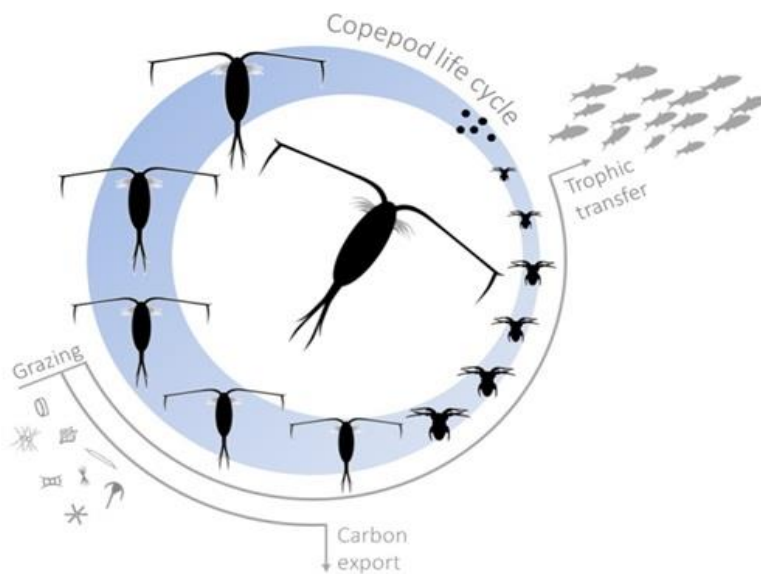


Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida dos copépodes; Fonte: Adaptado de Pompei; [24 de Setembro 2018]

Calanóides, harpacticóides e ciclopóides são os três grandes grupos de copépodes que podem ser usados como fonte de alimento vivo no cultivo de larvas de peixe e crustáceos (Fahardian *et al.*, 2008). As espécies de calanóides são as mais abundantes em ambientes pelágicos, sendo as espécies pertencentes aos gêneros *Acartia*, *Centropages* e *Eurytemora* umas das mais usadas em maternidades de peixes e crustáceos.

Acartia tonsa (Dana, 1849) é uma espécie de copépode calanóide eurihalino presente em águas costeiras temperadas e subtropicais (Calliari *et al.*, 2006). Devido à sua abundância nestes habitats, são facilmente capturados com redes de plâncton e posteriormente colocados em cultivo (Piasecki *et al.*, 2004). Estes copépodes possuem uma vasta gama de dimensões, devido aos diferentes estádios do ciclo de vida que apresenta, tornando-os uma presa viva ideal para as primeiras fases larvares da maioria das espécies marinhas (Fig. 3)(de Moraes & Bodiou, 1984; Turingan *et al.*, 2005). Possuem um ciclo de vida pelágico com diversas fases de desenvolvimento, terminando cada uma com uma muda (Marcus, 2005). Os seis primeiros estádios são denominados de náuplios e os últimos seis consistem em cinco fases de copépoditos e a fase final de adulto, onde ocorre a diferenciação sexual (Wadhwa *et al.*, 2014), começando posteriormente a produção de ovos oriundos das fêmeas. De acordo com Hirst *et al.* (2010), os organismos machos e fêmeas de diversos géneros de copépodes, como por exemplo, o género *Acartia*, são distinguíveis morfologicamente a partir das fases tardias de copépoditos, pela segmentação, no desenvolvimento dos apêndices e no segmento genital, como se observa na Figura 4 e 5. Na fase adulta, os calanóides produzem ovos durante um longo período de tempo, libertando-os para a coluna de água. Após a interrupção de arejamento começam a assentar no fundo dos tanques de cultivo, sendo possível a recolha dos ovos por sifonação dos fundos, para posterior armazenamento (Drillet *et al.*, 2006). Apesar do tempo de armazenamento ser limitado, estes ovos são úteis durante períodos de reduzida produção de ovos ou quando são necessárias elevadas quantidades de náuplios. Em média, uma fêmea de *Acartia* produz entre 11 a 50 ovos por dia (Støttrup *et al.*, 1999). Outro fator importante para utilização de copépodes é o seu movimento natatório errático, ou seja, um movimento de “espasmos em zigzag”. Esta característica é um estímulo visual importante, promovendo assim uma maior taxa de ingestão de copépodes pelas larvas, mesmo quando está disponível outro tipo de alimento como a artémia (Puello-Cruz *et al.*, 2009; Abate *et al.*, 2016).

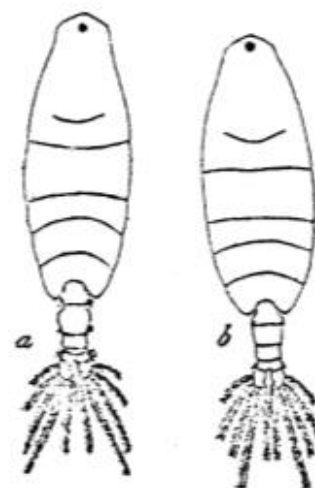


Figura 4 - Representação da diferenciação sexual em *Acartia*; Fonte: Murphy & Cohen, 1978



Figura 5 - Organismos adultos (1- macho e 2- fêmea) de *Acartia tonsa*

A. tonsa é uma espécie facilmente mantida em cultivo, sendo uma das espécies de copépodes mais estudada (Holste & Peck, 2006). Os principais fatores que afetam a duração do ciclo de vida, crescimento, sobrevivência e reprodução de copépodes são a temperatura, salinidade e tamanho, quantidade e qualidade do alimento. *A. tonsa* é capaz de se adaptar a gamas de temperatura entre -1 e 32 °C e a salinidade entre 11 e 36 (Paffenhöfer & Stearns, 1988).

A temperatura é considerada o fator mais importante em relação à taxa de sobrevivência, desenvolvimento, taxas de crescimento, taxas de eclosão e viabilidade de copépodes eclodidos. De acordo com Chinnery & Williams, (2004) a sobrevivência de copépodes de *Acartia* é superior a temperaturas de 20°C quando comparadas a temperaturas de 5°C. De acordo com Leandro *et al.* (2006), o cultivo de *A. tonsa* a temperaturas de 22°C tende a ter um tempo de desenvolvimento menor quando comparado com os cultivados a temperaturas mais baixas. *A. tonsa* é considerada uma espécie com uma ampla distribuição e abundância nas comunidades estuarinas de zooplâncton (Marques *et al.*, 2006) conseguindo assim adaptar-se a variações bruscas de salinidade. De acordo com Chinnery & Williams, (2004) há um aumento da taxa de eclosão em águas a 33,3 de salinidade quando comparado com águas salobras, como por exemplo, a 15,5. Outros estudos, como Peck & Holste (2006), afirmam que a taxa de produção de ovos de *A. tonsa* é inferior a salinidades de 30 quando comparados com águas a 14 de salinidade. A fase de náuplios de *Acartia* é considerada como a fase de vida mais vulnerável sofrendo assim grandes mortalidades. Independentemente do sucesso dos adultos, se os náuplios não conseguem sobreviver em certas condições não é possível ser estabelecida uma população autossustentável, limitando assim a dispersão das espécies (Chinnery & Williams, 2004).

A qualidade e quantidade de alimento deve ser ajustada de acordo com a espécie de copépodes em cultivo, a fase de desenvolvimento e a densidade de cultivo. As concentrações mínimas de microalga requeridas para alcançar taxas máximas de

crescimento em copépodes do género *Acartia* dependem do tamanho celular da microalga. É suficiente concentrações de 10^5 células.mL⁻¹ quando se utiliza microalgas com tamanhos inferiores a 5µm, por exemplo *Isochrysis galbana* ou *Nannochloropsis oculata* e em concentrações de 10^4 células.mL⁻¹, quando se utiliza microalgas com tamanhos maiores, por exemplo *Rhodomonas* sp.. Para microalgas com tamanhos superiores a 12µm, como diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* ou *Cryptothecodinium* sp. é suficiente a introdução destas microalgas nos cultivos de copépodes a uma concentração de 10^3 células.mL⁻¹ (Støttrup, 2006).

Os copépodes, além de serem um alimento vivo altamente nutricional com uma razão DHA/EPA relativamente elevado não precisando de enriquecimento, providenciam um aumento do crescimento larvar, melhor pigmentação, melhoramento do desenvolvimento do estômago e fonte de enzimas exógenas (Knuckey *et al.*, 2005, Fahardian *et al.*, 2008) . Contudo, a utilização de copépodes em maternidades é ainda limitada devido principalmente à dificuldade em alcançar cultivos com elevadas densidades. Os cultivos com elevadas densidades podem afetar negativamente o crescimento e desenvolvimento dos copépodes pela redução da qualidade da água devido à acumulação de subprodutos metabólicos, redução rápida do alimento, aumento das interações físicas entre indivíduos e ocorrência de canibalismos ao nível dos ovos (Drillet *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2017). Consequentemente, a sobrevivência, o tempo de desenvolvimento e a fecundidade destes organismos podem ser afetadas negativamente. A sobrevivência de *A. tonsa* não é afetada quando se atinge a densidade de cultivo de 5000 indivíduos.L⁻¹, contudo o desenvolvimento pode ser comprometido e a produção de ovos é menor quando comparado com densidades inferiores (Vu *et al.*, 2017).

Além da dificuldade em alcançar elevadas densidades de copépodes, outra problemática no cultivo destes organismos é a necessidade de manter um cultivo paralelo de microalgas eficaz e contínuo (Støttrup, 2006). Em geral, os copépodes alimentam-se de microalgas, no entanto é necessário selecionar uma espécie de microalga que potencie o aumento da sobrevivência, desenvolvimento e produção de ovos. Ao selecionar dietas de microalgas para os copépodes é necessário não só que estas suportem uma produção máxima de copépodes como também forneçam nutrientes associados a estes organismos, sendo assim, é importante considerar os custos e requerimentos envolvidos no cultivo de microalgas (Hemaiswarya *et al.*, 2011). Idealmente, como alimento de copépodes devem ser usadas espécies de microalgas comumente disponíveis, de fácil produção e ao mesmo tempo fornecer o máximo de fecundidade e desenvolvimento nos copépodes. Dentro das

espécies de microalgas mais usadas como alimento no cultivo de copépodes, *Rhodomonas* spp. é muitas vezes referida como eficaz quer fornecida como dieta exclusiva ou como *mix* de microalgas para espécies de *Acartia* (Peck & Holste, 2006). *Rhodomonas* spp. são uma microalga flagelada de cor vermelha pertencente à Classe Criptófitas, que possui um diâmetro celular entre 9,2 e 9,9µm. Esta microalga marinha é usada como alimento de copépodes (Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2006) e algumas larvas de peixes e crustáceos (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005).

No entanto, o cultivo desta microalga pode ser problemático devido à sua instabilidade em cultivo estando propensa à morte repentina da mesma. Assim sendo, é necessário encontrar outras formas alternativas de microalgas aos copépodes que sejam de fácil administração e que forneçam as mesmas qualidades nutricionais que a microalga viva fornece sendo o intuito principal a simplificação e melhoramento dos protocolos de alimentação nos cultivos de copépodes (Milione *et al.*, 2007).

Uma das alternativas é a administração de pasta congelada de microalgas e microalgas liofilizadas. De acordo com Navarro, (1999) e Seychelles *et al.*, (2009) o uso de microalga congelada e liofilizada providencia crescimento quando fornecida a rotíferos, contudo, esta possibilidade ainda não foi observada ao nível dos copépodes calanóides do género *Acartia* (Milione *et al.*, 2007).

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito do modo de preservação da microalga *Rhodomonas baltica* - viva, congelada e liofilizada, na taxa de eclosão de ovos, crescimento, sobrevivência, desenvolvimento das fases do ciclo de vida e na produção de ovos em copépodes calanóides *A. tonsa*. Além destes parâmetros, também foi analisado o perfil bioquímico (ácidos gordos e lípidos totais) da microalga nos diferentes modos de preservação.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

2. Materiais e métodos

2.1. Cultivo de microalgas

Para a realização deste trabalho foi usada a microalga *Rhodomonas baltica* fornecida pelo Oceanário de Lisboa e pelo centro de investigação CETEMARES – Politécnico de Leiria (Peniche).

Procedeu-se ao cultivo das microalgas, inoculando em balões volumétricos de 250mL com água salgada filtrada, esterilizada por UV (ultravioleta) e autoclavada a salinidade 30. Posteriormente adicionaram-se nutrientes (nitratos, fosfatos, micronutrientes e vitaminas) usando o meio de cultivo F/2 modificado (Guillard & Ryther, 1962) em modo *fed-batch*. Para obtenção de volumes maiores de microalga, efetuou-se o *scale-up* da mesma, atingindo volumes de 9L (Fig. 6). As microalgas foram mantidas numa sala de temperatura controlada a 21°C, fotoperíodo de 14h luz: 10h escuro e arejamento forte com intuito de obter uma mistura homogénea do cultivo e impedir a deposição das mesmas. Os cultivos foram agitados manualmente duas vezes por dia. Para acompanhamento dos cultivos ao nível da concentração celular, foi feita uma curva de crescimento ao longo de tempo e uma curva de calibração em função da densidade ótica, uma vez que a absorvância da luz pode ser diretamente relacionada com a densidade celular. A densidade ótica de cada amostra foi medida de dois em dois dias, num espectrofotómetro, a $\lambda=450\text{nm}$.

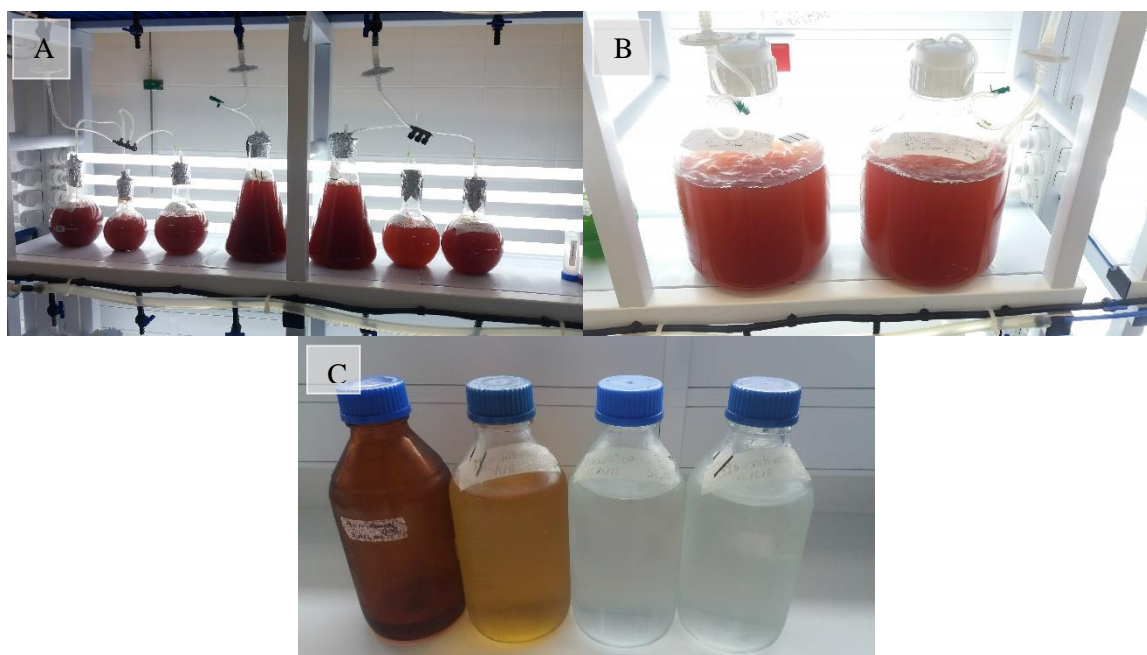


Figura 6 - Cultivo de microalgas; A) e B) Cultivo de *Rhodomonas baltica* em balões de menor volume (500mL, 1000mL e 2000mL) e em *Carboys* de 9000mL; C) Diversas 13 soluções para elaboração do meio F/2 modificado

2.2. Recolha do copépode *Acartia tonsa* e cultivos *stock* em laboratório

As amostras de zooplâncton foram recolhidas no Estuário do Mondego (40° 08' N, 8° 50' W), zona de águas temperadas localizada na costa de Portugal. A recolha foi realizada no local de amostragem C1 (Fig. 7) por arrasto horizontal à superfície com uma rede de plâncton com 200 de micragem, contendo no seu extremo um recipiente para a permanência dos organismos recolhidos. Após a recolha, as amostras foram colocadas em *jerricans* com arejamento fraco sendo transferidas para o centro de investigação CETEMARES – Politécnico de Leiria (Peniche) em menos de 2 horas. Foram feitas triagens das amostras, sendo por fim recolhido o copépode *A. tonsa* para posterior cultivo em laboratório.

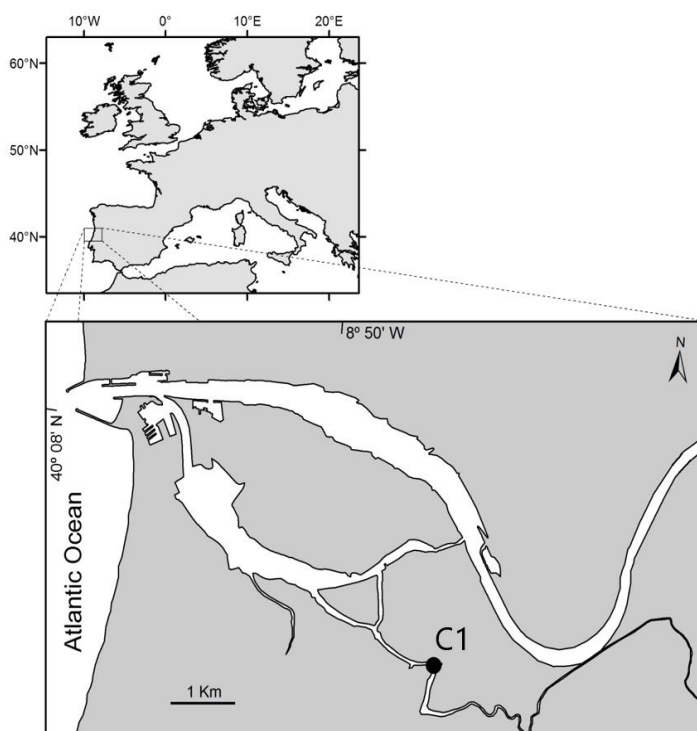


Figura 7- Mapa do Estuário do Mondego, demonstrando a localização da estação de amostragem (C1)

Estes organismos foram colocados em tanques cilíndricos de 20L contendo água salgada filtrada e esterilizada por UV. Os cultivos de copépodas foram mantidos a uma temperatura de aproximadamente 21°C, salinidade de 30, fotoperíodo de 14 horas luz: 10 horas escuro e arejamento fraco constante. Diariamente, os copépodas foram alimentados

com microalgas Criptófitas *R. baltica* mantendo os cultivos a uma concentração entre 10^4 a 10^5 células.mL⁻¹. De forma a manter os cultivos em laboratório, foram feitas triagens diárias e recolhas dos ovos, ou seja, diferenciação de tamanhos usando crivos de diferentes micragens (55µm, 100µm, 125µm e 200µm) e sifonagem dos fundos para obtenção de ovos. Os ovos foram posteriormente limpos de alguns detritos sendo armazenados em tubos de Falcon com água salgada, a 4°C, no escuro.

2.3. Dieta congelada e liofilizada

Para a formulação das dietas com microalga congelada e liofilizada, procedeu-se á recolha da microalga (*R. baltica*) em fase exponencial sendo posteriormente determinada a concentração da microalga, para futura extrapolação para os ensaios. De seguida a microalga foi colocada em tubos de Falcon de 15mL sendo posteriormente colocados na centrífuga 5810R Eppendorf, previamente arrefecida a 4°C, a uma velocidade de 4000 rpm durante 10 minutos à mesma temperatura, sendo posteriormente retirado o sobrenadante. Os tubos direcionados para a dieta congelada foram identificados e colocados a -24°C e os restantes, para a dieta liofilizada, foram colocados a -80°C no Thermo Scientific Herafreeze HFU T series Ultra-Low Temperature Freezer sendo no dia seguinte, colocados no liofilizador CoolSafe 9L - ScanVac num ciclo com duração de 3 dias para obter a biomassa liofilizada.

2.4. Desenho experimental

Para a observação do efeito das diferentes dietas na taxa de eclosão, sobrevivência, desenvolvimento e produção de ovos de *A. tonsa* procedeu-se à montagem de um sistema de recirculação cujo objetivo principal era a estabilidade da temperatura de água em banho-maria a 21°C (Fig. 8).

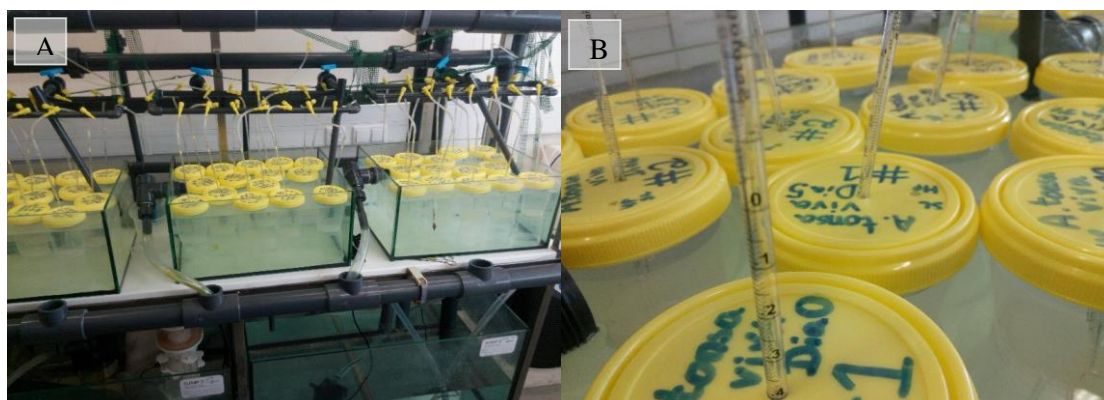


Figura 8 - Ilustração figurativa do desenho experimental do ensaio: A) Sistema de Recirculação de água; B) Presença do arejamento nos copos que continham *Acartia tonsa* 15

Foram colocados 15 copos de 500mL em cada tanque de 50L, sendo cada tanque direcionado para cada dieta. Para cada fator observado ao longo do tempo, taxa de eclosão, sobrevivência, desenvolvimento e produção de ovos, foram atribuídos 3 copos (réplicas), sendo retirados na altura da observação deste fator. Em cada copo foram colocados 400mL de água salgada filtrada e esterilizada a salinidade 30, arejamento fraco individual e ovos de copépodes à densidade de 2 ovos.mL⁻¹, ou seja, 800 ovos por copo. Para garantir o máximo de sucesso no cultivo, os ovos de copépodes foram retirados do frigorífico a 4°C, após 3-4 dias do seu armazenamento. Diariamente procedeu-se ao fornecimento das dietas vivas, congeladas e liofilizadas a uma concentração de 2x10⁴células.mL⁻¹, concentração ideal para estes organismos (Jepsen *et al.*, 2007; Milione *et al.*, 2007; Drillet *et al.*, 2008; Peck *et al.*, 2008). Em relação à dieta viva, esta foi retirada dos cultivos de microalgas, no próprio dia de administração. A dieta congelada foi retirada do congelador sendo posteriormente colocada a descongelar à temperatura dos cultivos. Em relação à dieta liofilizada, esta foi transformada num pó com o auxílio de uma espátula, ressuspensa com água com características iguais às do cultivo e colocada posteriormente à temperatura do mesmo, minutos antes de ser adicionada aos copos referentes à dieta com microalga liofilizada.

Para a observação da taxa de eclosão, sobrevivência e desenvolvimento, os copos foram retirados dia 1 e 5, 10 e 14 dias após o começo do ensaio, respetivamente (Fig. 9). No dia 14 foi feita a crivagem dos copos do dia 15 com um crivo de 200µm, sendo o intuito principal a permanência de apenas organismos produtores de ovos, ou seja adultos. No dia 15 foram então retirados os copos respetivos à observação da produção de ovos. Na altura da recolha dos copos de cada dia, procedeu-se à crivagem dos mesmos com um crivo de 55µm, à exceção da produção de ovos que foi feita com um crivo de 200µm, sendo de

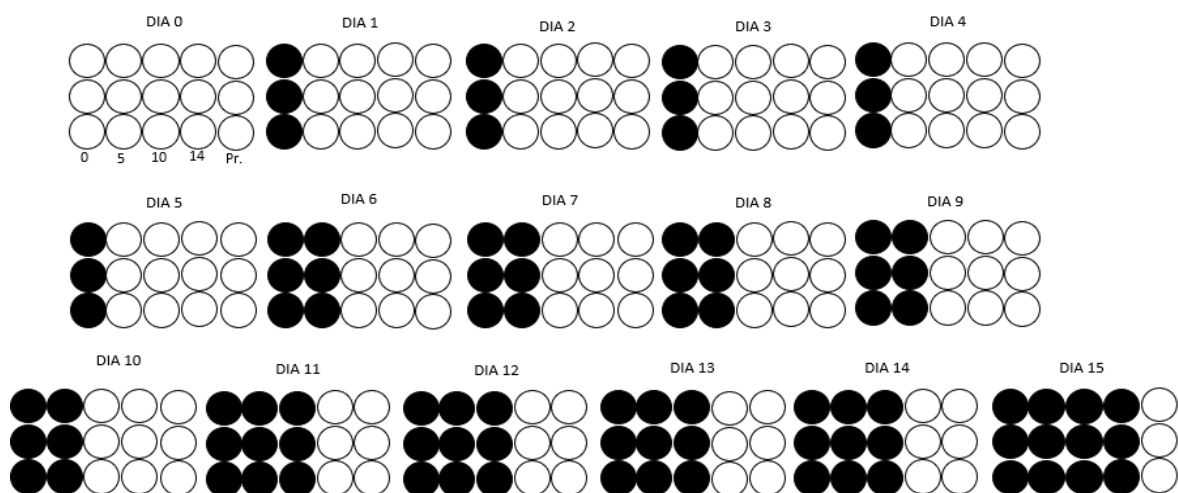


Figura 9 - Ilustração figurativa do desenho experimental do ensaio ao longo do tempo; Legenda: ○ - Copos em ensaio; ● - Copos retirados para amostragem

seguida armazenados em formaldeído (4%) até futura análise. Em cada dia de recolha de organismos e, com ajuda de um foco de luz, fator que ajuda na recolha de organismos devido ao seu comportamento de fototaxia positiva, foram feitas trocas parciais de água dos restantes copos em ensaio para diminuir o efeito de alguns compostos azotados na sobrevivência e desenvolvimento dos organismos.

As trocas foram parciais com o intuito de diminuir o manuseamento dos copépodes, ou seja, diminuir o stress e/ou perda de organismos. Para a taxa de eclosão foi feita a contagem dos náuplios recém-eclodidos, para a taxa de sobrevivência foi efetuada a contagem dos organismos no total e para a produção de ovos foi feita a observação e contagem das fêmeas e igualmente a contagem dos ovos. Após as contagens, os organismos foram fixados e armazenados em formaldeído (4%) para posteriores medições. O crescimento do cultivo foi avaliado através da medição ao nível do comprimento total do organismo para as fases náuplio (CT, μm) e para as fases de copépodos e adultos, ao nível da medição do prossoma (P, μm), sendo aleatoriamente escolhidos 100 organismos, sendo posteriormente identificados os estágios de desenvolvimento dos copépodes e respetivas proporções ao fim de 5, 10 e 14 dias. Estas medições foram feitas com um microscópio invertido ZEISS Axio Vert.A1 no programa ZEISS Microsoft Software ZEN 2lite. Com base no estudo de Leandro *et al.* (2006), procedeu-se à atribuição do comprimento medido de cada organismo para uma determinada fase do ciclo de vida, para posterior determinação da proporção de fases do ciclo de vida (Fig. 10). Para determinação da biomassa total dos organismos presentes nos dias 5, 10 e 14 quando alimentados com as diferentes dietas, foi estimado o Peso Seco ($\mu\text{g PS}$) dos náuplios e dos copépodos de cada dieta nos diferentes dias pela regressão definida por Bergreen *et al.*, (1988), $\text{Log}_{10} \text{PS} = 3.31\text{Log}_{10} \text{CT} - 8.498$ (NI–NVI) e $\text{Log}_{10} \text{PS} = 2.92 \text{Log}_{10} \text{P} - 7.958$ (CI–CVI).

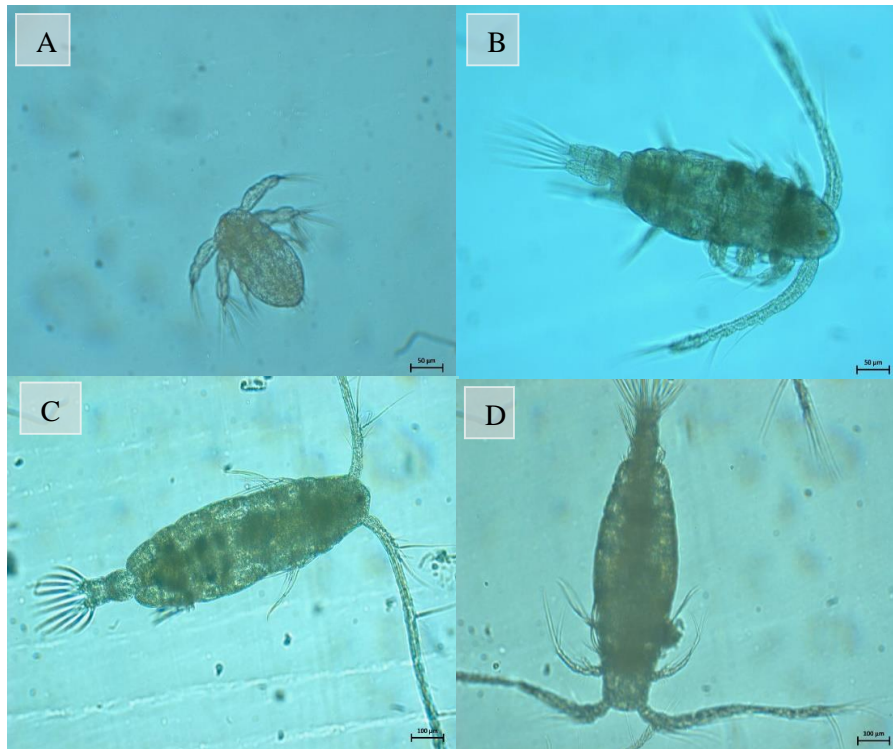


Figura 10 – Microfotografias do copépode *Acartia tonsa* em diferentes fases do ciclo de vida no microscópio invertido a uma ampliação de 10x (imagens superiores) e 20x (imagens inferiores); A) Náuplio; B) Copépodito; C) Adulto Fêmea; D) Adulto Macho

2.5. Métodos Analíticos

2.5.1. Preparação das amostras

A análise bioquímica foi precedida pela preparação das amostras. Para obtenção da biomassa, retirou-se cerca de 4L de *R. baltica* em fase exponencial. Este volume foi dividido em tubos Falcon de 50mL, sendo de seguida colocados na centrifuga (10 minutos, 4°C, $v= 4000\text{rpm}$), para obtenção do *pellet*. De seguida, foi retirado o sobrenadante, ficando apenas o *pellet* no Falcon. Na dieta com microalga viva, os Falcons foram colocados na estufa a 40°C durante a noite para eliminar o excesso de água, sendo de seguida colocados no exsiccador. Para a dieta com microalga congelada, os Falcons foram colocados diretamente no congelador a -24°C, permanecendo durante a noite, sendo de seguida colocados na estufa a 40°C durante a noite. Na dieta com microalga liofilizada, os Falcons foram colocados primeiramente a -80°C, e de seguida colocados no liofilizador. Após o ciclo de liofilização, foram colocados no exsiccador até análise. Os resultados

apresentados para os lípidos totais correspondem à média do peso de 6 amostras para cada dieta, sendo que cada amostra continha 3 *pellets* ($0,129 \pm 0,004\text{gr}$). Para a determinação do teor de ácidos gordos, os resultados apresentados correspondem à média do peso de 6 amostras para cada dieta, sendo que cada amostra continha apenas 1 *pellet* ($0,028 \pm 0,003\text{gr}$).

2.5.2. Extração e quantificação de lípidos totais

Após o tratamento prévio das amostras, procedeu-se à extração e quantificação de lípidos totais da microalga nos diferentes modos de preservação, pelo método Folch (Folch *et al.*, 1957) com algumas modificações.

Para cada dieta a ser analisada, primeiro pesou-se a biomassa pretendida para tubos de Falcon de 15mL (aproximadamente 0.05g), sendo de seguida adicionado 5mL de solução clorofórmio : metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 2:1). As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador *Pellet Mixer* VWR durante 1 minuto, sendo de seguida colocadas num Agitador Vórtex VWR, VV3 durante 5 minutos. Posteriormente adicionou-se 1,2mL de uma solução a 0.8% de NaCl, sendo de seguida homogeneizadas no Vórtex durante 2 minutos e colocadas na centrífuga 5810R Eppendorf (10 minutos, 4°C , $v=10000\text{rpm}$). De seguida procedeu-se à recolha da fase inferior que continha clorofórmio, sendo de seguida filtrada por uma coluna de sal sulfato de sódio anidro e algodão cardado. À restante mistura no Falcon, adicionaram-se 2mL de CHCl_3 , sendo de seguida realizados os mesmos passos da filtração do clorofórmio, referidos anteriormente. Posteriormente, as amostras foram colocadas em balões de evaporação tipo pêra previamente pesados, sendo de seguida colocados no Heidolph Evaporador Rotativo, Laborota 4000 sendo o intuito principal a evaporação do clorofórmio, permanecendo nos balões a quantidade de lípidos das amostras. Após este processo, os balões foram pesados, sendo a diferença entre o peso final e o peso inicial dividido pela biomassa inicial das amostras, a quantidade em percentagem dos lípidos nas amostras, como está demonstrada na equação:

$$\% \text{Lípidos} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Biomassa da amostra}} \times 100\%$$

2.5.3. Análise do perfil de ácidos gordos

Após o tratamento prévio das amostras, procedeu-se à análise do perfil de ácidos gordos pelo método descrito por Fernández *et al.*, (2015).

Para cada dieta a ser analisada, procedeu-se à pesagem da biomassa (aproximadamente 0.003g) em tubos de vidro. De seguida, adicionaram-se 2mL de uma solução de metilação 2% (v/v) H₂SO₄ e metanol, sendo posteriormente colocados em banho-maria a 80°C durante 2 horas. Após o término do tempo e arrefecimento das amostras à temperatura ambiente, adicionou-se 1mL de água MiliQ e 2mL de n-Hexano a cada tubo. De seguida as amostras foram homogeneizadas com auxílio do vórtex durante 1 minuto sendo posteriormente colocadas na centrifuga a uma velocidade de 1000 rpm durante 1 minuto. Após a centrifugação foi retirado 1mL de cada amostra sendo posteriormente colocado em frascos *vials* para posterior injeção.

Os ésteres metílicos de ácidos gordos foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo Finnigan TRACE GC Ultra (Thermo Electron Corporation), equipado com uma coluna TR-FAME (60mx0,25mm IDx0,25µm), um auto sampler AS 3000 Thermo Electron Corporation e um detetor de ionização de chama. O injetor, a operar em modo *splitless*, e o detetor foram programados para 250°C e 280°C, respetivamente. Foi utilizado hélio como gás de arraste, ao caudal de 1,2mL.min⁻¹. Ar e hidrogénio foram fornecidos ao detetor, ao caudal de 350 mL.min⁻¹ e 35 mL.min⁻¹, respetivamente. A temperatura do forno foi regulada para ter um incremento lento, aumentando para 100°C durante 1min, incremento para 150°C a 10°C.min⁻¹ e permanência em patamar durante 10min, seguido de um novo incremento de temperatura até aos 235°C, a 4°C.min⁻¹ e um patamar final nesta temperatura, por 10min.

A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos componentes da mistura comercial Supelco 37 component FAME mix, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA, analisada nas mesmas condições cromatográficas das amostras sendo complementada com base no estudo de Huerlimann *et al.*, (2010).

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com recurso ao software IBM SPSS Statistics (versão 25.0). As diferenças observadas na taxa de eclosão e na biomassa total dos organismos quando alimentados com as diferentes dietas foram analisadas mediante uma análise de variância não-paramétrica (nomeadamente, pelo teste de Kruskal-Wallis). A opção por recorrer a um teste não-paramétrico, justifica-se pelo facto de não serem cumpridas, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Sempre que aplicável, nomeadamente, para comparação das taxa de sobrevivência, rendimento do cultivo, proporção de fases dos organismos, teor lipídico e perfil de ácidos gordos quando alimentados com as diferentes dietas, foi realizado a análise de variâncias pelo teste de comparações múltiplas de Tukey HSD de forma a detetar diferenças estatisticamente significativas entre as dietas e o tempo.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

3. Resultados

3.1. Curva de calibração da microalga *Rhodomonas baltica*

O crescimento da cultura, tal como referido na secção 2.1., foi seguido ao longo do tempo de cultivo através do número de células.mL⁻¹ e da medição da densidade ótica (Fig.11). O cultivo apresentou uma fase exponencial, em que se observou o crescimento do mesmo até ao 10º dia, contudo a partir deste mesmo dia o cultivo entrou na fase estacionária, estabilizando assim até ao dia 14.

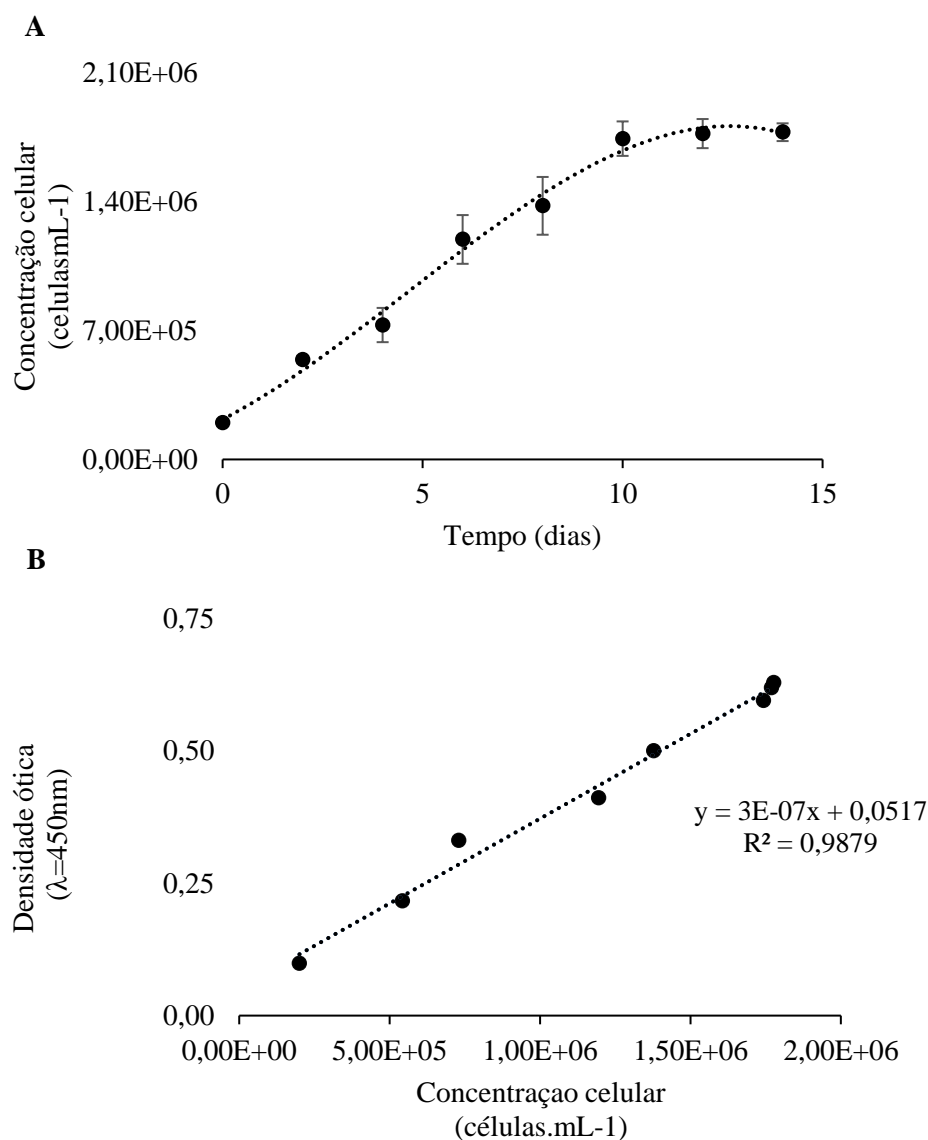


Figura 11 – A) Crescimento da microalga *Rhodomonas baltica* (número de células por mililitro ao longo do tempo de cultivo); B) Curva de calibração com base na evolução da densidade ótica a $\lambda=450\text{nm}$ e do número de células por mililitro

3.2. Taxa de eclosão

A taxa de eclosão, como referido na secção 2.4., foi determinado somente após as 24 horas de cultivo, observando o número de náuplios recém-eclodidos em cada copo.

De acordo com a Tabela I e com a Figura 12, ao fornecer microalga viva, congelada e liofilizada, a taxa de eclosão em média é de $61,50 \pm 6,75\%$, $49,50 \pm 0,54\%$ e $48,17 \pm 3,99\%$, respetivamente, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as dietas (Kruskal-Wallis; $H= 5,422$; $p\text{-value} > 0,05$). Contudo, podemos afirmar que é a dieta com microalga viva, a que apresenta uma taxa de eclosão ligeiramente superior às restantes dietas.

Tabela I- Taxa de eclosão (% , média±DP) dos organismos *Acartia tonsa* quando fornecidas as diferentes dietas

Taxa de eclosão (%)			
	Viva	Congelada	Liofilizada
#1	58,38	50,00	52,25
#2	55,25	48,75	49,50
#3	70,88	49,75	42,75
Média	61,50	49,50	48,17
DP	6,75	0,54	3,99

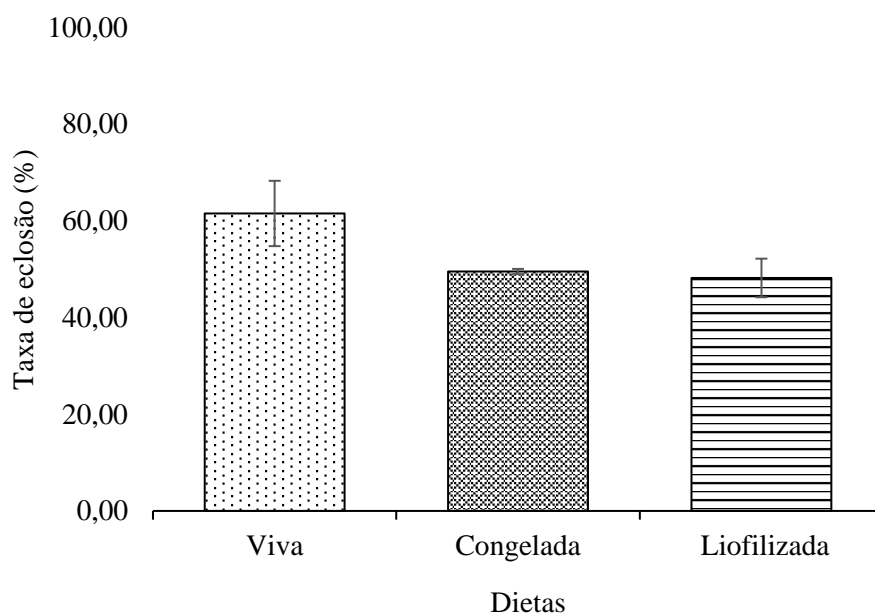


Figura 12 - Taxa de eclosão (% , média±DP) dos organismos *Acartia tonsa* quando fornecidas as diferentes dietas

3.3. Rendimento de cultivo e sobrevivência

Para a determinação da sobrevivência dos copépodes em relação às diferentes dietas, procedeu-se às contagens dos organismos observados nos dias em questão, obtendo assim, o rendimento do cultivo e as taxas de sobrevivência entre dias de cultivo. O rendimento do cultivo é a variação da densidade de cultivo de *A. tonsa* sujeita a diferentes dietas relativamente ao número inicial de ovos. De acordo com a Tabela II e com a Figura 13, podemos observar que a microalga viva, em média, levou a uma sobrevivência de $58,29 \pm 6,28$ % no 5º dia, de $51,54 \pm 5,46$ % no 10º dia e de $23,67 \pm 4,75$ no 14º dia, havendo assim diferenças estatisticamente significativas entre as três dietas (ANOVA, Tukey HSD; p-value < 0,05) e entre os dias de amostragem (ANOVA, Tukey HSD; p-value < 0,05). Pode-se assim afirmar que esta dieta com microalga viva é a que permite uma maior sobrevivência nos organismos, levando assim a um maior rendimento de cultivo. A dieta com microalga liofilizada é a segunda melhor dieta quando se refere à sobrevivência dos organismos e ao rendimento do cultivo, fornecendo uma taxa de sobrevivência, em média, $48,08 \pm 6,00$ % ao 5º dia, $34,79 \pm 5,97$ % ao 10º dia e de $22,54 \pm 7,50$ % ao 14º dia. A dieta baseada em microalga congelada é a que fornece menor sobrevivência, comparativamente às restantes, chegando ao 14º dia, uma sobrevivência dos organismos de 0%.

Tabela II- Rendimento do cultivo (% , média±DP) de organismos *Acartia tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas, ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo

Rendimento de cultivo (%)									
	Dia 5			Dia 10			Dia 14		
	Viva	Congelada	Liofilizada	Viva	Congelada	Liofilizada	Viva	Congelada	Liofilizada
#1	66,00	28,00	40,13	58,25	17,00	27,50	29,50	0,00	13,38
#2	50,63	25,75	54,63	44,88	0,00	34,75	17,88	0,00	22,50
#3	58,25	34,00	49,50	51,50	1,38	42,13	23,63	0,00	31,75
Média	58,29	29,25	48,08	51,54	9,19	34,79	23,67	0,00	22,54
DP	6,28	3,48	6,00	5,46	7,81	5,97	4,75	0,00	7,50

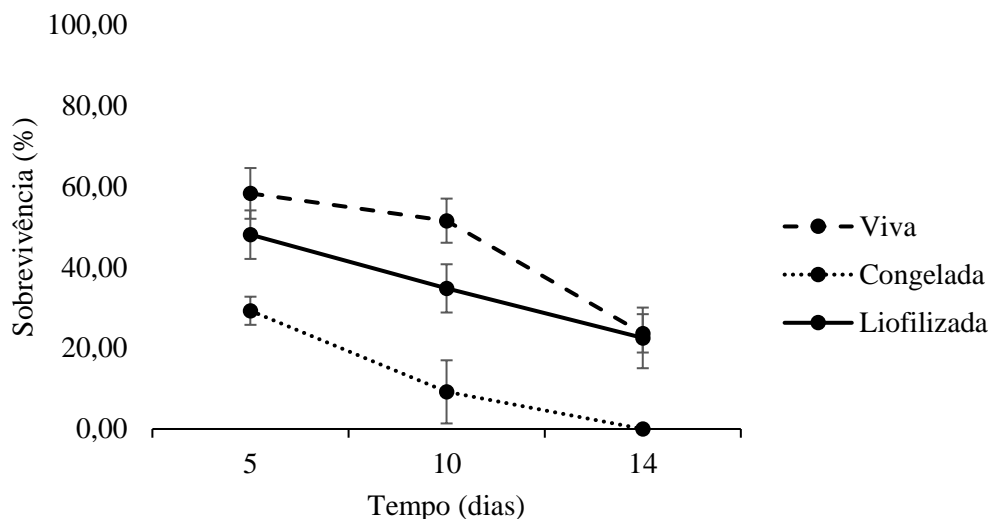


Figura 13 – Taxa de sobrevivência relativa ao rendimento do cultivo (% , média±DP) dos organismos *Acartia tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas, ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo

Para a observação da sobrevivência entre dias de amostragem procedeu-se à divisão do número de organismos observados ao dia 10 e ao dia 14 pelo número de organismos observados no dia de amostragem anterior, respetivamente (Tab. III e Fig. 14). Sendo assim podemos observar que a sobrevivência entre o dia 5 e o dia 10 é superior quando alimentados com microalga viva ($88,44 \pm 0,16\%$), comparativamente a quando alimentados com microalga congelada ($32,38 \pm 28,34\%$) e com microalga liofilizada ($72,42 \pm 9,19\%$). Contudo, entre o dia 10 e o dia 14, a dieta com microalga liofilizada foi a que forneceu maior sobrevivência nos organismos entre estes dias de amostragem ($62,92 \pm 10,99\%$), seguido da microalga viva ($45,45 \pm 4,42\%$) e por fim da dieta com microalga congelada onde se observou 0% de sobrevivência, ou seja 100% mortalidade. Existem diferenças estatisticamente significativas entre todas as dietas, exceto entre a dieta com microalga viva e liofilizada (ANOVA, Tukey HSD; p-value < 0,05).

Tabela III- Taxa de sobrevivência entre dias de amostragem (% , média±DP) de organismos *Acartia tonsa* alimentados com as diferentes dietas

	Sobrevivência (%)						
	Viva	Dia 5 a Dia 10			Dia 10 a Dia 14		
		Congelada	Liofilizada	Viva	Congelada	Liofilizada	
#1	88,26	60,71	68,54	50,64	0,00	48,64	
#2	88,64	0,00	63,62	39,83	0,00	64,75	
#3	88,41	4,04	85,10	45,87	0,00	75,37	
Média	88,44	32,38	72,42	45,45	0,00	62,92	
DP	0,16	28,34	9,19	4,42	0,00	10,99	

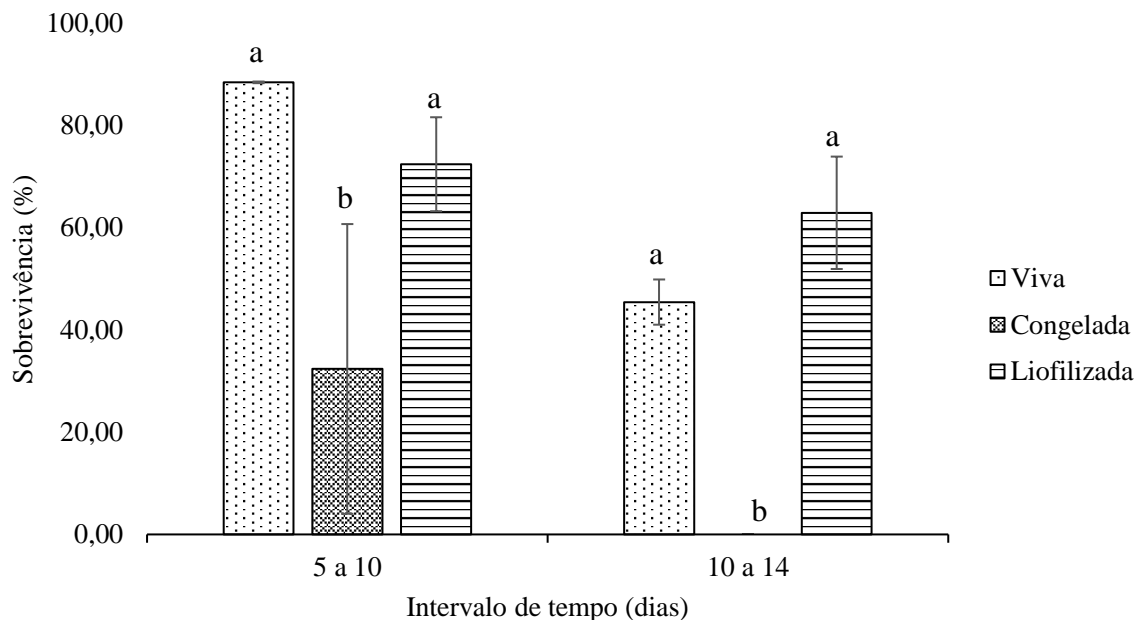


Figura 14 – Taxa de sobrevivência entre dias de amostragem (% , média±DP) de organismos *Acartia tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas; as letras **a** e **b** indicam as diferenças estatisticamente significativas a um p-value <0.05, entre dietas, em cada intervalo de tempo

3.4. Biomassa Total

Para a obtenção da Biomassa Total, procedeu-se à medição do comprimento total do organismo para as fases náuplio (CT, μm) e a medição do prossoma (P, μm) para as fases de copépodos e adultos, sendo de seguida introduzidos nos cálculos da Biomassa total (μg Peso Seco, PS). De acordo com a Tabela IV e com a Figura 15, podemos afirmar que a dieta com microalga viva, providencia uma quantidade maior de Biomassa total quando comparado com as restantes, nos três dias de amostragem, apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparada com as restantes dietas (Kruskal-Wallis; $H=18,322$; p-value <0,05). No 5º, 10º e 14º dia fornece, em média, $107,82 \pm 10,68\mu\text{g PS}$, $499,40 \pm 81,23\mu\text{g PS}$ e $452,51 \pm 99,43\mu\text{g PS}$, respetivamente.

A dieta com microalga liofilizada é a dieta seguinte com maior quantidade de Biomassa total dos organismos fornecendo ao 5º dia, $19,38 \pm 7,88\mu\text{g PS}$, ao 10º dia, $34,38 \pm 11,91\mu\text{g PS}$ e ao 14º dia, $29,31 \pm 11,91\mu\text{g PS}$. Em relação à microalga congelada, esta fornece um aumento da biomassa total nos 10 primeiros dias, 5º dia, $7,81 \pm 1,49\mu\text{g PS}$, 10ºdia, $11,13 \pm 10,03\mu\text{g PS}$. No 14º dia não se obteve biomassa total, devido à ausência de organismos desta dieta a este dia de amostragem. Em relação ao fator tempo, não se obteve

diferenças estatisticamente significativamente entre os mesmos (Kruskal- Wallis; H=3,339; p-value >0,05).

Tabela IV- Biomassa Total ($\mu\text{g PS}$, média \pm DP) dos organismos *Acartia tonsa* alimentados com as diferentes dietas ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo

Biomassa Total ($\mu\text{g PS}$)									
	Viva			Congelada			Liofilizada		
	5d	10d	14d	5d	10d	14d	5d	10d	14d
Média	107,82	499,40	452,51	7,81	11,13	0,00	19,38	34,38	29,31
DP	10,68	81,23	99,43	1,49	10,03	0,00	7,88	11,69	11,91

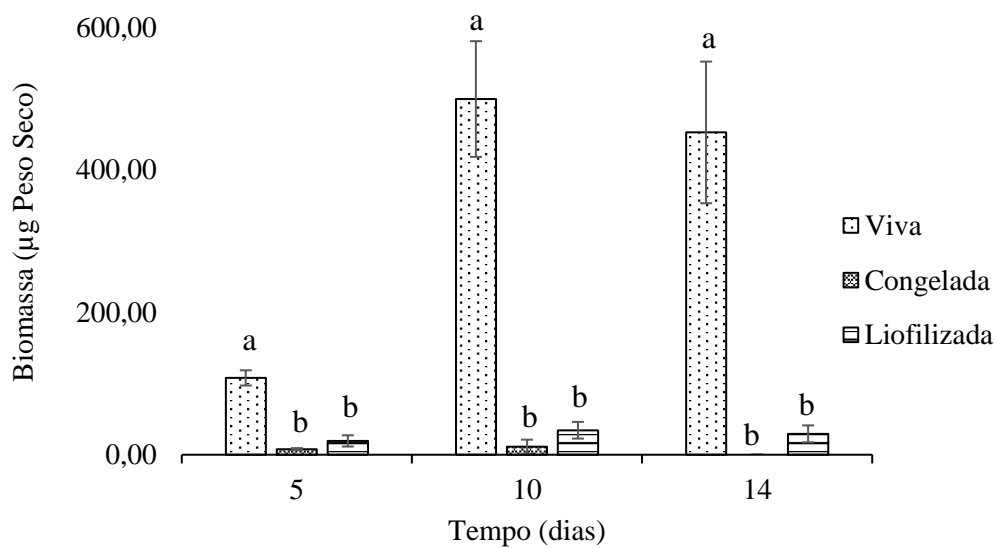


Figura 15 – Biomassa Total (μg Peso Seco, média \pm DP) dos organismos *Acartia tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo; as letras **a** e **b** indicam as diferenças estatisticamente significativas a um p-value <0,05, em cada tempo

3.5. Crescimento do cultivo

O crescimento do cultivo foi avaliado através da identificação dos estágios de desenvolvimento dos copépodes e respectivas proporções ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo. Em relação à proporção de fases do ciclo de vida dos organismos *A. tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas ao longo do tempo, podemos observar que é a dieta com microalga viva que fornece o alcance de fases mais avançadas do ciclo de vida dos copépodes, em menor tempo (Tab. V). Ou seja, ao 5º dia pode-se observar cerca de 30% do total de organismos, na fase de copépoditos, acontecimento que não se observou no mesmo tempo de amostragem, nas dietas congelada e liofilizada. Outra importante observação a retirar da tabela é a totalidade de organismos em fase de copépoditos nos dias de amostragem 10 e 14 quando alimentados com microalga viva. Sendo assim, foram encontradas diferenças estatisticamente nos organismos em fase de copépodito (CII, CIII, CIV, CV e CVI) quando alimentados com microalga viva e quando alimentados com as dietas com microalga congelada e liofilizada (Kruskal-Wallis; $H=10,320$; $H=12,442$; $H=12,451$; $H=12,442$; $H=12,451$; $p\text{-value} < 0,05$). Podemos também observar que na dieta com microalga viva, ao 14º dia, 34,3% dos organismos encontram-se na fase de copépoditos VI (CVI), podendo denominar-se assim como a fase de adultos, começando posteriormente a produção de ovos.

Em relação à dieta com microalga congelada e liofilizada, ambas apenas levaram aos organismos o alcance à fase de náuplios e copépoditos. Apenas foram observados organismos na fase de NI, ao dia 5 de amostragem, quando alimentados com microalga congelada e liofilizada, apresentando assim diferenças estatisticamente significativas entre os organismos observados no dia 5 e nos dias 10 e 14 de amostragem. O alcance à fase de copépoditos foi apenas observado ao 10º dia em ambas dietas, tendo uma proporção de 20,5% na dieta com microalga congelada e de 6,33% na dieta com microalga liofilizada. Podemos também observar, na dieta com microalga liofilizada, a proporção de organismos na fase de copépoditos I (CI) de 48% e na fase de copépoditos I (CII) de 0,33%.

Tabela V– Distribuição (% , média±DP) das diferentes fases de desenvolvimento de *Acartia tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas, ao fim de 5, 10 e 14 dias de cultivo

Estágio	Dia 5			Dia 10			Dia 14		
	Viva	Congelada	Liofilizada	Viva	Congelada	Liofilizada	Viva	Congelada	Liofilizada
NI	0	43,00	23,67	0	0	0	0	0	0
NII	0	56,33	56,67	0	23,18	14,67	0	0	6,00
NIII	6,00	0	19,33	0	24,14	52,00	0	0	22,67
NIV	21,67	0,67	0,33	0	29,18	21,33	0	0	22,33
NV	39,33	0	0	0	2,50	3,67	0	0	0,33
NVI	3,33	0	0	0	0,50	2,00	0	0	0,33
CI	29,33	0	0	13,67	20,50	6,33	1,67	0	48,00
CII	0,33	0	0	25,00	0	0	2,67	0	0,33
CIII	0	0	0	22,33	0	0	9,33	0	0
CIV	0	0	0	21,67	0	0	13,33	0	0
CV	0	0	0	14,67	0	0	38,67	0	0
CVI	0	0	0	2,67	0	0	34,33	0	0

3.6. Taxa de produção de ovos

Para a taxa de produção de ovos, procedeu-se à contagem dos ovos e das fêmeas presentes em cada réplica de cada dieta. Apenas na dieta com microalga viva se conseguiu obter a taxa de produção de ovos, devido à ausência de adultos nas dietas com microalga congelada e liofilizada (ver secção 3.3.), levando assim à ausência de fêmeas, nestas mesmas dietas. Sendo assim, a dieta com microalga viva fornece uma produção de ovos, em média, de $6,52 \pm 0,22$ ovos/fêmea (Tab. VI e Fig. 16).

Tabela VI– Taxa de produção de ovos (ovos/fêmea/dia) dos organismos *Acartia tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas

Produção de ovos (ovos/fêmea/dia)			
	Viva	Congelada	Liofilizada
#1	6,21	0	0
#2	6,72	0	0
#3	6,62	0	0
Média	6,52	0	0
DP	0,22	0	0

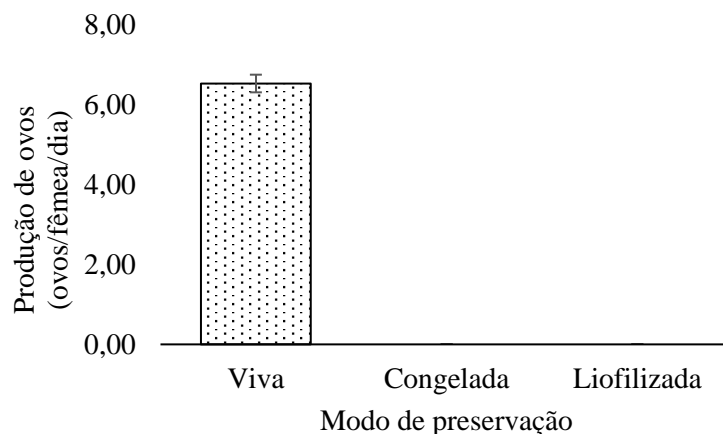


Figura 16 – Taxa de produção de ovos (ovos/fêmea/dia, média±DP) dos organismos *Acartia tonsa* quando alimentados com as diferentes dietas

3.7. Teor lipídico da microalga *Rhodomonas baltica*

Em relação ao teor de lípidos totais (%), pode -se observar que na microalga viva observou-se um maior teor ($12,61 \pm 0,99\%$), seguido da microalga congelada e liofilizada que obtiveram um menor teor lipídico ($11,41 \pm 1,28\%$, $10,81 \pm 0,66\%$, respetivamente) (Tab. VII e Fig. 17). Observaram-se apenas diferenças estatisticamente significativas entre a microalga viva e liofilizada (ANOVA, Tukey HSD; p-value <0,05).

Tabela VII – Valores do teor lipídico (% , média±DP) dos organismos *Acartia tonsa* quando alimentados com os diferentes modos de preservação

Teor lipídico (%)			
	Viva	Congelada	Liofilizada
Média	12,61	11,41	10,81
DP	0,99	1,28	0,66

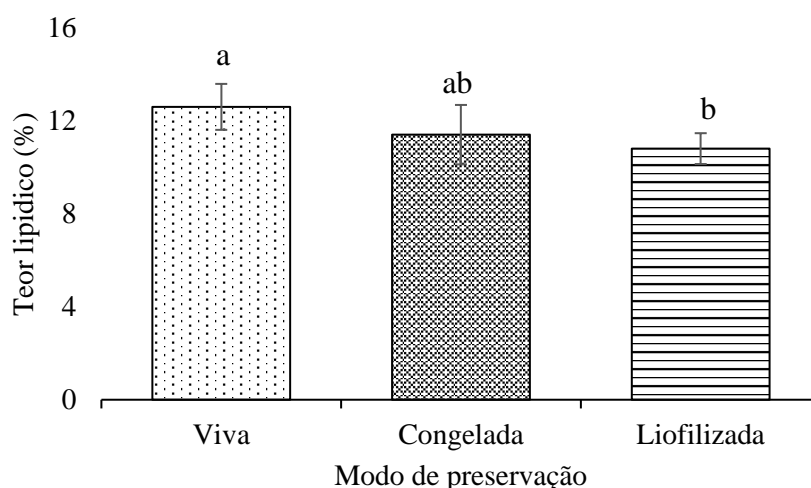


Figura 17 – Teor lipídico (% , média \pm DP) obtido dos diferentes modos de preservação; as letras **a** e **b** indicam as diferenças estatisticamente significativas a um p-value <0.05

3.8. Perfil de ácidos gordos

Para a análise do perfil em ácidos gordos da microalga em diferentes modos de preservação obtiveram-se cromatogramas semelhantes ao da Figura 18. Os picos foram identificados por comparação com os padrões referidos anteriormente na secção 2.5.3.

De acordo com a Tabela VIII, podemos observar que existe uma maior quantidade de ácido mirístico (C14:0) na microalga liofilizada ($3,64 \pm 0,23\%$) comparadamente à microalga viva e congelada ($2,78 \pm 0,36\%$ e $2,88 \pm 0,25$, respetivamente) havendo assim diferenças estatisticamente significativas entre a microalga liofilizada quando comparada com as restantes (ANOVA de um fator, Tukey HSD, p-value $< 0,05$). Em relação ao ácido palmítico (C16:0), existe uma maior quantidade deste ácido na microalga viva e congelada ($13,68 \pm 0,21\%$ e $13,36 \pm 0,14\%$, respetivamente), sendo as únicas diferenças estatisticamente significativas encontradas entre a microalga viva e microalga liofilizada (Kruskal-Wallis, $H= 12,363$, p-value $< 0,05$). Podemos observar que o ácido palmitoleico (C16:1 *n-7*) existe em maior quantidade na microalga viva e congelada ($8,84 \pm 0,19\%$ e $8,63 \pm 0,20\%$, respetivamente) quando comparada com a microalga liofilizada ($3,05 \pm 0,67\%$), sendo que se observaram diferenças estatisticamente significativas entre microalga liofilizada com as restantes (Kruskal-Wallis, $H= 12,316$, p-value $< 0,05$). Em relação aos ácidos elaídico (C18:1 *n-9 trans*) e oleico (C18:1 *n-9 cis*), existe uma menor quantidade na

microalga liofilizada ($0,28 \pm 0,19\%$ e $0,30 \pm 0,23\%$, respectivamente) quando comparados com as restantes, existindo apenas diferenças estatisticamente significativas, na quantidade de ácido oleico entre a microalga viva e liofilizada (ANOVA; Tukey HSD, p-value < 0,05). Em relação ao ácido vacénico (C18:1 *n*-7), observaram-se valores semelhantes entre modos de preservação, levando assim á inexistência de diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis, H= 2,552, p-value > 0,05) entre estes.

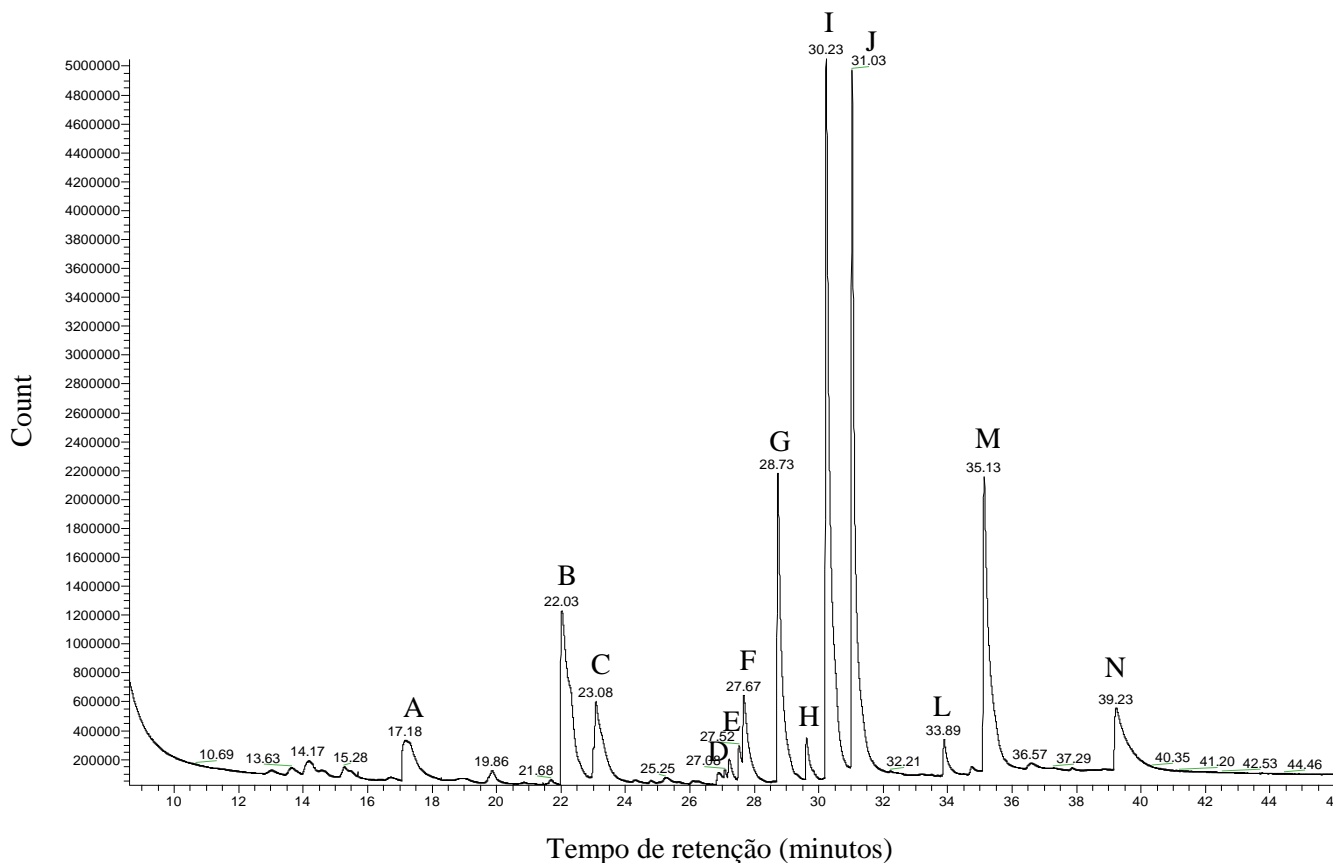


Figura 18 - Cromatograma ilustrativo dos resultados obtidos na análise dos ácidos gordos dos diferentes modos de preservação com *Rhodomonas baltica*. As letras identificam os ácidos gordos mais significativos, onde **A** é ácido mirístico (C14:0), **B** é ácido palmítico (C16:0), **C** é ácido palmitoleico (C16:1 *n*7), **D** é ácido elaídico (C18:1 *n*9 *trans*), **E** é ácido oleico (C18:1 *n*9 *cis*), **F** é ácido vacénico (C18:1 *n*7), **G** é ácido linoleico (C18:2 *n*6), **H** é γ -ácido linoleico (C18:3 *n*6), **I** é α -ácido linoleico (ALA) (C18:3 *n*3), **J** é ácido estearidónico (C18:4 *n*3), **L** é ácido araquidónico (AA) (C20:4 *n*6), **M** é ácido eicosapentaenóico (EPA) (C20:5 *n*3) e **N** é o ácido docosa-hexaenóico (DHA) (C22:6 *n*3)

Podemos afirmar que o ácido linoleico (C18:2 *n*-6) existe em maior quantidade na microalga liofilizada ($11,33 \pm 1,55\%$) quando comparado com as restantes, existindo assim diferenças estatisticamente significativas neste modo de preservação quando comparado com os restantes (Kruskal-Wallis, $H= 11,789$, $p\text{-value} < 0,05$). Em relação ao γ -Ácido linoleico (C18:3 *n*-6) existe em maior quantidade nas microalga viva e congelada ($1,26 \pm 0,15\%$ e $1,32 \pm 0,05\%$, respetivamente) quando comparada com a microalga liofilizada ($0,89 \pm 0,08\%$), sendo que se observaram diferenças estatisticamente significativas entre a microalga liofilizada com as restantes (Kruskal-Wallis, $H= 11,183$, $p\text{-value} < 0,05$). Podemos observar que o α -Ácido linoleico (C18:3 *n*-3) (ALA) existe em maior quantidade na microalga liofilizada ($25,84 \pm 1,63\%$) quando comparado com os restantes modos de preservação, existindo assim diferenças estatisticamente significativas na microalga liofilizada quando comparada com as restantes (Kruskal-Wallis, $H= 12,226$, $p\text{-value} < 0,05$). Em relação ao ácido estearidónico (C18:4 *n*-3) existe em maior quantidade na microalga liofilizada ($19,95 \pm 1,22\%$) quando comparado com os restantes modos de preservação, existindo apenas diferenças estatisticamente significativas na microalga liofilizada quando comparada com a microalga viva (Kruskal-Wallis, $H= 8,121$, $p\text{-value} < 0,05$). Em relação ao ácido araquidónico (AA) (C20:4 *n*-6) existe em maior quantidade na microalga viva e congelada ($1,54 \pm 0,10\%$ e $1,65 \pm 0,05\%$, respetivamente) quando comparada com a microalga liofilizada ($0,89 \pm 0,06\%$), sendo que se observaram diferenças estatisticamente significativas entre a microalga liofilizada com as restantes (ANOVA, Tukey HSD, $p\text{-value} < 0,05$). Podemos observar que o ácido eicosapentaenóico (EPA) (C20:5 *n*-3) existe em maior quantidade na microalga liofilizada ($13,50 \pm 0,48\%$) quando comparado com os restantes modos de preservação, existindo assim diferenças estatisticamente significativas nesta dieta quando comparada com as restantes (ANOVA, Tukey HSD, $p\text{-value} < 0,05$). Em relação ao ácido docosa-hexaenóico (DHA) (C22:6 *n*-3) existe em maior quantidade na microalga viva e congelada ($5,17 \pm 0,74\%$ e $4,90 \pm 0,58\%$, respetivamente) quando comparada com a microalga liofilizada ($4,24 \pm 0,60\%$), sendo que não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre modos de preservação (ANOVA, $p\text{-value} > 0,05$).

Em relação aos ácidos gordos saturados (SFA) a microalga viva e congelada apresentaram valores superiores, $16,45 \pm 0,31\%$ e $16,24 \pm 0,17\%$ respectivamente, em relação à microalga liofilizada que apresentou uma quantidade destes ácidos gordos, de $15,62 \pm 0,93\%$, contudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de SFA quando comparados os diferentes modos de preservação. Quando comparada a quantidade de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) de cada modo de preservação, pode-se observar que a microalga viva e congelada apresentaram um valor superior, $12,59 \pm 0,18\%$ e $12,25 \pm 0,20\%$ respectivamente, quando comparado com o valor da microalga liofilizada, $6,37 \pm 0,67\%$, apresentando diferenças estatisticamente significativas entre este modo de preservação quando comparado com os restantes (ANOVA, Tukey HSD; p-value < 0,005). Em relação aos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) existe em maior quantidade na microalga liofilizada ($76,59 \pm 1,98\%$) quando comparada com a microalga viva e congelada ($68,84 \pm 0,47\%$ e $69,51 \pm 0,39\%$, respectivamente) sendo que se observaram apenas diferenças estatisticamente significativas quando comparado o teor de PUFA entre a microalga liofilizada com as restantes (Kruskal-Wallis, H= 13,661, p-value < 0,05).

A microalga liofilizada apresentou uma quantidade superior de ácidos gordos ω -3 ($63,53 \pm 3,17\%$) quando comparada com a microalga viva e congelada ($56,29 \pm 0,57\%$ e $56,88 \pm 0,43\%$, respectivamente) sendo que se observaram apenas diferenças estatisticamente significativas quando comparado o teor de ácidos gordos ω -3 entre a microalga liofilizada com as restantes (Kruskal-Wallis, H= 10,398, p-value < 0,05). A microalga viva e congelada apresentaram valores inferiores no teor de ácidos gordos ω -6 e ao rácio ω -3/ ω -6, aproximadamente 13% e 4,50% respectivamente, em relação à microalga liofilizada que apresentou uma quantidade destes ácidos gordos, de $13,05 \pm 1,48\%$ e $4,87 \pm 0,66\%$ respectivamente, contudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de ácidos gordos ω -6 e no rácio ω -3/ ω -6 quando comparados os diferentes modos de preservação.

Tabela VIII– Perfil de ácidos gordos dos diferentes modos de preservação (média % ácidos gordos totais \pm DP), fornecidas aos copépodes *Acartia tonsa*

Ácido Gordo	Nome Comum	Modos de preservação		
		Viva	Congelada	Liofilizada
C14:0	Ácido mirístico	2,78 \pm 0,36 ^a	2,88 \pm 0,25 ^a	3,64 \pm 0,23 ^b
C16:0	Ácido palmítico	13,68 \pm 0,21 ^a	13,36 \pm 0,14 ^{ab}	11,98 \pm 0,77 ^b
C16:1 n-7	Ácido palmitoleico	8,84 \pm 0,19 ^a	8,63 \pm 0,20 ^a	3,05 \pm 0,67 ^b
C18:1 n-9 <i>trans</i>	Ácido elaídico	0,44 \pm 0,03 ^a	0,43 \pm 0,02 ^a	0,28 \pm 0,19 ^a
C18:1 n-9 <i>cis</i>	Ácido óleico	0,61 \pm 0,16 ^a	0,53 \pm 0,01 ^{ab}	0,30 \pm 0,23 ^b
C18:1 n-7	Ácido vacénico	2,71 \pm 0,07 ^a	2,66 \pm 0,06 ^a	2,74 \pm 0,32 ^a
C18:2 n-6	Ácido linoleico	9,77 \pm 0,16 ^a	9,66 \pm 0,11 ^a	11,33 \pm 1,55 ^b
C18:3 n-6	γ -Ácido linoleico	1,26 \pm 0,15 ^a	1,32 \pm 0,05 ^a	0,89 \pm 0,08 ^b
C18:3 n-3	α -Ácido linoleico (ALA)	21,48 \pm 0,46 ^a	21,81 \pm 0,17 ^a	25,84 \pm 1,63 ^b
C18:4 n-3	Ácido estearidónico	17,58 \pm 0,23 ^a	17,76 \pm 0,11 ^{ab}	19,95 \pm 1,22 ^b
C20:4 n-6	Ácido araquidónico (AA)	1,54 \pm 0,10 ^a	1,65 \pm 0,05 ^a	0,84 \pm 0,06 ^b
C20:5 n-3	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	12,05 \pm 0,42 ^a	12,42 \pm 0,08 ^a	13,50 \pm 0,48 ^b
C22:6 n-3	Ácido docosa-hexaenóico (DHA)	5,17 \pm 0,74 ^a	4,90 \pm 0,58 ^a	4,24 \pm 0,60 ^a
Σ SFA		16,45 \pm 0,31 ^a	16,24 \pm 0,17 ^a	15,62 \pm 0,93 ^a
Σ MUFA		12,59 \pm 0,18 ^a	12,25 \pm 0,20 ^a	6,37 \pm 0,67 ^b
Σ PUFA		68,84 \pm 0,47 ^a	69,51 \pm 0,39 ^{ab}	76,59 \pm 1,98 ^b
ω -3		56,29 \pm 0,57 ^a	56,88 \pm 0,43 ^{ab}	63,53 \pm 3,17 ^b
ω -6		12,56 \pm 0,29 ^a	12,63 \pm 0,10 ^a	13,05 \pm 1,48 ^a
ω -3/ ω -6		4,48 \pm 0,14 ^a	4,50 \pm 0,06 ^a	4,87 \pm 0,66 ^a

a e b representam as diferenças estatisticamente significativas (p <0,05).

4. Discussão de resultados

Nos últimos anos, tem vindo a ser realizado um conjunto de estudos que apontam para a mais-valia da utilização de copépodes como alimento vivo (Rajkumar & Kumaraguru vasagam, 2006; Ajiboye *et al.*, 2011; Dhont *et al.*, 2013) em alternativa às dietas frequentemente utilizadas em aquacultura (ex. rotíferos e artémia). Apesar da sua mais-valia em termos nutricionais e consequentes efeitos positivos (Das *et al.*, 2012) persistem alguns constrangimentos de ordem zootécnica (ex. sistemas de cultivo e tipo de dieta) que importam ultrapassar no futuro próximo por forma a massificar o uso dos copépodes em aquacultura (Payne & Rippingale, 2000). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do processamento da microalga *Rhodomonas baltica* no crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e produção de ovos do copépode *Acartia tonsa*.

Estudos anteriores sobre o efeito de *R. baltica* na produtividade de copépodes calanoides para o uso em aquacultura, focaram-se sobretudo na produção de ovos (da Costa & Fernández, 2002; McKinnon *et al.*, 2003; Morehead *et al.*, 2005; Milione *et al.*, 2007), no sucesso de eclosão e no crescimento de náuplios e seu desenvolvimento (Lacoste *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006; Peck & Holste, 2006).

De entre o conjunto de microalgas utilizadas no cultivo de copépodes, a espécie *Rhodomonas* spp. tem demonstrado os melhores resultados quando testada de forma exclusiva ou em conjunto com outras microalgas, em espécies do género *Acartia* (Ismar *et al.*, 2008) incluindo *A. tonsa* (Berggreen *et al.*, 1988; Jepsen *et al.*, 2007; Milione *et al.*, 2007), *A. tranteri* (Morehead *et al.*, 2005) e *A. sinjiensis* (McKinnon *et al.*, 2003). *Rhodomonas* sp., assume-se como uma excelente dieta para *Acartia sinjiensis*, pois de acordo com Knuckey *et al.*, (2005), leva a uma maior taxa de sobrevivência e a um rápido desenvolvimento, alcançando estádios de desenvolvimento mais avançados quando comparado com copépodes alimentados com *Isochrysis* sp.. Quando administrada a microalga *Tetraselmis* sp., a esta espécie de copépodes, estes desenvolvem-se ao mesmo tempo que os alimentados com *Rhodomonas* sp., contudo o seu desenvolvimento diminui a partir da fase de copépoditos apresentando algumas deformações ao nível das cerdas, reduzida produção e taxa de eclosão de ovos.

As microalgas *Rhodomonas* spp., são consideradas microalgas de elevada qualidade nutricional contendo na sua composição concentrações elevadas de EPA, DHA e ácido linoleico. Tal característica, é refletida nas elevadas taxas de produção de ovos e taxas de crescimento de náuplios em *A. tonsa* (Tang *et al.*, 2001). De acordo com o estudo de Holste & Peck (2006), após fornecimento de *R. baltica* às fêmeas de *A. tonsa*, cerca de 75% de ovos eclodiram em condições de salinidade 30 e temperatura 18°C. Comparativamente ao presente estudo, observou-se uma taxa de eclosão aproximadamente de 62%, valor inferior ao anteriormente referido por Holste & Peck (2006), isto pode-se dever às diferentes temperaturas em ambos os estudos.

A produtividade dos copépodes, ou seja todo o processo de cultivo de copépodes, englobando este a produção de ovos, eclosão dos mesmos e desenvolvimento dos organismos é dependente de elevados requerimentos nutricionais, especialmente em ácidos gordos polinsaturados (DHA e EPA). Estes ácidos gordos são conhecidos como compostos que afetam o sucesso de eclosão e desenvolvimento embrionário. De acordo com Camus (2012), existe uma possível relação entre a quantidade de DHA e a superior taxa de eclosão de ovos de *A. tonsa* em contacto com a dieta com *Rhodomonas* sp. viva. Este acontecimento não se observou, neste estudo, quando se administrou microalga congelada ou liofilizada, dietas que possuem menor quantidade de DHA.

Dado serem organismos filtradores seletivos, os copépodes do género *Acartia* sp. podem preferencialmente selecionar microalgas vivas em virtude da sua mobilidade e desse modo evitar a ingestão de células mortas resultantes de um processo de congelação ou liofilização. É também possível que as microalgas mortas não se mantenham completamente em suspensão na coluna de água tal como a microalga viva, diminuindo as oportunidades de contacto, podendo no entanto o aumento do arejamento impedir a deposição das células junto ao fundo dos cultivos (Milione *et al.*, 2007).

De acordo com estudo de Cnudde *et al.*, (2011) observou-se uma maior assimilação de *Seminavis robusta* viva por parte do copépode *Paramphiascella fulvofasciata* quando comparada com o fornecimento desta microalga na forma liofilizada. Esta seletividade em relação à microalga viva pode ser devido a características químicas da célula viva levando assim a preferências alimentares, resultando numa maior ingestão de células, maior assimilação e digestibilidade.

No presente estudo, o teor lipídico e o perfil de ácidos gordos da *R. baltica* viva em está em concordância com o estudo de (Huerlimann *et al.*, 2010). Contudo a inexistência de estudos anteriores em que se observe a determinação do teor lipídico e do perfil de ácidos gordos após processo de liofilização, impede a respetiva comparação. Apesar disso, foi constatado no presente estudo um aumento do teor de PUFA quando comparado com o teor em microalga viva ou congelada, sendo de especial atenção o facto da preservação do seu valor nutricional, como refere Navarro *et al.*, (2001).

Neste estudo, quando comparado com os resultados obtidos com microalga viva, observou-se um menor efeito da microalga liofilizada na taxa de eclosão, taxa de sobrevivência, no desenvolvimento e na biomassa total do cultivo dos copépodes *Acartia tonsa*. Estes resultados estão em concordância com alguns trabalhos realizados anteriormente em que forneceram microalga liofilizada. De acordo com Coutinho *et al.*, (2006), a suplementação de dietas com *Isochrysis galbana* liofilizada como substituto de proteína de peixe, teve um efeito negativo no crescimento e sobrevivência de larvas de *Carassius auratus*, diminuindo em cerca de 20% na sobrevivência quando comparada com dietas apenas constituídas com microalga viva. De acordo com o estudo de Dobberfuhl & Elser (1999), o fornecimento de *Scenedesmus acutus* na forma liofilizada foi letal para *Daphnia magna*. Após 3 dias, apresentaram uma sobrevivência de 40% sendo que no dia seguinte apresentaram mortalidade total no tratamento com microalga liofilizada.

Contudo a sua utilização providencia efeitos positivos a certos organismos. De acordo com Cañavate & Fernández-Díaz (2001), adicionar quer *N. gaditana* ou *Isochrysis galbana* viva e/ou liofilizada diretamente nos tanques com larvas de *Sparus aurata* ou no processo de enriquecimento de rotíferos com *I. galbana*, permite obter taxas de crescimento e de sobrevivência semelhantes ao fim de 43 dias de cultivo.

Tal como concluído por Albentosa *et al.*, (1997), além de larvas de peixe, o fornecimento de microalga liofilizada leva a efeitos benéficos nos estágios iniciais do cultivo de bivalves. O seu uso tem levado ao sucesso ao nível do crescimento de larvas de ameijoia *Mercenaria mercenaria* e de larvas de ostra da espécie *Saccostrea glomerata* (Heasman *et al.*, 2000). Foi igualmente observado no estudo de Albentosa *et al.*, (1997), que o uso de *I. galbana* e *Phaeodactylum tricornutum* congelada e liofilizada como dieta no cultivo da semente de *Ruditapes decussatus*, conduz a menores taxas de crescimento quando comparada com o fornecimento de microalga viva. Contudo, a substituição de uma

proporção da microalga liofilizada por viva (20%) resultou num aumento significativo na taxa de crescimento das sementes.

Em estudos de enriquecimento de rotíferos *Brachionus plicatilis* podemos observar a substituição de microalga congelada, sem perdas significativas de conteúdo de ácidos gordos essenciais (EPA e DHA). Esta substituição levou à obtenção similar de biomassa de rotíferos na dieta com microalga congelada quando comparada com a microalga viva, sendo este um aspeto positivo na indução do crescimento e sobrevivência de diversas larvas de peixe quando alimentadas com microalga congelada (Lubzens *et al.*, 1995). Em estudos com larvas de dourada *Sparus aurata*, o fornecimento de rotíferos enriquecidos com *Nannochloropsis oculata* liofilizada e de *N. oculata* liofilizada diretamente nos tanques levou a uma sobrevivência de 100%. Contudo, a sobrevivência registou um valor de 50% nas larvas alimentadas com rotíferos enriquecidos com *N. oculata* liofilizada mas sem adição de *N. oculata* liofilizada diretamente nos tanques (Navarro & Sarrasquete, 1998).

Outro fator vantajoso na adição de microalga liofilizada em cultivos, diz respeito à ausência de respiração por parte de fitoplâncton, ou seja, apenas os organismos predadores consomem oxigénio levando assim, conjugado com os benefícios que a microalga liofilizada fornece aos organismos ao nível da sobrevivência e crescimento, uma maior taxa de sucesso das maternidades (Lombard, *et al.*, 2005).

Um bom método para produção de microalgas com tempo de armazenamento prolongado é o método de liofilização, resultando em dietas que são basicamente idênticas às dietas com microalga viva, nomeadamente no tamanho, forma e composição bioquímica (Grima *et al.*, 1994). O potencial do uso desta dieta indica que este tipo de alimento pode promover uma gestão mais fácil na produção de larvas de peixe e outros organismos. Obtendo produto liofilizado que possui propriedades semelhantes à microalga viva podendo ser transportada e armazenada durante longos períodos, providencia claros benefícios às unidades de produção aquícolas (Cañavate & Fernández-Díaz, 2001; Seychelles *et al.*, 2009). Além do mais, de acordo com bibliografia referida anteriormente e com os resultados obtidos no presente estudo no que diz respeito à superior percentagem de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) da microalga *Rhodomonas* sp. no estado liofilizado, existe um potencial de utilização muito interessante que pode para o sucesso dos processos produtivos em maternidades de bivalves e de peixes que mantenham o cultivo de alimento vivo, mais propriamente de rotíferos.

Tendo por base os resultados obtidos num número reduzido de estudos que abordam os efeitos que diferentes processos de preservação (congelamento e liofilização) de *Rhodomonas* sp. no cultivo copépodes calanoides do género *Acartia*, conjugados com os dados obtidos no presente estudo, pode-se concluir sobre a inadequação do uso em exclusivo deste tipo de dietas na produção de copépodes. Um aspeto que importa a avaliar no futuro próximo, diz respeito ao efeito da adição da microalga *Rhodomonas baltica* no estado liofilizado em suplemento à dieta com microalga viva no cultivo de copépodes

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Bibliografía

- Abate, T. G., Nielsen, R., Nielsen, M., Jepsen, P. M., & Hansen, B. W. (2016). A cost-effectiveness analysis of live feeds in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) farming: copepods versus artemia. *Aquaculture nutrition*, 22(4), 899-910;
- Ajiboye, O. O., Yakubu, A. F., Adams, T. E., Olaji, E. D., & Nwogu, N. A. (2011). A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(2), 225-246;
- Alajmi, F., & Zeng, C. (2015). Evaluation of microalgal diets for the intensive cultivation of the tropical calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Aquaculture Research*, 46(5), 1025-1038;
- Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., & Fernández-Reiriz, M. J. (1997). Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture* 154(3-4), 305-321;
- Alver, M. O., Storøy, W., Bardal, T., Overrein, I., Onsøyen, M. K., Tennøy, T., & Øie, G. (2011). Automatic measurement of *Acartia tonsa* nauplii density, and estimation of stage distribution. *Aquaculture*, 313(1-4), 100-106;
- Anzueto-Sánchez, M. A., Barón-Sevilla, B., Cordero-Esquivel, B., & Celaya-Ortega, A. (2014). Effects of food concentration and temperature on development, growth, reproduction and survival of the copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus*. *Aquaculture international*, 22(6), 1911-1923;
- Barroso, M. V., De Carvalho, C. V. A., Antoniassi, R., & Cerqueira, V. R. (2013). Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture*, 388, 153-158;
- Becker, W. (2004). 18 Microalgae in Human and Animal Nutrition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 312-351;
- Berggreen, U., Hansen, B., & Kiørboe, T. (1988). Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: Implications for determination of copepod production. *Marine Biology*, 99(3), 341-352;
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9: 393-401;
- Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3, 281-292;

- Calliari, D., Andersen, C. M., Thor, P., Gorokhova, E., & Tiselius, P. (2006). Salinity modulates the energy balance and reproductive success of co-occurring copepods *Acartia tonsa* and *A. clausi* in different ways. *Marine Ecology Progress Series*, 312, 177-188;
- Camus, T. (2012). The improvement of copepods intensive culture protocols as live feeds for aquaculture hatcheries. (Doctoral dissertation, James Cook University);
- Camus, T., & Zeng, C. (2009). The effects of stocking density on egg production and hatching success, cannibalism rate, sex ratio and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 287(1-2), 145-151;
- Cañavate, J. P., & Fernández-Díaz, C. (2001). Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193(3-4), 257-269;
- Chinnery, F. E., & Williams, J. A. (2004). The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. *Marine Biology*, 145(4), 733-738;
- Cnudde, C., Willems, A., Van Hoorde, K., Vyverman, W., Moens, T., & De Troch, M. (2011). Effect of food preservation on the grazing behavior and on the gut flora of the harpacticoid copepod *Paramphiascella fulvofasciata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(1), 63-69;
- Conceição, L. E., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5), 613-640;
- Coutinho, P., Rema, P., Otero, A., Pereira, O., & Fábregas, J. (2006). Use of biomass of the marine microalga *Isochrysis galbana* in the nutrition of goldfish (*Carassius auratus*) larvae as source of protein and vitamins. *Aquaculture Research*, 37(8), 793-798;
- da Costa, R. M., & Fernández, F. (2002). Feeding and survival rates of the copepods *Euterpina acutifrons* Dana and *Acartia grani* Sars on the dinoflagellates *Alexandrium minutum* Balech and *Gyrodinium corsicum* Paulmier and the Chryptophyta *Rhodomonas baltica* Karsten. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 273(2), 131-142;
- Das, P., Mandal, S. C., Bhagabati, S. K., Akhtar, M. S., & Singh, S. K. (2012). Important live food organisms and their role in aquaculture. *Frontiers in Aquaculture*, 5(4), 69-86;
- de Morais, L. T., & Bodiou, J. Y. (1984). Predation on meiofauna by juvenile fish in a western Mediterranean flatfish nursery ground. *Marine Biology*, 82(2), 209-215;
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (pp. 157-202);
- Dobberfuhl, D. R., & Elser, J. J. (1999). Use of dried algae as a food source for zooplankton growth and nutrient release experiments. *Journal of Plankton Research*, 21(5); 957-970;

- Drillet, G., Iversen, M. H., Sørensen, T. F., Ramløv, H., Lund, T., & Hansen, B. W. (2006). Effect of cold storage upon eggs of a calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana) and their offspring. *Aquaculture*, 254(1-4), 714-729;
- Drillet, G., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Jørgensen, N. O., & Hansen, B. W. (2008). Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures II: life history traits and biochemical contents of eggs and adults. *Aquaculture*, 279(1-4), 47-54;
- Drillet, G., Jørgensen, N. O., Sørensen, T. F., Ramløv, H., & Hansen, B. W. (2006). Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquaculture Research*, 37(8), 756-772;
- Drillet, G., Maguet, R., Mahjoub, M. S., Roullier, F., & Fielding, M. J. (2014). Egg cannibalism in *Acartia tonsa*: effects of stocking density, algal concentration, and egg availability. *Aquaculture International*, 22(4), 1295-1306;
- D'souza, F. M. L., Lecossois, D., Heasman, M. P., Diemar, J. A., Jackson, C. J., & Pendrey, R. C. (2000). Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Penaeus monodon* Fabricius larvae. *Aquaculture Research*, 31(8-9), 661-670;
- Engell-Sørensen, K., Støttrup, J. G., & Holmstrup, M. (2004). Rearing of flounder (*Platichthys flesus*) juveniles in semiextensive systems. *Aquaculture*, 230(1-4), 475-491;
- European Commission. (2010). Facts and Figures on the Common Fisheries Policy-Basic Statistical Data;
- Eurostat, Statistics Illustrated; <https://ec.europa.eu/eurostat/web/fisheries/statistics-illustrated>. [17 de Agosto de 2018]
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations;
- Farhadian, O., Yusoff, F. M., & Mohamed, S. (2008). Nutritional values of *Apocyclops dengizicus* (Copepoda: Cyclopoida) fed *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis tetrahele*. *Aquaculture research*, 40(1), 74-82;
- Fernández, A., Grienke, U., Soler-Vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., & Tasdemir, D. (2015). Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food chemistry*, 177, 43-52.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509;
- Franco, S. C., Augustin, C. B., Geffen, A. J., & Dinis, M. T. (2017). Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. *Aquaculture*, 468, 569-578;
- Guevara, M., Bastardo, L., Cortez, R., Arredondo-Vega, B., Romero, L., & Gómez, P. (2011). Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*, 59(4), 1503-1515;

- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8(2): 229-239
- Grima, E. M., Pérez, J. S., Camacho, F. G., Fernández, F. A., Alonso, D. L., & Del Castillo, C. S. (1994). Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. Aquaculture, 123(3-4), 377-385;
- Hamre, K. (2006). Nutrition in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles. ICES Journal of Marine Science, 63(2), 267-274;
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(8), 1737-1746;
- 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, 31(8-9), 637-659;
- Hirst, A. G., Bonnet, D., Conway, D. V. P., & Kiørboe, T. (2010). Does predation controls adult sex ratios and longevities in marine pelagic copepods?. Limnology and Oceanography, 55(5), 2193-2206;
- Holste, L., & Peck, M. A. (2006). The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. Marine Biology, 148(5), 1061-1070;
- Huerlimann, R., De Nys, R., & Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. Biotechnology and Bioengineering, 107(2), 245-257;
- Ike, N., & Roseline, O. (2007). Adoption of Aquaculture Technology by Fish Farmers in Imo State of Nigeria. Journal of Technology Studies, 33(1), 57-63;
- INE (Instituto Nacional de Estatística) e DGRM (Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos). (2018). Estatísticas da Pesca 2017;
- Ismar, S. M., Hansen, T., & Sommer, U. (2008). Effect of food concentration and type of diet on *Acartia* survival and naupliar development. Marine Biology, 154(2), 335-343;
- Jepsen, P. M., Andersen, N., Holm, T., Jørgensen, A. T., Højgaard, J. K., & Hansen, B. W. (2007). Effects of adult stocking density on egg production and viability in cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). Aquaculture Research, 38(7), 764-772;
- Knuckey, R. M., Semmens, G. L., Mayer, R. J., & Rimmer, M. A. (2005). Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. Aquaculture, 249(1-4), 339-351.
- Lacoste, A., Poulet, S. A., Cueff, A., Kattner, G., Ianora, A., & Laabir, M. (2001). New evidence of the copepod maternal food effects on reproduction. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 259(1), 85-107;

- Lafarga-De la Cruz, F., Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Trees, C. C., Santamaría-del-Ángel, E., & Núñez-Cebrero, F. (2006). Nutrient uptake, chlorophyll a and carbon fixation by *Rhodomonas* sp.(Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, 35(1), 51-60;
- Leandro, S. M., Tiselius, P., & Queiroga, H. (2006). Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Marine Biology*, 150(1), 121-129;
- Lee, K. W., Park, H. G., Lee, S. M., & Kang, H. K. (2006). Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. *Aquaculture*, 256(1-4), 346-353;
- Lombard, F., Sciandra, A., & Gorsky, G. (2005). Influence of body mass, food concentration, temperature and filtering activity on the oxygen uptake of the appendicularian *Oikopleura dioica*. *Marine Ecology Progress Series*, 301, 149-158;
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., & Sukenik, A. (1995). Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133(3-4), 295-309;
- Marcus, N. H. (2005). Calanoid copepods, resting eggs, and aquaculture. *Copepods in Aquaculture*, Chapter 1, 3-9;
- Marques, S. C., Azeiteiro, U. M., Marques, J. C., Neto, J. M., & Pardal, M. Â. (2006). Zooplankton and ichthyoplankton communities in a temperate estuary: spatial and temporal patterns. *Journal of Plankton Research*, 28(3), 297-312;
- McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., & Robino, B. (2003). The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, 223(1-4), 89-106;
- Milione, M., Zeng, C., & Tropical Crustacean Aquaculture Research Group. (2007). The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 273(4), 656-664;
- Morehead, D. T., Battaglione, S. C., Metillo, E. B., Bransden, M. P., & Dunstan, G. A. (2005). Copepods as a live feed for striped trumpeter *Latris lineata* larvae. *Copepods in Aquaculture*, 195-208;
- Murphy, J. A., & Cohen, R. E. (1978). A guide to the developmental stages of common coastal, Georges Bank and Gulf of Maine copepods;
- Navarro, N., Sarasquete, C. (1998). Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae: I. Growth, histology and water quality. *Aquaculture*, 167(3-4), 179-193;
- Navarro, N., Yúfera, M., & García-Gallego, M. (2001). Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae. II. Biochemical composition. *Hydrobiologia*, 452(1-3), 69-77;

- Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* (405), 1017–1024;
- Ohs, C. L., Rhyne, A. L., & Stenn, E. (2009). Viability of subitaneous eggs of the copepod, *Acartia tonsa* (Dana), following exposure to various cryoprotectants and hypersaline water. *Aquaculture*, 287(1-2), 114-119;
- Paffenhöfer, G. A., & Stearns, D. E. (1988). Why is *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) restricted to nearshore environments?. *Marine Ecology Progress Series*, 33-38;
- Pan, Y. J., Souissi, S., Souissi, A., Wu, C. H., Cheng, S. H., & Hwang, J. S. (2012). Dietary effects on egg production, egg-hatching rate and female life span of the tropical calanoid copepod *Acartia bilobata*. *Aquaculture Research*, 45(10), 1659-1671;
- Payne, M. F., & Rippingale, R. J. (2000). Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*, 187(1-2), 85-96;
- Payne, M. F., Rippingale, R. J., & Cleary, J. J. (2001). Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture*, 194(1-2), 137-150;
- Peck, M. A., Ewest, B., Holste, L., Kanstinger, P., & Martin, M. (2008). Impacts of light regime on egg harvests and 48-h egg hatching success of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) within intensive culture. *Aquaculture*, 275(1-4), 102-107;
- Peck, M. A., & Holste, L. (2006). Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): optimizing intensive cultures. *Aquaculture*, 255(1-4), 341-350;
- Piasecki, W., Goodwin, A. E., Eiras, J. C., & Nowak, B. F. (2004). Importance of Copepoda in freshwater aquaculture. *Zoological Studies*, 43(2), 193-205;
- Pompei, C. Mechanistic approach to plankton ecology: trait-based models of copepod communities; <http://www.oceanlifecentre.dk/projects> [24 de Setembro 2018]
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 3 (4), 89-100;
- Puello-Cruz, A. C., Mezo-Villalobos, S., González-Rodríguez, B., & Voltolina, D. (2009). Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson 1939) with different microalgal diets. *Aquaculture*, 290(3-4), 317-319;
- Rajkumar, M., Kumaraguru vasagam, K.P. (2006). Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 261(2), 649-658;
- Seychelles, L. H., Audet, C., Tremblay, R., Fournier, R., & Pernet, F. (2009). Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Müller) using frozen-concentrated microalgae. *Aquaculture Nutrition*, 15(4), 431-439;

- Sorgeloos, P., & Léger, P. (1992). Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *Journal of the World Aquaculture Society*, 23(4), 251-264;
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96;
- Støttrup, J. G. (2006). A review on the status and progress in rearing copepods for marine larviculture: Advantages and disadvantages among calanoid, harpacticoid and cyclopoid copepods. *Avances en Nutrición Acuicola*, 8, p. 62-83;
- Støttrup, J. G., Bell, J. G., & Sargent, J. R. (1999). The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets. *Aquaculture*, 176(3-4), 257-269;
- Tang, K. W., Jakobsen, H. H., & Visser, A. W. (2001). *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the planktonic food web: feeding, growth, and trophic interactions among grazers. *Limnology and Oceanography*, 46(8), 1860-1870;
- Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41(5), 717-732;
- Turingan, R. G., Beck, J. L., Krebs, J. M., & Licamele, J. D. (2005). Development of feeding mechanics in marine fish larvae and the swimming behavior of zooplankton prey: implications for rearing marine fishes. *Copepods in Aquaculture*, Lee, C., O' Bryen S. P. J. & Marcus, N. M. (Eds.) Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, pp.125-129.
- Troell, M., Naylor, R. L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P. H., Folke, C., Arrow, K.J., Barrett, S., Crépin, A.S., Ehrlich, P.R., Gren, A., Kautsky, N., Levin, S.A., Nyborg, K., Österblom, H., Polasky, S., Scheffer, M., Walker, B.H., Xepapadeas, T., de Zeeuw, A. (2014). Does aquaculture add resilience to the global food system?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), 13257-13263;
- Wadhwa, N., Andersen, A., & Kiørboe, T. (2014). Hydrodynamics and energetics of jumping copepod nauplii and copepodids. *Journal of Experimental Biology*. 217: 3085-3094;
- Wilson, R. P. (2003). Amino acids and proteins. *Fish Nutrition* Halver, J.E.; Hardy, R.W. (Eds.) Academic Press, New York, pp.143-179.
- Valenzuela-Espinoza, E., Lafarga-De-La-Cruz, F., Millán-Núñez, R., & Núñez-Cebrero, F. (2005). Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers. *Ciencias Marinas*, 31(1A), 79-89;
- Vu, M. T. T., Douët, C., Rayner, T. A., Thoisen, C., Nielsen, S. L., & Hansen, B. W. (2015). Optimization of photosynthesis, growth, and biochemical composition of the microalga *Rhodomonas salina*—an established diet for live feed copepods in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1485-1500;

Vu, M. T., Hansen, B. W., & Kiørboe, T. (2017). The constraints of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Plankton Research*, 39(6), 1028 - 1039;

