



Efeito da fortificação de *Spirulina maxima* em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): análise bromatológica e avaliação da digestibilidade

Mikaela Telles

Projeto de Final de Curso

Orientadora

Anita Ferreira do Valle, D.Sc. Instituto de Química/UFRJ

Outubro de 2021

Efeito da fortificação de *Spirulina maxima* em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): análise bromatológica e avaliação da digestibilidade

Mikaela Telles

Projeto de final de curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Engenharia Química.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Outubro de 2021

Ficha Catalográfica

*Em memória ao
maior amor da minha vida,
meu pai, Miguel.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me dar forças e consolo, até quando eu achei que não seria possível.

Ao meu pai amado, Miguel, que sempre foi minha base, meu chão e é a minha maior fonte de inspiração. Obrigada por todo amor, por nunca ter deixado me faltar nada e por sempre me mostrar a importância do estudo. Você foi o melhor pai do mundo.

Às minhas irmãs Rafaela, Gabriela e Isabela que cuidam de mim quando eu quero e quando eu não quero. Que foram minhas mães e que nunca largaram minha mão, zelando e me dando suporte para realizar minhas conquistas.

Aos meus sobrinhos, João Pedro, Cecília e Miguel, obrigada por alegrarem meus dias de cansaço e encher meu peito de esperança e propósito.

Ao meu namorado, Lucas, pela parceria e paciência, principalmente nos momentos difíceis do final do curso.

À minha orientadora, Prof^a Anita Ferreira do Valle, por toda atenção, dedicação e amizade. Por ser uma profissional inspiradora, exemplo de perseverança e trabalho duro.

À UFRJ e à Escola de Química, por todo conhecimento e por tornarem possível a realização do sonho de me tornar Engenheira pela melhor faculdade do Brasil.

Aos amigos e colegas que fiz ao longo do curso que me ajudaram academicamente e pessoalmente, me fazendo chegar até aqui.

Aos laboratórios parceiros que permitiram a utilização de equipamentos necessários para as análises deste estudo.

Minha total gratidão a todos vocês!

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Engenharia Química.

Efeito da fortificação de *Spirulina maxima* em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): análise bromatológica e avaliação da digestibilidade

Mikaela Telles

Outubro de 2021

Orientadora: Anita Ferreira do Valle, Prof^a. Dr^a. Instituto de Química/UFRJ.

Resumo

O uso de microalgas como ingrediente alimentar é muito promissor e vem ganhando destaque tanto na alimentação humana como na alimentação animal. A microalga *Spirulina maxima* é considerada um alimento funcional por causa de suas proteínas, vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos. Com o crescente desenvolvimento da indústria de aquicultura, maior atenção deve ser dada aos custos de produção e a alimentação representa de 40 a 70% do custo total, sendo a porção proteica a maior responsável pelo preço final. Neste sentido, o presente trabalho avaliou a fortificação de rações para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que possuem maior destaque dentro da piscicultura continental, em níveis de 10%, 20%, 30% e 40% com a biomassa da microalga *S. maxima*, visando avaliar o potencial desta fonte de proteína vegetal na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. A ração foi formulada no Instituto Federal de Alegre-ES e foram realizadas análises bromatológicas nas rações e nas fezes dos peixes, buscando avaliar a digestibilidade da ração pelos alevinos. Foram analisados os teores de proteínas totais, carboidratos totais, lipídios totais, triacilgliceróis, fibra bruta, umidade, cinzas e análise de cor das rações. Nas fezes dos animais alimentados com as diferentes formulações de rações, analisou-se proteínas totais, lipídios totais, fibra bruta e cinzas. Com os resultados obtidos da bromatologia das fezes foram então calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes. Como resultado, as rações fortificadas de *S. maxima*

se mostraram boas alternativas para dietas de tilápias, mantendo o nível proteico entre 34 e 39%, como exigem as dietas para esses animais. As rações elaboradas mantiveram os níveis de fibras e lipídios dentro dos teores tolerados pelo peixe, não registrando diferenças significativas em relação a ração controle. Na análise de cor, foi observado que as rações fortificadas tendem ao verde, enquanto a ração controle apresenta coloração amarela. O teor de cinzas não apresentou diferenças significativas em relação à controle para nenhuma das rações fortificadas e o teste de umidade revelou que as rações podem ser consideradas rações secas. Os resultados da análise de digestibilidade mostraram índices superiores a 90% para proteínas e lipídios e índices toleráveis para fibras e cinzas, sendo compatível com as dietas elaboradas com farinha de peixe. A substituição da fonte proteica, ainda que parcialmente, representa a adição de nutrientes ricos à ração, por se tratar de uma proteína que possui ácidos graxos essenciais, antioxidantes e que é considerada um alimento funcional. .

Palavra-chave: *Spirulina maxima*; ração para peixes; digestibilidade; tilápia do Nilo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
	1.1 Microalgas e suas aplicações.....	1
	1.2 <i>Spirulina maxima</i> em alimentos.....	2
	1.2.1 Alimentação humana.....	2
	1.2.2 Alimentação animal	3
	1.3 Necessidades nutricionais dos peixes	4
	1.4 Rações para peixes	5
	1.4.1 A tilápia do Nilo	6
2	OBJETIVO	8
3	METODOLOGIA	8
	3.1 Obtenção das amostras	8
	3.1.1 Ração.....	9
	3.1.2 Fezes de peixe	10
	3.2 Preparo das amostras.....	11
	3.2.1 Rações de peixe	11
	3.2.2 Fezes dos peixes	12
	3.3 Análises Bromatológicas.....	12
	3.3.1 Proteínas	13
	3.3.2 Carboidrato	13
	3.3.3 Lipídeos	14
	3.3.4 Triacilgliceróis	15
	3.3.5 Fibras	16
	3.3.6 Cinzas	17
	3.3.7 Umidade	17
	3.3.8 Análise de cor	17
	3.4 Índice de digestibilidade	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
	4.1 Rações de peixe	19
	4.2 Digestibilidade	26
5	CONCLUSÕES	31
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microalga *Spirulina maxima* vista em microscópio ótico em lente 400x.

Figura 2: Processo de extrusão da ração (A), Secagem da ração a temperatura ambiente (B) e Ração final (C)

Figura 3: Experimentos sendo realizados nas incubadoras dos alevinos.

Figura 4: Ração de peixe fortificada com *Spirulina maxima* antes (A) e após (B) a moagem em moinho de uma bola PULVERISETTE 0.

Figura 5: Fezes de peixe antes (A) e após (B) a moagem em moinho de uma bola PULVERISETTE 0. Fonte: própria

Figura 6: Aparelho de extração de lipídios neutros Soxhlet em operação com amostras de ração.

Figura 7: Expressão de proteína total em função do nível de fortificação com a biomassa seca de *S.maxima*

Figura 8: Score químico de aminoácidos da proteína de biomassa de *Spirulina*, de soja, de farinha de trigo integral e farinha de trigo branca.

Figura 9: Expressão de proteína total nas fezes do peixe e CDA em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea.

Figura 10: Expressão de fibra bruta nas fezes do peixe e CDA(%) em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea.

Figura 11: Expressão de lipídios nas fezes do peixe e CDA(%) em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea.

Figura 12: Expressão de cinzas nas fezes do peixe e CDA(%) em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Composição centesimal de biomassa seca de *Spirulina*.

Tabela 2: Composição por ingrediente das rações elaboradas com e sem *Spirulina maxima*.

Tabela 3: Resultados da análise de carboidratos totais para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S.maxima*.

Tabela 4: Resultados da análise de lipídios totais e TAG (triacilgliceróis) para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S.maxima*.

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos para a biomassa seca de *S.maxima*

Tabela 6: Resultados da análise de Fibra Bruta para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S.maxima*.

Tabela 7: Resultados da análise de Cinzas e Umidade para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S.maxima*.

Tabela 8: Análise dos parâmetros de cor L*, a* e b* da ração controle (0% de *S.maxima*) e rações fortificadas (10, 20, 30 e 40% de *S.maxima*). Cada valor representa a média da triplicata de três experimentos independentes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microalgas e suas aplicações

Microalgas são seres unicelulares fotossintetizantes capazes de produzir biomassa a partir da absorção de luz e CO₂ (FERREIRA, 2020). Estes seres microscópicos podem ser cultivados em água doce ou salgada, sistemas abertos ou fechados e possuem inúmeras aplicações, indo do uso em cosméticos e ativos farmacêuticos à utilização de seu poder calorífico na produção de biocombustíveis (SIMÃO, 2017). Microalgas possuem altas taxas de crescimento em cultivo, tornando-se uma biomassa de alto interesse de produção (BECKER, 2013), uma vez que é composta principalmente por proteínas e lipídios de alto interesse biológico (GRESSLER, 2010) e podem, assim, ser utilizadas na geração de produtos com alto valor agregado.

O estudo das microalgas e suas aplicações vem apresentando um crescente interesse devido as substâncias sintetizadas por esses microrganismos. Microalgas são capazes de produzir i) ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3 e ômega-6) que são muito importantes e utilizados na fortificação humana e animal, visto que são fundamentais para o desenvolvimento e que são reguladores fisiológicos (GUSCHINA, HARWOOD, 2006); Como humanos e animais não são capazes de produzir os ácidos citados, estes precisam ser adicionados na dieta via fortificação. ii) pigmentos naturais como clorofila, ficocianina e carotenoides, que se apresentam como uma alternativa para introdução na alimentação humana de forma a substituir corantes artificiais que não são tão saudáveis (TOKER, 2019), iii) enzimas como lipases e celulases que possuem vasta aplicação seja no ramo da medicina, da biomedicina ou nas indústrias cosméticas (MONTALVO, 2018).

A microalga do gênero *Spirulina*, em particular a espécie *Spirulina maxima* é uma cianobactéria de estrutura filamentosa que possui forma de espiral (ou tricomas) e se destaca pelo seu valor nutricional. Não somente pelo alto teor proteico, seu destaque se dá pela presença de componentes na biomassa que exibem propriedades antivirais, antibactericidas, antioxidantes e anti-inflamatórias que são úteis não somente no tratamento de doenças, como na prevenção delas (MONTALVO, 2018).



Figura 1: Microalga *Spirulina maxima* vista em microscópio ótico em lente 400x. Fonte: UTEX, 2021.

1.2 *Spirulina maxima* em alimentos

A *Spirulina maxima* em especial tem ganhado maior atenção na indústria alimentícia. Seu alto teor de proteínas e nutrientes tem chamado atenção para adeptos da alimentação vegetariana e vegana (DEMARCO, 2020), que usam a biomassa na sua forma em pó ou então em produtos industrializados com adição da microalga. Estes benefícios nutricionais são atrativos também para as indústrias de rações, sendo aplicáveis para diversos tipos de animais (ANDRADE e col., 2018).

1.2.1 Alimentação humana

Os registros da adição de *Spirulina* na alimentação humana não são recentes e já estão presentes desde as civilizações antigas, como os maias, astecas e tribos africanas, que utilizavam a microalga em seu cotidiano como fonte nutritiva (HABIB et al., 2008), coletando as microalgas em lagos, secando sob o sol por dias e por fim adicionando em massas de biscoitos. A *Spirulina* possui qualidades nutricionais essenciais para saúde humana, devido ao seu alto teor de proteína (HAMDAN, 2019) e, ainda, configura a posição de alimento com maior número de elementos nutritivos por unidade de peso, como afirma o estudo de Phang et al. (2000). A composição centesimal da microalga é apresentada na Tabela 1.

O gênero *Spirulina* é considerado dentre as microalgas um dos mais ricos em ferro absorvível e betacaroteno (pró-vitamina A). Em sua composição possui níveis

elevados de minerais e vitaminas, ácidos graxos e aminoácidos essenciais, compostos fenólicos e pigmentos como clorofila e luteína, como aponta Lupatini (2016).

Um aspecto que tem levado ao aumento das pesquisas e do interesse em adicionar a biomassa algácea na alimentação humana se dá aos altos custos financeiros e ambientais inerentes às fontes de obtenção de proteínas para consumo humano mais usuais como pecuária e produção agrícola; assim, busca-se diversificação das fontes de produção de proteína para atender a demanda dos consumidores (BLEAKLEY, et al.,2017). A produção dessa fonte proteica vegetal a partir da biomassa pode ser realizada em diversos locais, não sendo tão restrito como a agricultura e pecuária tradicionais (MOURTHÉ, 2010) abrindo um maior leque de possibilidades para a produção em larga escala deste insumo.

Tabela 1 : Composição centesimal de biomassa seca de *Spirulina*. Fonte: SILVA, VALLE E PERRONE (2021)

Componente	Composição
Proteínas	80,00 % m/m
Carboidratos	0,69 % m/m
Lipídios	7,63 % m/m
Cinzas	11,67 % m/m
Energia	391,49 (kcal/100g)

1.2.2 Alimentação animal

Atualmente, há diversos registros de estudos realizados com diferentes grupos de animais analisando os efeitos da fortificação com *Spirulina* no desempenho dos animais e na qualidade do produto de origem animal gerados (PÉREZ, LABBÉ, 2014). A disponibilidade de ácidos graxos essenciais e proteínas atrai o interesse na fortificação animal com fins para alimentação humana, tornando um produto de melhor qualidade para o consumidor. A utilização de microalgas como ingrediente em rações animais, que atuam como nutrientes ricos em ácidos graxos poli-insaturados, produz peixes, ovos, leite e outros produtos alimentares ricos em ácidos graxos ômega-3 (WYSOCZANSKI et al., 2016).

Em complemento, há o interesse do uso da biomassa de microalgas para fortalecer a saúde do animal, inclusive em animais domésticos, favorecendo-se das

propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias extremamente benéficas para a saúde dos animais (SUGIHARTO, 2020) que podem fortalecer o sistema imunológico, controlar a obesidade e eventuais anemias além de atuar como potente efeito probiótico, dentre outros benefícios. De acordo com Rosas et al. (2019), a biomassa de microalgas do gênero *Spirulina* é considerada um alimento funcional que apresenta propriedades bioativas, garantindo melhoras na saúde por meio da melhora da resistência e da qualidade do organismo.

Especificamente na alimentação de peixes, tem-se que várias espécies de microalgas apresentam um alto teor de proteína, sendo um dos principais fatores que favorecem sua utilização na produção de rações (KOVAC et al., 2013; FAO,2018). Contudo, a nível industrial, é necessário um controle de qualidade rígido com a biomassa de algas produzida para adição alimentar, de forma a garantir a manutenção do seu valor nutricional. Desta forma, é necessária a determinação da composição bioquímica da biomassa de microalgas produzida, de maneira a controlar e avaliar a qualidade da amostra a ser utilizada para fins alimentícios e a garantir uma dieta adequada e de qualidade para os animais cultivados.

Assim como se busca nas microalgas uma proteína de fonte vegetal em alternativa à de fonte animal para consumo humano devido à crescente demanda populacional, como citado no item 1.2.1, em consequência dessa alta, as microalgas se figuram como uma substituinte para a alimentação dos animais, visando abastecer este mercado e suprir essa alta demanda mundial por produção de proteína animal para consumo humano (MADEIRA et al., 2017).

1.3 Necessidades nutricionais dos peixes

No que diz respeito a dieta e as necessidades nutricionais dos peixes, pode-se dizer que a dieta para esses animais deve ser equilibrada e com as quantidades adequadas para atender as demandas calóricas, proteicas e vitamínicas destes. A quantidade dos ingredientes utilizados para a formulação da dieta irá depender da espécie, da palatabilidade, da disponibilidade dos ingredientes, do nível de processamento exigido, assim como o custo e outros fatores. Para a obtenção da proteína, fontes de origem animal, como a farinha de peixe, costumam garantir uma boa qualidade ao produto, contendo os aminoácidos essenciais necessários e asseguram uma melhor palatabilidade (ALAGAWANY e col., 2021).

Por mais que a farinha de peixe seja a fonte animal mais tradicionalmente utilizada nas formulações de rações comerciais para peixe, observa-se uma variabilidade na sua composição, que junto ao fato da redução da sua oferta no mercado e consequente alto custo, obriga nutricionistas e indústrias a explorar fontes alternativas que viabilizariam o suprimento da demanda emergente na aquicultura por rações (SASAKI, 2017; FAO, 2018). Outra matéria prima que figurou por muito tempo como ingrediente indispensável nas formulações de rações foi a farinha de carne e ossos, porém, um estudos realizado com três marcas da farinha em comparação à uma dieta controle à base de farinha de peixe, constataram que a matéria prima e a tecnologia utilizada na produção da farinha levam à uma considerável variação no conteúdo nutricional do produto (ALVA, 2010.).

No âmbito nacional, as rações para peixes comercializadas, de maneira geral, baseiam-se nas demandas nutricionais de peixes exóticos, todavia, a proporção de proteína e energia oscila entre 81 e 117mg/kcal para uma grande variedade de peixes. Vale ainda alertar que há estudos demonstrando a importância de se atentar à palatabilidade das rações, que para além das funções nutricionais das rações, essa característica pode determinar sua ingestão, uma possível rejeição ou até mesmo diminuir o consumo do alimento pelo animal (COLDEBELLA, NETO, 2002)

1.4 Rações para peixes

As rações para peixes devem atender às demandas nutricionais destes animais, de maneira que exigem uma quantidade de proteína dietética podendo conter de 28 a 50% de proteína bruta, a depender da fase de desenvolvimento e do sistema utilizado no cultivo. Atualmente usa-se principalmente milho e soja, cuja produção é voltada principalmente para o consumo humano, elevando o valor no mercado. Quanto a farinha de peixe, que por se tratar de um subproduto proveniente do abate, esta inclina-se a ser um produto que oscila no mercado, dependendo da produção do pescado.

Segundo Spolaore et al. (2006), 30% da produção mundial de microalgas está destinada ao consumo animal e, destes, 50% da produção de *Spirulina* tem este fim. Esta microalga tem aspectos benéficos para os animais quando adicionadas à sua nutrição, gerando melhoras na resposta imune, na infertilidade e no controle de peso corporal (BRENNAN & OWENDE, 2010; MENDOZA et al., 2011).

1.4.1 A tilápia do Nilo

É notório o atual rápido crescimento da indústria da aquicultura, sendo uma das origens desse comportamento o aumento a nível global do consumo de peixes e produtos de peixes. A produção global deste mercado alcançou a incrível marca de aproximadamente 171 milhões de toneladas em 2016, onde 47% do total é representado pela aquicultura, podendo chegar a 53% caso não haja redução na utilização de ingredientes não alimentares, inclusive farinha e óleo de peixe (FAO, 2018).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o cultivo de peixes representa cerca de 50% da produção aquícola mundial e, dentro da piscicultura continental (em água doce), a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie que possui maior destaque em termo de produção. O item alimentação representa até 70% do custo operacional da piscicultura e o componente mais caro é representado pela proteína (PRATIWIY, 2020).

A proposta de fortificação da ração com microalgas surgiu devido às rações para tilápia exigirem elevado nível de proteína, o que aumenta a participação das fontes proteicas, responsáveis pela maior parte do custo total da ração (FURUYA et al., 2000). Outro ponto é devido o requerimento nutricional das tilápias ser complexo, embora sejam peixes robustos e de fácil adaptação em ambientes variados, pois necessitam dos seguintes nutrientes em quantidades suficientes para adequado crescimento, reprodução e saúde: aminoácidos essenciais; ácidos graxos; fonte de energia; minerais e vitaminas. Ainda, o interesse de incorporar biomassa de microalgas nas dietas animais se dá ao fato de que a fortificação aumenta o valor agregado das rações animais devido à sua composição química (PRATIWIY e PRATIWI, 2020)

Quanto a digestibilidade da *Spirulina* pelos peixes, esta fica facilitada porque esta espécie de microalga não possui parede celular de celulose e apresenta baixo nível de carboidratos em sua composição, permitindo ao peixe realizar a completa digestão e absorção do conteúdo celular (LAFARGA et al., 2020; GOGOI, MANDAL, & PATEL, 2018; TEIMOURI, YEGANEH, & AMIRKOLAIE, 2016; VELASQUEZ et al., 2016).

Ao incluir *Spirulina* nas formulações das rações, pressupõe-se que o produto apresentará alta digestibilidade, uma vez que o concentrado proteico dessa microalga possui uma elevada taxa de digestibilidade, alcançando níveis superiores a 90%. Esta microalga em particular se destaca justamente pelo seu valor de digestibilidade proteica, valor este que não é encontrado em outras espécies de microalgas, macroalgas ou plantas, podendo ser maior, inclusive, que a proteína de soja isolada comercial (YUCETEPE, et al., 2018).

A inserção de microalgas no contexto da aquicultura se dá principalmente por meio da nutrição, de forma direta ou indireta à várias espécies de animais de criação aquática. Estudos relatam a redução de níveis de colesterol e o aumento da modulação imunológica quando há utilização de espécies de microalgas como aditivo alimentar, indicando que estas devem estar envolvidas no metabolismo de lipídios e, inclusive, quando há inclusão de *Spirulina* em particular, observa-se um melhor crescimento dos peixes, uma melhor coloração, melhor reprodução e aumento da qualidade do filé (ABDULRAHMAN, 2019)

Considerando a demasiada demanda de farinha de peixe na aquicultura, a incorporação de microalgas nos produtos alimentícios para peixes pode representar uma solução para a redução desta demanda, visto que as microalgas possuem composição nutricional compatíveis com a farinha e com o óleo do peixe. As microalgas apresentam características que as colocam como um substituo potencial dos componentes de rações para peixes e demais animais aquáticos. (RAJI, et al., 2018; SHAH et al.,2018).

Do ponto de vista econômico, a melhor maneira possível de alcançar uma agricultura de baixo orçamento é implementando a formulação de rações com materiais vegetais naturalmente disponíveis (SIKOTARIYA AND YUSUFZAI, 2019). Convencionalmente, as formulações de rações encontradas no mercado são baseadas em proteínas de fontes animais em decorrência da sua alta digestibilidade, pureza e presença dos aminoácidos essenciais, minerais e ácidos graxos necessários à nutrição dos peixes (OLSEN, HASAN, 2012). A busca por proteínas de fonte vegetal é considerada necessária para o cultivo de peixes, ao passo que pode ser total ou parcialmente substituída pela farinha de peixe em dietas para peixes de água doce (WANG et al., 2016).

Segundo os órgãos competentes, existem cerca de 580 espécies provenientes da aquicultura sendo cultivadas de forma controlada no mundo. Em sua maioria, as espécies utilizadas com a finalidade de aquicultura são exóticas ou introduzidas e, logo, são adaptáveis e possuem taxas de crescimento satisfatórias (FAO 2016). Estudos nutricionais em peixes nativos registrados nos últimos anos visam quantificar e qualificar as proteínas e lipídios presentes na alimentação desses animais, bem como a relação estabelecida com o crescimento, reprodução e manutenção visando melhorar economicamente a produção (GONZÁLEZ-FÉLIX et al. 2014).

Dessa forma, o presente trabalho irá analisar rações para alevinos de tilápias do Nilo preparadas com a fortificação de 0%(controle), 10%, 20%, 30% e 40% de *Spirulina maxima* em termos de componentes a fim de determinar a estabilidade da fortificação que substituirá a ração comercial de peixe. Para realizar uma avaliação completa sobre a influência das diferentes formulações de ração no padrão de expressão de proteínas na tilápia do Nilo, foram ainda analisadas as fezes dos peixes, com o intuito de verificar a digestibilidade da ração pelos animais.

2 OBJETIVO

Avaliar o desenvolvimento e composição bioquímica da ração para tilápia do Nilo fortificada com diferentes níveis de biomassa da microalga. Realizar análises bromatológicas da ração fortificada formulada com diferentes concentrações de *Spirulina maxima*, bem como análise de digestibilidade da ração ofertada aos animais.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção das amostras

O presente trabalho analisou amostras de rações controle e fortificadas e fezes da Tilápia do Nilo como parte do trabalho de conclusão de curso da aluna Mikaela Telles. As amostras foram obtidas e recolhidas no Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) localizado no Instituto Federal do Espírito Santo em Campos de Alegre/ES, onde o Prof. Dr. Pedro Pierro Mendonça

foi o responsável pela condução do experimento de elaboração das rações, pela montagem da dieta dos alevinos e pelo recolhimento de fezes dos peixes, juntamente com a aluna de doutorado do PPGCAL da UFRJ, Silvia Pope de Araujo.

3.1.1 Ração

As rações foram preparadas a base de fubá de milho, farelo de soja, farelo de trigo, óleo de soja, farinha de peixe, açúcar e biomassa seca da microalga *S. maxima* nas proporções de 0, 10, 20, 30 e 40 % de biomassa algácea. Os ingredientes foram moídos em um moinho de martelos, com uma peneira de 0,5mm e, então, foi realizada a mistura de todos os ingredientes secos, seguido da adição de água a 60°C para homogeneização até a formação de uma massa umedecida consistente. A mistura foi levada a um moedor de carnes manual, formando pellets com 2mm de diâmetro e, então, seca em temperatura ambiente a sombra até atingirem peso constante. A Figura 2 apresenta o processo de extrusão da ração no moedor de carne, o processo de secagem e o produto final (A, B e C, respectivamente). As rações prontas foram então ensacadas hermeticamente e enviadas ao LEAF onde foram armazenadas em dessecador à vácuo até o momento das análises. A tabela 2 apresenta a formulação das rações 0 e 40% de *S. maxima* que foram utilizadas como base para o preparo das rações 10, 20 e 30% através da diluição delas.

Tabela 2: Composição por ingrediente das rações elaboradas com e sem *Spirulina maxima*.

INGREDIENTES (KG)	Ração 0%	Ração 40%
Farelo de soja	8,1039	1,7029
Farelo de trigo	0,3750	0,6250
Óleo de soja	0,2500	0,3750
Fubá de milho	2,5164	3,9221
Farinha e peixe	1,2500	0,6250
Açúcar	0,0000	0,2500
<i>Spirulina maxima</i>	0,0000	5,0000
TOTAL	12,4953	12,5000



Figura 2: Processo de extrusão da ração (A), Secagem da ração a temperatura ambiente (B) e Ração final (C). Fonte: própria

3.1.2 Fezes de peixe

As rações controle e fortificadas com 10%, 20%, 30% e 40% da biomassa de *S. maxima* foram ofertadas em dieta de tilápias do Nilo numa frequência de alimentação de 4 (quatro) vezes por dia – 8, 11, 14 e 17h – em pequenas quantidades, até a aparente saciedade, computando as massas de ração ofertadas para posterior análise de dados. O cultivo dos animais foi realizado em incubadoras de fibra de vidro de 80L – mostradas na Figura 3 - contendo 50 alevinos por incubadora, sendo um total de 20 incubadoras – 5 dietas com 4 repetições de cada – e totalizando 1000 alevinos no experimento. As incubadoras foram mantidas a temperatura de 28°C. As fezes foram coletadas a cada hora a partir da primeira alimentação visando minimizar a deterioração. Assim que coletadas, as fezes foram imediatamente colocadas em recipientes plásticos identificados, e congeladas para reduzir a ação de microrganismos. Esse procedimento foi realizado por 4 dias consecutivos e as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 65°C e pesadas. As amostras foram ensacadas hermeticamente, identificadas e enviadas ao Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF), do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química da UFRJ, onde foram armazenadas em dessecador à vácuo até o momento das análises.



Figura 3: Experimentos sendo realizados nas incubadoras dos alevinos. Fonte: própria

3.2 Preparo das amostras

3.2.1 Rações de peixe

As rações formuladas no LNPEO, objeto das análises do presente estudo, possuíam granulometria elevada para as análises bromatológicas projetadas, uma vez são realizadas em nível celular. Visando maior precisão nos resultados das análises das rações fortificadas e da ração controle, as amostras das rações com 0, 10, 20, 30 e 40% de *S. maxima* foram moídas em moinho de uma bola *PULVERISETTE 0* por 15 minutos a uma amplitude de 1,0 mm em porções de aproximadamente 10g. O tempo, a amplitude e a quantidade de amostra utilizadas por ciclo de moagem foram determinados experimentalmente até que as amostras obtivessem característica visual de pó. As análises das rações foram realizadas em triplicadas randômicas obtidas do material total moído.



Figura 4: Ração de peixe fortificada com *Spirulina maxima* antes (A) e após (B) a moagem em moinho de uma bola *PULVERISETTE 0*. Fonte: própria

3.2.2 Fezes dos peixes

As fezes dos peixes estavam secas e, portanto, possuíam textura muito dura e fibrosa, sendo assim, fez-se necessário a moagem do material. Utilizou-se moinho de uma bola *PULVERISETTE 0* por 30 minutos a uma amplitude de 1,5 mm em porções de aproximadamente 5g. O tempo, a amplitude e a quantidade de amostra utilizadas por ciclo de moagem foram determinados experimentalmente até que as amostras obtivessem característica visual de pó. Como para cada um dos 5 tipos de alimentação (níveis de fortificação na ração) foram utilizados quatro tanques, as análises de digestibilidade foram realizadas em quadruplicada, com amostras independentes.



Figura 5: Fezes de peixe antes (A) e após (B) a moagem em moinho de uma bola *PULVERISETTE 0*.

Fonte: própria

3.3 Análises Bromatológicas

Foram realizadas análises bromatológicas na ração e nas fezes do peixe, a fim de analisar o conteúdo nutricional e, conseqüentemente, a digestibilidade das rações pelos animais. Para as rações foram realizadas as análises de proteínas totais, carboidratos totais, lipídios totais, triacilgliceróis, fibra bruta, cinzas, umidade e análise de cor. Para as fezes dos peixes analisou-se proteínas totais, lipídios totais, cinzas e fibra bruta.

3.3.1 Proteínas totais

Para analisar a quantidade de proteínas totais contidas nas amostras das rações e das fezes foi utilizado o método de Lowry e col. (1951) modificado de acordo com Mota (2015). Para tal, foram colocadas em tubos Falcon 10mg de cada amostra e adicionados 0,5 mL de água destilada, seguido de 0,5 mL de solução SDS (1 g de SDS + 1,5 g de glicerol + 10 mL de água destilada). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em vórtex, colocadas por 25 minutos em banho de ultrassom, novamente homogeneizadas por 1 minuto e colocadas em banho-maria (100°C / 5 minutos). Após o tempo citado, foram retiradas do banho, homogeneizadas por 1 minuto e aguardou-se alcançarem a temperatura ambiente para serem centrifugadas a 5.500 rpm por 8 minutos. Recolheu-se o sobrenadante em tubos de vidro e retirou-se alíquotas de 100 µL de cada amostra, que então foram diluídas 100x. Novamente, foram recolhidas alíquotas, agora de 1,0 mL, de cada amostra diluída e foi adicionado 5,0 mL do reagente C - constituído pela mistura de 50 volumes do reagente A (2,0% Na₂CO₃, m/v, em 0,1N NaOH) para cada 1 volume do reagente B (1 volume de CuSO₄ 0,5%, m/v, + 1 volume de C₄H₄KNaO₆.4H₂O 1,0%, m/v). Aguardou-se dez minutos para a reação com o reagente C e, então, foi adicionado a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído com H₂O (1:2, v/v) e aguardou-se 30 minutos para fazer as leituras espectrofotométricas à 750 nm contra o branco dos reagentes. Para a determinação do conteúdo proteico das amostras, utilizou-se albumina de soro bovino como padrão.

3.3.2 Carboidratos totais

Os carboidratos foram analisados de acordo com o método de Dubois *et al.* (1956), onde foram pesados 10 mg das amostras de ração e das amostras de fezes em frascos tipo "vials". Aos poucos foram adicionados 2,0 mL de H₂SO₄ 80% (p/p), com os frascos já inseridos em banho de gelo. Após a adição do ácido, a reação aconteceu a temperatura ambiente durante o período de 16-20h. Após este período, com auxílio de bastão de vidro, foi verificada a presença de bolhas e diluiu-se o extrato com 6 mL de água deionizada, lavando o bastão. Seringas acopladas a micro filtrador contendo membrana de fibra de vidro GF/F previamente incinerada em mufla a 400 °C por 4 horas foram utilizadas para filtrar o extrato diluído, transferindo-os para tubos de vidros. Do filtrado de cada uma das amostras, em triplicata, foi

recolhido 1 mL e transferido para tubo de ensaio longo com boca larga. Foi adicionado 0,5 mL de fenol 3% e homogeneizou-se em agitador por 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e novamente os tubos foram agitados muito bem. Aguardados 30 minutos após a adição do ácido, foi feita a leitura da absorvância no espectrofotômetro a 485 nm contra o branco dos reagentes. Para a determinação do conteúdo glicídico das amostras utilizou-se D-glicose como padrão.

3.3.3 Lipídeos totais

Para a determinação dos lipídeos totais, foi empregado o método de Folch e col. (1957). Foram pesadas 100 mg de cada amostra em tubos de vidro largos e, dentro da capela, foram adicionados 5mL de metanol, seguidos de 2 minutos de homogeneização em vórtex. Após, foram adicionados 10mL de clorofórmio, agitando o tubo por mais 5 minutos e, então, filtrou-se o material em filtros de papel sob provetas graduadas dotadas de tampa. O resíduo depositado no papel filtro foi lavado lentamente com 5 mL de metanol seguidos de 10 mL de clorofórmio. Ao filtrado, depositado no interior da proveta, foi adicionado um determinado volume (correspondente a ¼ do volume filtrado) de uma solução de KCl 0,88% m/v. O sistema foi agitado manualmente e aguardou-se repouso até a completa separação das fases. A fase superior formada foi removida por aspiração e descartada. Uma mistura de metanol e água (1:1, v/v) foi adicionada a solução remanescente na proveta, em um volume correspondente a ¼ do volume da solução. Novamente o sistema foi agitado e posteriormente mantido em repouso para separação e descarte da fase superior por aspiração. A fase inferior foi filtrada através de filtros cônicos de papel preenchidos com Na₂SO₄ anidro, com lavagem do mesmo com clorofórmio puro, sendo o filtrado recolhido em balões. Os balões foram colocados em banho maria a 40°C ainda na capela para a evaporação do solvente (clorofórmio) presente no filtrado. Após a evaporação, ressuspendeu-se a fração lipídica em 5mL de clorofórmio e recolheu-se 1mL, depositando em vidros de relógio - previamente secas em estufa, esfriadas em dessecador e pesadas em balança analítica até peso constante – e foram colocados em estufa a 105°C por 2h para a completa evaporação e sucessiva pesagem. A determinação dos lipídeos totais foi realizada por gravimetria.

3.3.4 Triacilgliceróis

Para extração dos lipídeos neutros, foi empregado o sistema de extração tipo Soxhlet. Para o preparo do sistema, foram aquecidos em estufa a 105°C os balões de extração até que após o resfriamento em dessecador estes obtivessem peso constante. Em seguida, foi adicionado 210mL de éter de petróleo (faixa de destilação: 30 - 60°C) em cada um dos balões e foram acoplados ao sistema. Em cartuchos de celulose limpos e secos, foram pesados 1,5 g de amostra seca, e estes foram transferidos para o sistema tipo Soxhlet. Foi ligado o sistema de resfriamento com fluxo contínuo de água e, em seguida, o sistema de aquecimento das placas onde foram alocados os balões. O fluxo de condensação do solvente foi regulado e mantido a 120 gotas por minuto (AOCS, 1995). O processo extração foi mantido até que o solvente se apresentasse incolor na parte superior do sistema de extração, onde continha os cartuchos. Interrompido o processo, os balões contendo o material extraído foram encaminhados ao banho-maria a 60°C para evaporação do solvente residual dentro da capela. Finalmente, os balões contendo os lipídeos voltaram para a estufa a 105°C até que atingissem peso constante. Dessa forma, a porcentagem de lipídeos neutros foi determinada por gravimetria. Esta análise também foi realizada para as amostras de fezes devido ser uma etapa prévia da análise de fibras brutas.



Figura 6: Aparelho de extração de lipídios neutros Soxhlet em operação com amostras de ração. Fonte: própria

3.3.5 Fibra Bruta

Para análise de fibras segundo AOAC (1990), recolheu-se a amostra desengordurada em extração Soxhlet para análise de lipídeos neutro e secou-se em estufa a 105°C. Em cadinhos com fundo de vidro sinterizado, foi adicionado 0,5g de areia de diatomácea e colocados em estufa a 105°C por 3h. Após resfriamento em dessecador e pesagem em balança analítica, foi anotado o peso do conjunto e pesado 1,0 g de amostra no cadinho. Os cadinhos foram então acoplados à unidade filtrante e adicionou-se 150mL de solução de ácido sulfúrico 1,25% p/v previamente aquecido sob placa de aquecimento em capela. O aquecimento da unidade filtrante também foi ligado para que ocorresse a ebulição do ácido, bem como foi adicionado 4 gotas de n-octanol para impedir a formação de espuma na coluna da unidade.

O sistema de aquecimento foi desligado após percorridos 30 minutos de ebulição e o sistema de vácuo ligado para drenagem de solução de ácido sulfúrico. Utilizando água deionizada pré-aquecida, a coluna foi lavada por 3 vezes com 30 mL, ligando e desligando o sistema de pressão de maneira a misturar o conteúdo do cadinho e realizar uma melhor lavagem. Uma vez que todo o conteúdo foi drenado, foi adicionado 150mL de solução de hidróxido de potássio 1,25% p/v também pré-aquecido em placa de aquecimento, juntando a este também 4 gotas de n-octanol. Por novos 30 minutos foi ligado o sistema de aquecimento após ebulição e, então, repetiu-se o mesmo processo de drenagem e sistema de lavagem com 3 alíquotas de 30 mL de água deionizada. Após, foi adicionado 150mL de água deionizada fria e esperou-se 10 minutos até total resfriamento do sistema. Após drenada a água de resfriamento, foi utilizado outros 30 mL de água deionizada fria para lavar o cadinho com acionamento e desligamento do sistema de pressão, bem como as posteriores 3 lavagens com 25 mL de acetona PA.

Após lavagens e drenagem do sistema, o cadinho é retirado da unidade filtrante e encaminhado à secagem em estufa a 105°C por 1h. O cadinho é então resfriado em dessecador e pesado. O procedimento é repetido até que a pesagem seja constante. Então, após toda degradação já realizada na amostra, os cadinhos de vidro foram colocados em mufla a 550°C por 3h para calcinação. Após as 3h, o cadinho foi resfriado e pesado, repetindo o procedimento por 1h até obtenção de peso constante.

Desta forma, a quantificação das fibras foi gravimétrica, pela diferença de peso do cadinho antes e após a calcinação em mufla.

3.3.6 Cinzas

Para o método oficial da AOAC (1984) de análise de cinzas, foi inicialmente aquecido a 550°C por 1h os cadinhos de porcelana para cada amostra e, posteriormente resfriados em dessecador e pesados. A tara de cada cadinho foi anotada e então pesados sobre estes 1g da amostra. Antes de encaminhar o conjunto à mufla, a amostra foi carbonizada sob placa de aquecimento. As amostras foram mantidas em mufla por 6h à 550°C até completa mineralização. Resfriou-se em dessecador, pesou-se e foi levada novamente à mufla por 1h até verificação de peso constante. A massa de cinzas corresponde à diferença entre a massa do suporte contendo o resíduo mineral e a do suporte vazio.

3.3.7 Umidade

Para esta análise foi utilizado o método de secagem em estufa a 105°C até peso constante. Inicialmente, foram aquecidos suportes de alumínio à 105°C por 1h, resfriados em dessecador à vácuo e pesados. Em seguida, foi transferida uma fração de 1g de cada uma das amostras aos suportes de alumínio previamente identificados. Levou-se o conjunto à estufa a 105°C por 6h. Após o tempo descrito, o conjunto foi resfriado em dessecador por 5 minutos e, então, pesado em balança analítica. O processo foi repetido, com o conjunto permanecendo em estufa por 1h até que a pesagem atingisse valor constante.

O teor de umidade (%p/p), em base seca, foi obtido pela diferença de peso do conjunto (suporte de alumínio + amostra) antes e depois do aquecimento, uma vez que a umidade corresponde à massa perdida por evaporação.

3.3.8 Análise de cor

Com auxílio de um colorímetro digital para análise em espaço de cor $L^*a^*b^*$ do sistema CIE, foi possível analisar as diferentes colorações das amostras de rações fortificadas. As análises no colorímetro foram realizadas em triplicata. Antes de começar a análise foi realizada a calibração do aparelho com placa branca padrão, seguindo as instruções do fabricante. No espaço de cores $L^*a^*b^*$, o L^* indica a luminosidade, enquanto que o a^* e o b^* , representam as coordenadas cromáticas.

Os resultados foram expressos em L* variando de 0 (preto) a 100 (branco); o a* variando de - a* (-60,0 ; verde) a +a* (+60,0; vermelho) e o b* de -b* (-60,0 ; azul) a +b* (+60,0; amarelo).

3.4 Índice de digestibilidade

Para determinação da digestibilidade da ração, foram utilizados os dados obtidos nas análises bromatológicas das rações e das fezes dos peixes juntamente com os dados de alimentação para realizar o cálculo do Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA). Desta forma, obteve-se os CDA dos nutrientes em termos de proteína, lipídios totais, fibra bruta e cinzas. A fórmula para o cálculo deste coeficiente é apresentada na Equação 1 a seguir:

$$CDA (\%) = 100 \times (Q_{Ig} - Q_{Eg})/Q_{Ig} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

CDA (%) é o coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes;

Q_{Ig} é a quantidade ingerida de um nutriente em gramas na ração;

Q_{Eg} é a quantidade excretada do nutriente em gramas nas fezes.

Essa análise é realizada para os nutrientes em concomitância aos resultados provenientes das análises bromatológicas das rações formuladas e das fezes coletadas.

Assim, para aplicação na fórmula, foram utilizados também a massa total de ração ofertada e de fezes coletadas por tipo de tratamento. Desta forma para obter os valores de Q_{Ig} e Q_{Eg} , utilizou-se as equações a seguir:

$$Q_{Ig} = C_{Rg} \times \alpha_r$$

$$Q_{Eg} = F_{cg} \times \alpha_f$$

Onde:

C_{Rg} é a quantidade de ração consumida por tanque em gramas

α_r é a média da fração do nutriente encontrada nas análises das rações (%)

Q_{Eg} é a quantidade de fezes coletadas por tanque em gramas

α_f é a média da fração de nutrientes encontrada nas análises das fezes (%)

Os CDA dos nutrientes foram obtidos por triplicatas independentes, realizando o cálculo a partir dos dados individuais coletados de cada tanque de tratamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rações de peixe

Inicialmente, avaliou-se o teor de proteína total presente nas amostras de ração controle e fortificada, utilizando albumina de soro bovino como padrão e um fator de diluição de 100x. Foi então calculada a média das triplicatas da análise de cada amostra, bem como o desvio padrão, realizando então uma regressão polinomial de segundo grau, para obtenção do gráfico a seguir:

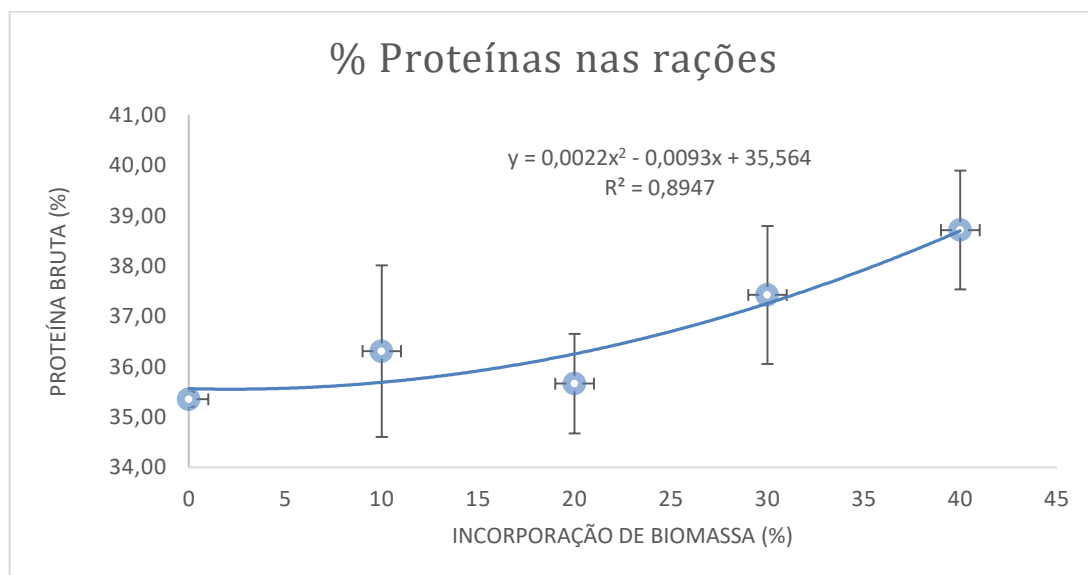


Figura 7: Expressão de proteína total em função do nível de fortificação com a biomassa seca de *S. maxima*. Fonte: própria.

A ração fortificada com a biomassa de *S. maxima* manteve o nível proteico da ração fortificada com a biomassa da alga entre 35 e 39% de proteína total, como

podemos observar na Figura 4. As rações para tilápia devem obter um elevado nível proteico para suprir as necessidades nutricionais dos peixes, desta forma, a fração de proteínas é responsável pela maior parte do custo total da ração. Os peixes, em comparação com outros animais, exigem uma maior quantidade de proteína em suas dietas. Rações completas para peixes devem conter de 28 a 50% de proteína total, variando de acordo com a fase de desenvolvimento, do ambiente e da espécie em questão (FURUYA et al., 2000; CYRINO et al., 2002). A incorporação da biomassa da *S.maxima* é uma alternativa para as rações com elevado nível proteico e, como podemos observar, esta espécie apresenta uma alta porcentagem de proteína em sua biomassa, mantendo o nível de proteínas exigidos quando incorporada à ração, se apresentando como uma boa fonte de fortificação. O interesse na utilização de *Spirulina* como aditivo nutricional se dá não somente pelo quantitativo proteico da biomassa mas também pela qualidade da proteína vegetal fornecida. A Figura 8 apresenta o score químico de aminoácidos para diferentes matrizes vegetais fontes de proteínas, onde é possível visualizar que a *Spirulina* se torna um aditivo muito mais vantajoso, apresentando score maior para a maior parte dos aminoácidos analisados.

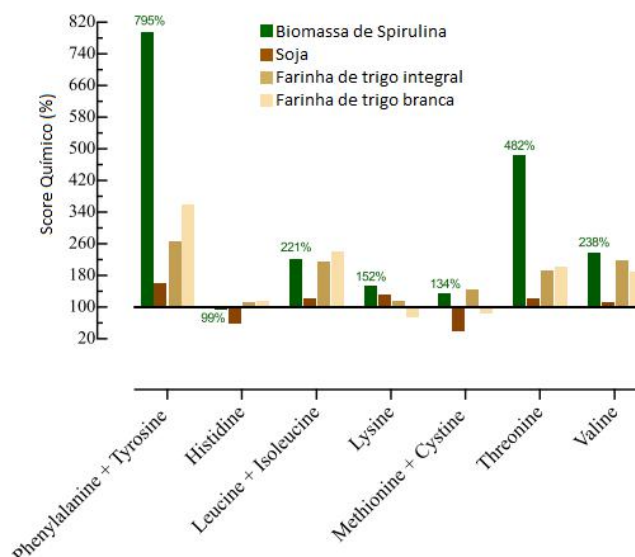


Figura 8: Score químico de aminoácidos da proteína de biomassa de *Spirulina*, de soja, de farinha de trigo integral e farinha de trigo branca. Fonte: DA SILVA, 2021.

Para a determinação do teor de carboidratos foi realizado o método descrito por Dubois e al. e os resultados serão apresentados na Tabela 3. Foram obtidas as

médias das triplicatas realizadas e seus respectivos desvios padrão, apresentando o resultado segundo o método do teste t de Student:

Tabela 3: Resultados da análise de carboidratos totais para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S.maxima*. Fonte: própria

Variável	Incorporação de <i>S. maxima</i> (%)				
	Ração 0%	Ração 10%	Ração 20%	Ração 30%	Ração 40%
Carboidrato (%)	3,49 ^b ± 0,2	4,82 ^a ± 0,5	3,88 ^a ± 0,5	3,68 ^a ± 0,4	3,54 ^a ± 1,0

Diferenças estatísticas das médias $p < 0,05$ (significativo), onde as médias das 3 réplicas biologicamente independentes seguidas por letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as formulações de acordo com o teste t de Student.

A partir do teste estatístico realizado, obteve-se que as rações fortificadas não apresentaram diferença estatística quanto ao teor de carboidratos totais na ração. No entanto, a biomassa da *S.maxima*, segundo Becker (1994), possui baixo teor de carboidrato, contendo maior teor de proteína bruta em sua biomassa, o que corrobora com os dados obtidos neste trabalho, pois não houve grande aumento no teor de carboidrato nas rações em relação ração controle, sem adição da biomassa. Tilápias aproveitam muito bem os carboidratos e as gorduras como fonte de energia. Atualmente, a formulação de dietas para animais tem sido feita visando às exigências energéticas. O balanço entre a energia digestível e a proteína nas rações é fundamental para maximizar a eficiência alimentar e o crescimento dos peixes, como afirma (KUBITZA, 2011).

Os resultados das análises realizadas para determinação do teor de lipídios totais e triacilgliceróis foram compilados na Tabela 4. Os valores das médias das triplicatas realizadas e seus respectivos desvios padrão foram apresentados segundo o método do teste t de Student:

Tabela 4: Resultados da análise de lipídios totais e TAG (triacilgliceróis) para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S. maxima*. Fonte: própria

Variável	Incorporação de <i>S. maxima</i> (%)				
	Ração 0%	Ração 10%	Ração 20%	Ração 30%	Ração 40%
Lipídios (%)	2,08 ^a	1,72 ^a	1,23 ^a	1,83 ^a	3,39 ^b
Triacilgliceróis (%)	5,20 ^a	4,95 ^a	5,69 ^a	5,92 ^a	6,68 ^b

Diferenças estatísticas das médias $p < 0,05$ (significativo), onde as médias das 3 réplicas biologicamente independentes seguidas por letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as formulações de acordo com o teste t de Student.

Para lipídios totais observou-se que a ração fortificada em menores teores de *S. maxima* não apresentou diferença estatística, porém, quando fortificada com 40% da biomassa algácea, a ração apresenta um teor de lipídios significativamente maior. Novamente, na análise de TAG, apenas a ração fortificada com 40% da microalga apresenta um resultado estatístico significativo. Mesmo que a ração com maior nível de fortificação tenha apresentado um teor de lipídios e triacilgliceróis mais elevado, ela ainda confere à ração a disponibilidade de gordura de alta qualidade – fonte natural - e ainda dentro de um nível ideal para o peixe, que deve ter uma dieta com até 8% de fontes lipídicas de forma que não aconteça a inibição da capacidade de expansão dos péletes e prejudiquem a textura do peixe (HONORATO et al., 2013; JOBLING, 2001). Desta forma, a adição de biomassa de *S. maxima* na ração mantém o teor de lipídios apropriado para a alimentação do peixe e oferece uma gordura de fonte natural que é benéfica, conferindo oleosidade e plasticidade ao produto.

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos para a biomassa seca de *S. maxima*.

Perfil	Conteúdo (%)
Ácidos Graxos saturados	
C16:0 (palmitic acid)	57.0 ± 4.6
C18:0 (stearic acid)	2.1 ± 0.4
Ácidos Graxos Monoinsaturados (MUFAs)	
C16:1 <i>n</i> 7 (palmitoleic acid)	2.2 ± 0.2
C18:1 <i>n</i> 9 (oleic acid)	6.0 ± 0.7
Ácidos Graxos Poliinsaturados (PUFAs)	
C18:2 <i>n</i> 6 (linoleic acid)	16.0 ± 0.7
C18:3 <i>n</i> 6 (γ-linolenic acid, GLA)	13.8 ± 0.4
C18:3 <i>n</i> 3 (α-linolenic acid, ALA)	1.3 ± 0.1
C20:2 <i>n</i> 6 (eicosadienoic acid)	1.6 ± 0.2
Total de Ácidos Graxos Saturados	59.1
Total MUFAs	8.2
Total PUFAs	32.7
Total Ácidos Graxos insaturados	40.9
Razão insaturado/saturado	0.7

Fonte: DA SILVA, 2021 (adaptado).

A Tabela 5 apresenta o perfil de ácidos graxos presentes na biomassa de *Spirulina*, onde observa-se uma razão entre ácidos insaturados e saturados de 0,7. Esta razão elevada garante relevância nutricional à biomassa bem como a presença de ácidos como GLA e o alto percentual de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), que os peixes não são capazes de sintetizar e que precisam ser fornecidos na dieta pois só por meio dela podem ser incorporados nos tecidos (TOCHER et al., 2006).

Tabela 6: Resultados da análise de Fibra Bruta para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S. maxima*. Fonte: própria

Variável	Incorporação de <i>S. maxima</i> (%)				
	Ração 0%	Ração 10%	Ração 20%	Ração 30%	Ração 40%
Fibra Bruta (%)	5,32 ^a	5,58 ^a	5,29 ^a	4,59 ^a	5,03 ^a

Diferenças estatísticas das médias $p < 0,05$ (significativo), onde as médias das 3 réplicas biologicamente independentes seguidas por letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as formulações de acordo com o teste t de Student.

Como foi apresentado na tabela acima, na determinação do teor de fibra bruta das rações analisadas, não foram registradas diferenças significativas entre as

rações, porém vemos que a substituição percentual de microalga na ração manteve o nível de fibra bruta baixo, se aproximando da recomendação do *National Research Council*–NRC (1993) que propõe que rações compostas por ingredientes de origem vegetal devam conter de 3,0 a 5,0% de fibra bruta. A tilápia do Nilo requer uma alimentação equilibrada e com teor de fibra bruta de até 8% visto que há estudos que revelam que teores de fibra muito elevados podem inibir o crescimento dos animais (LEARY & LOVELL, 1975; DUPREE & SNEED, 1966; DIONDICK & STOM, 1990). O nível de fibra bruta na dieta dos peixes pode influenciar a digestibilidade, a velocidade de trânsito gastrointestinal, a morfologia do trato digestivo, o desempenho produtivo, o rendimento e a composição química da carcaça dos peixes, principalmente no seu teor de lipídios (LEARY & LOVELL, 1975; SHIAU et al., 1988). Ao utilizar a biomassa de *S.maxima*, um microrganismo que não apresenta parede celular com celulose, a digestibilidade pode chegar a 90% (MOURTHÉ, 2010), apresentando grande vantagem de interesse biotecnológico. Estudos realizados com diferentes concentrações de fibra bruta em tilápia do Nilo observaram que rações contendo 2,5 e 5,0% de fibra bruta em relação as que continham 0,0 e 10% apresentaram maior índice de crescimento dos alevinos (DIONDICK & STOM, 1990).

Tabela 7: Resultados da análise de Cinzas e Umidade para as amostras de ração controle e fortificada com biomassa seca de *S.maxima*. Fonte: própria

Variável	Incorporação de <i>S. maxima</i> (%)				
	Ração 0%	Ração 10%	Ração 20%	Ração 30%	Ração 40%
Umidade (%)	5,6 ^a	5,3 ^a	5,9 ^b	5,4 ^a	5,6 ^a
Cinzas (%)	7,5 ^a	7,4 ^a	6,1 ^b	5,4 ^b	5,1 ^b

Diferenças estatísticas das médias $p < 0,05$ (significativo), onde as médias das 3 réplicas biologicamente independentes seguidas por letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as formulações de acordo com o teste t de Student.

Com relação ao teor de água, as rações para peixes podem ser classificadas em úmida (50 a 70% de umidade), semiúmidas (35 a 40% de umidade) e secas (umidade inferior a 12%) (JOBILING et al., 2001). As rações úmidas e semiúmidas são geralmente comuns, normalmente fabricadas na própria piscicultura, com resíduos de origem animal e vegetal, após moagem, passam por um moedor de carne, produzindo uma ração que deve ser armazenada em congelador (PEREIRA-

FILHO, 1995). Quanto ao teor de umidade das rações deste trabalho, todas as dietas após a peletização foram encaminhadas à secagem a sombra a temperatura ambiente, e todas podem ser classificadas como ração seca apresentando um teor de umidade entre 5 e 6%, sendo uma ração considerada com maior estabilidade do que as rações úmidas. Como é possível observar na tabela, a variação do teor de cinzas entre a ração controle (0%) e a ração fortificada com 10% da biomassa não apresentou diferença significativa, porém, para as rações 20, 30 e 40% foram constados teores inferiores de cinzas, não havendo diferenças significativas entre estes três. De acordo com Moretto (2008), o teor de cinzas fornece uma indicação da quantidade de elementos minerais e, também, indícios sobre a pureza ou contaminação e composição centesimal de um produto. A composição centesimal das cinzas da biomassa de *S.maxima*, relatada por Da Silva (2021) revelou a presença de diversos micronutrientes tais como potássio, sódio, fósforo, magnésio, cálcio e ferro, que são micronutrientes importantes para o desenvolvimento e o crescimento dos animais cultivados (FELTES et al., 2010)

Tabela 8: Análise dos parâmetros de cor L*, a* e b* da ração controle (0% de *S.maxima*) e rações fortificadas (10, 20, 30 e 40% de *S.maxima*). Cada valor representa a média da triplicata de três experimentos independentes. Fonte: própria

Parâmetros	Incorporação de <i>S. maxima</i> (%)				
	Ração 0%	Ração 10%	Ração 20%	Ração 30%	Ração 40%
L*	71,20 ^a	52,05 ^a	45,00 ^b	43,46 ^b	40,25 ^b
a*	3,15 ^a	-9,26 ^b	-9,15 ^c	-9,22 ^e	-8,31 ^d
b*	22,50 ^a	8,32 ^b	8,24 ^c	8,65 ^{cd}	9,29 ^d

Vemos os resultados dos parâmetros de cor obtidos para as amostras da ração controle 0% e das rações adicionadas com biomassa de *S.maxima*. Podemos perceber que no parâmetro L* a ração 0% e a ração 10% apresentaram valores significativamente maiores que das rações 20, 30 e 40%. No parâmetro a* todas as rações que foram adicionadas de biomassa de *S.maxima* apresentaram valores negativos, indicando que as rações 10, 20, 30 e 40% tiveram maior tendência a

coloração verde, em relação à ração controle. Em relação ao parâmetro b^* , a ração controle apresentou valor superior estatisticamente, o que indica coloração mais amarela, pois a ração controle não apresenta biomassa da *S. maxima*. Estudos realizados com ração adicionada de *S. maxima* analisaram os parâmetros de cor do filé e da cor da pele dos peixes alimentados e perceberam aumento significativo na cor com a fortificação no tratamento com 8%, exibindo valores mais altos que o controle (ROOHANI, et al.,2018). No entanto, ao contrário de outras algas, *S. maxima* não apresenta parede celular de celulose, que pode ser facilmente digerida pelas enzimas digestivas dos peixes. Além disso, a parede celular da *S. maxima* é uma rica fonte de muco-proteínas, que melhoram a aparência e o brilho da pele dos peixes (JAMES, VASUDHEVAN e SAMPATH, 2009).

4.2 Digestibilidade

A análise de digestibilidade é de suma importância devido a questão de eficiência biológica da alimentação ofertada (HANLEY, 1987). Para avaliar a digestibilidade das rações, foram realizadas as análises de proteína total, lipídios totais, cinzas e fibras brutas presentes nas fezes dos peixes. Em seguida, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes. Os resultados encontrados são apresentados a seguir:

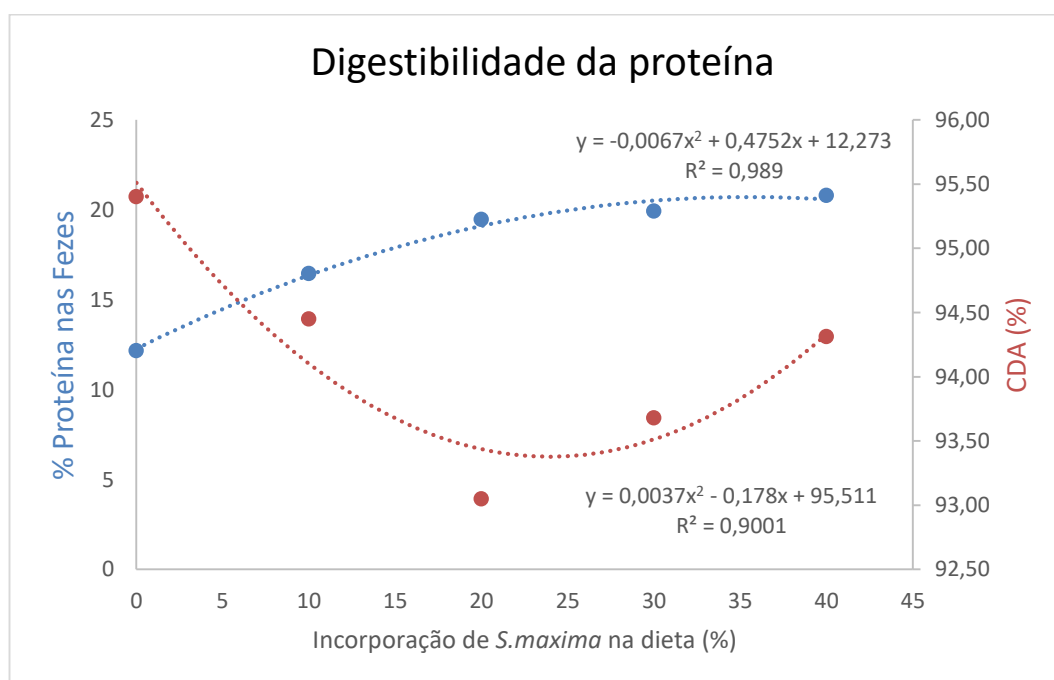


Figura 9: Expressão de proteína total nas fezes do peixe e CDA em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea. Fonte: própria

A Figura 9 mostra os resultados obtidos nas análises bromatológicas bem como os valores de CDA obtidos a partir destes. Quando avaliado individualmente, a expressão de proteínas encontrada nas fezes sugeriria um comportamento de digestibilidade decrescente conforme incorpora-se *S.maxima* nas fezes. Contudo, ao analisar os CDA calculados, percebe-se que a digestibilidade decresce nos baixos níveis de fortificação porém o ajuste linear realizado sugere que os valores tornam-se crescentes com níveis mais elevados de fortificação; tais diferenças se dão pois as análises brutas realizadas nas amostras de fezes calculam a quantidade de proteína na amostra, enquanto o cálculo do CDA gera um valor percentual de digestibilidade da proteína considerando a quantidade de ração ofertada na alimentação dos alevinos. A alimentação destes foi ofertada até a saciedade aparente, gerando massas de ração ofertada em diferentes valores para cada tanque de cultivo. Desta forma, a curva plotada para a concentração dos nutrientes quantificados pode não apresentar o mesmo comportamento que a curva do CDA ao longo deste trabalho.

Concordando com os estudos realizados e já citados neste trabalho, a digestibilidade de proteína em dietas fortificadas com a biomassa de *S.maxima* atingiu valores superiores a 90%, evidenciando-se como um excelente substituto à utilização de proteínas de fontes animais. Vale lembrar que as rações fortificadas objeto deste estudo foram formuladas com *S.maxima* e baixos níveis de farelo de soja e farinha de peixe, diminuído as fontes de proteínas usuais e contrapondo-se à ração controle, como pode ter observado na Tabela 2.

Em estudos realizados para dietas fortificadas com *Spirulina sp* em níveis de 20% e 40% de incorporação da biomassa relataram que o CDA de proteína para a tilápia do Nilo apresentou valores entre 90,0 e 94,5% (HORN E MESSER, 1992), o que também foi verificado no presente estudo com *Spirulina maxima*. A digestibilidade de proteínas e de outros nutrientes provenientes da alimentação oferecida dependerá da espécie de peixe e da fonte de alga utilizada, como concluiu Gong et al., (2017) e Sarker et al., (2016). Quando comparada à outras fontes vegetais como farelo de soja, farelo de trigo, farelo de arroz e milho, o CDA da proteína bruta das rações fortificadas com *S.maxima* deste estudo obtiveram valores

superiores às fontes vegetais citadas, que variaram de 56,8% a 85,0% para dietas formuladas também para tilápias do Nilo (GUIMARÃES et al, 2008). Exemplificando a variabilidade da digestão por diferentes espécies de animais aquáticos, um estudo realizado com o Bagre africano da espécie *Clarias gariepinus* com dieta fortificada com *Spirulina* encontrou valores de CDA de proteína bruta de 98,64% (RAJI et al., 2020). Dados como este demonstram que a ração enriquecida com biomassa de *Spirulina*, possui alto valor e interesse biotecnológico para utilização como ingrediente de rações para peixes ao invés de outras matrizes vegetais.

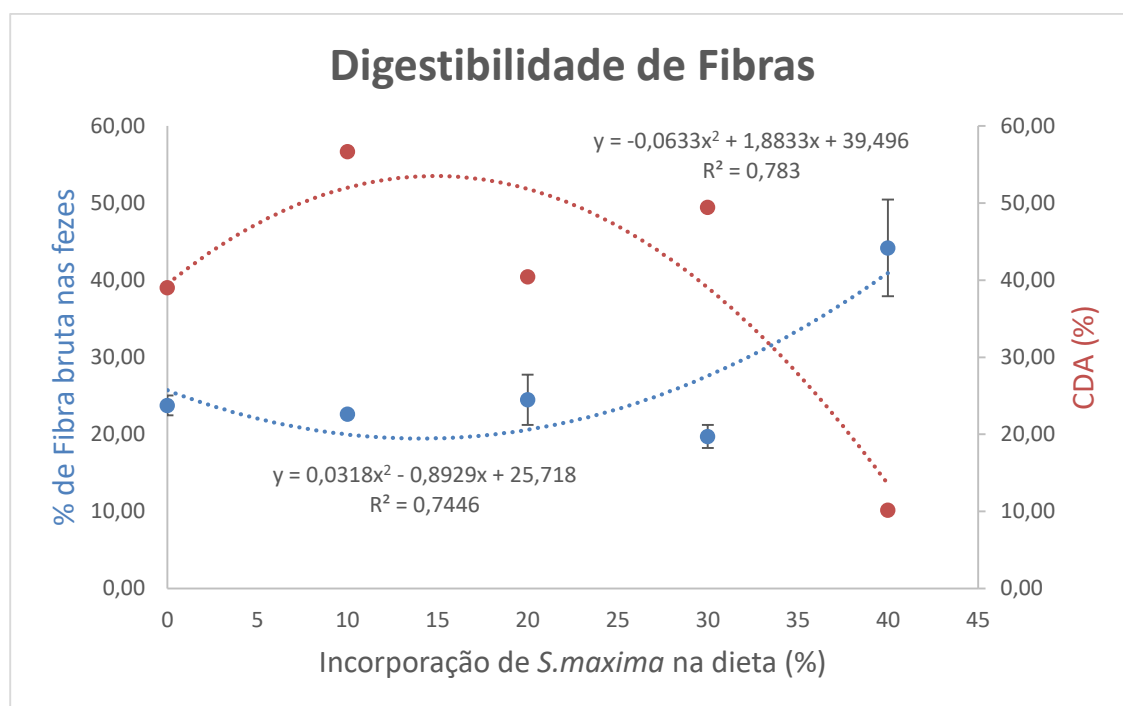


Figura 10: Expressão de fibra bruta nas fezes do peixe e CDA(%) em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea. Fonte: própria

É possível ver que, quando se insere a ração com biomassa de *S. maxima* na alimentação dos alevinos, a porcentagem de fibras nas fezes é mantida em relação a alimentação com a ração controle, apresentando uma alta significativa somente na dieta com fortificação de 40%. Ao observar os CDA para fibra bruta vemos que a dieta fortificada em 10% apresentou uma digestibilidade muito superior, de 56,70%, comparada à dieta controle que registrou um índice de 39,04%. As rações 20 e 30% obtiveram um índice de digestibilidade superior à ração controle, no entanto, com o aumento da fortificação, na proporção de 40%, a digestibilidade foi baixa, de somente 10,18%.

A fibra bruta em rações para peixes funciona como uma moduladora da disponibilidade dos demais nutrientes (ANDERSON et al., 1984). Isso porque a fibra controla o tempo de esvaziamento gástrico, interferindo no tempo disponível para absorção dos nutrientes (MADAR & THORNE, 1987). Dessa forma, é desejável boa digestibilidade da fibra, de forma que ela não interfira na absorção dos demais nutrientes, como relata Guimarães et al (2008). As rações comerciais formuladas com farinha de peixe são consideradas alimentos de boa digestibilidade de fibra (FAO, 2016), assim a ração fortificada com 10% da biomassa seca de *Spirulina* se mostra ainda mais vantajosa, apresenta maiores níveis de CDA.

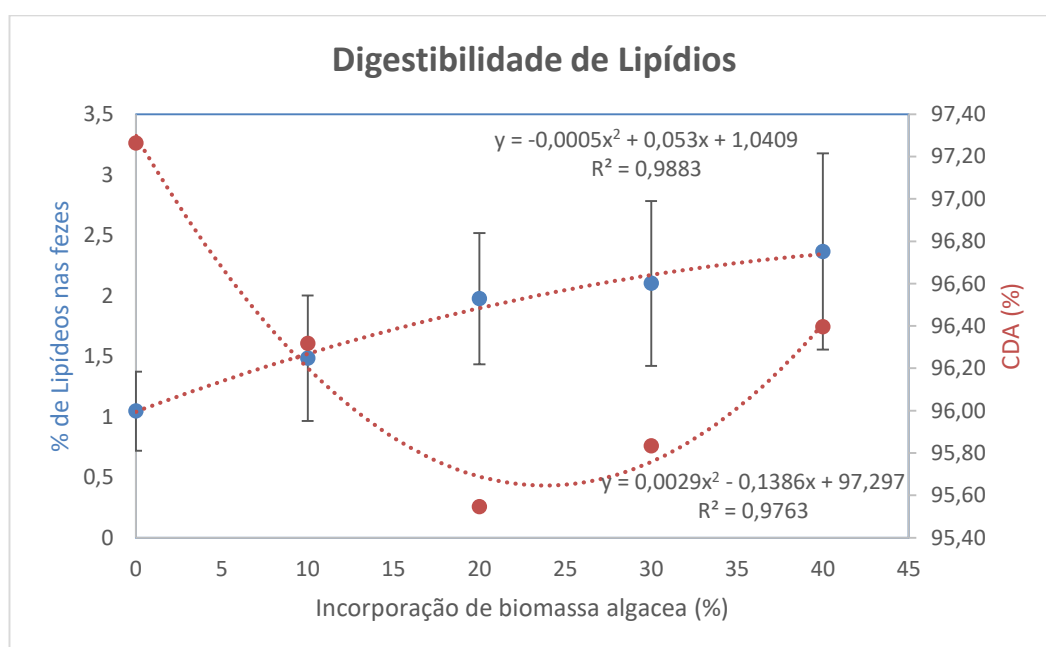


Figura 11: Expressão de lipídios nas fezes do peixe e CDA(%) em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea. Fonte: própria

Considerando o teor de lipídios encontrado nas fezes dos peixes em função da taxa de incorporação de biomassa algácea na alimentação, vemos que há uma tendência bem ajustada, uma vez que o valor R^2 para a linha de tendencia polinomial de segundo grau plotada apresenta um valor bem próximo de 1. Quando comparamos os valores de lipídeos presentes nas fezes com os valores de lipídeos presentes na ração, apresentados na Tabela 4, pode ser observado que em comparação com a ração controle, a ração fortificada teve uma menor digestibilidade, uma vez que apresentou um maior percentual de lipídeos nas fezes. Este dado é confirmado quando analisamos o CDA para lipídios, que apresenta

valores inferiores para todas as dietas com fortificação, em comparação a ração controle. Dentre as fortificadas, a com 10 e com 40% apresentaram os melhores índices de digestibilidade, porém todas as dietas apresentaram ótimos resultados, com valores superiores a 95%.

Alguns CDA lipídicos relatados na literatura (TEULING e al., 2017; SARKER et al., 2016; RAJI et al., 2020), estão na mesma faixa dos resultados apresentados neste trabalho de 95,54% a 97,26% para lipídeo.

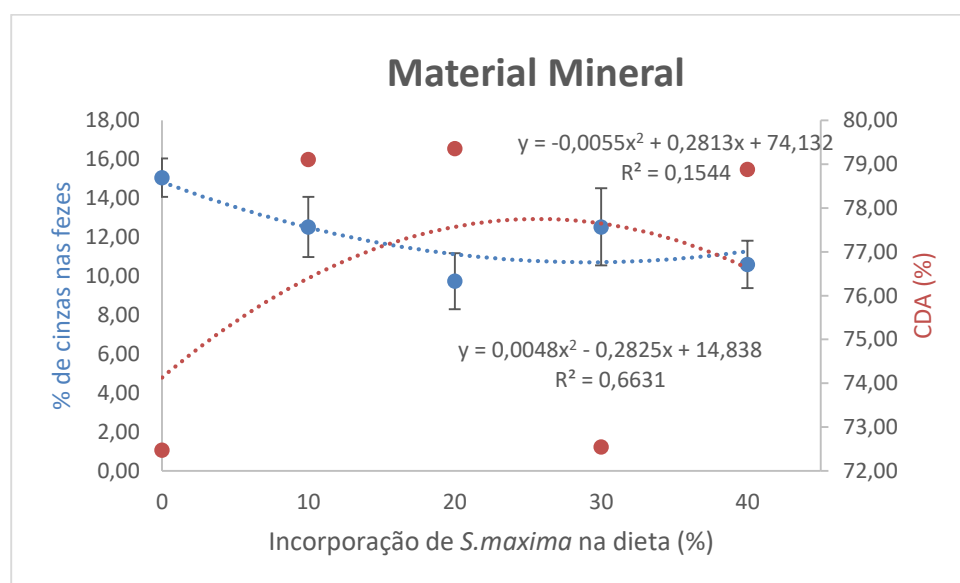


Figura 12: Expressão de cinzas nas fezes do peixe e CDA(%) em função do nível de fortificação alimentar com a biomassa algácea. Fonte: própria

Para CDA cinzas foram relatadas de 53% a 74% em esturjão e tilápia (RAJI et al, 2020), valores maiores foram encontrados neste trabalho (72,47% a 79,35%), principalmente nas rações fortificadas com *Spirulina*, apresentando diferenças estaticamente em relação a ração controle. As fezes avaliadas apresentam um menor teor de material mineral em dietas com a introdução da biomassa algácea e, quando avaliados os CDA destes, vemos que as dietas com as rações 10% e 20% garantiram maiores absorções de material orgânico. Como já discutido, a *S.maxima* possui uma grande disponibilidade de micronutrientes e, como mostra a Figura 12, estes possuem uma boa digestibilidade pelos peixes de forma que irá suprir as necessidades dos alevinos. Comparado às outras fontes proteicas vegetais, a *Spirulina* se destaca, uma vez que estes ingredientes geralmente são pobres em

minerais, além de possuírem fatores antinutricionais que diminuem a digestibilidade e consequente absorção destes (NRC, 2011).

5 CONCLUSÕES

- Foi possível evidenciar o interesse em utilizar a biomassa seca de *S. maxima* na formulação de ração para alevinos de tilápia do Nilo, devido a sua composição de micronutrientes e macronutrientes, oferecendo diversos benefícios à saúde e ao desenvolvimento do animal.
- Quanto ao nível proteico da ração incorporada com *Spirulina maxima*, há a manutenção do nível proteico entre 34 a 39% de proteínas totais, como se é exigido para as dietas desses alevinos. A proteína da biomassa de *S.maxima* garante à dieta do peixe uma gama de aminoácidos essenciais, vitaminas e pigmentos, como clorofila, carotenoides e ficocianina, fazendo dela um excelente aditivo nutricional.
- Houve diminuição da porcentagem de fibra ao adicionar *S. maxima* à ração, porém, o teor final de fibra está dentro dos níveis tolerados pelos peixes, que pode chegar até 8% de fibra bruta de origem vegetal.
- Devido à ausência de parede celular com celulose, a utilização da *S.maxima* como parte da dieta torna-se vantajosa, pois permite chegar a altos teores de digestibilidade dos nutrientes, como foi comprovado pelo estudo.
- Os teores de TAG das rações fortificadas com a biomassa em relação a ração controle foram mantidos, não havendo diferença significativa, porém deve-se destacar o excelente perfil de ácidos graxos presentes na biomassa de *S.maxima*, apresentando um alto teor de PUFA's, agregando valor nutricional ao produto final.
- A ração fortificada com 40% apresentou nível significativamente maior na quantificação de lipídios totais. As demais rações não apresentaram diferenças significativas, mantendo o nível de lipídios necessários à dieta para que se tenha a uma boa textura do peixe.
- O teor de umidade na ração ficou entre 5 e 6%, podendo ser considerada ração seca, com maior estabilidade.
- A ração com 10% de fortificação manteve o nível de cinzas quando comparados a ração basal. A utilização de *S.maxima* garante à ração a disponibilidade dos principais minerais necessários ao desenvolvimento das tilápia.

- Na análise de cores, a adição de *S.maxima* na ração pode ser considerada uma excelente opção para melhorar a cor do filé e da pele dos peixes, uma vez que torna-se uma alternativa viável de pigmento natural.
- A digestibilidade da ração foi avaliada através dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de nutrientes em dietas fortificadas com *Spirulina* e a dieta controle para tilápia do Nilo. Apesar de apresentar algumas diferenças significativas entre as dietas com biomassa de *Spirulina* em relação à dieta controle, o CDA para as dietas com biomassa de *Spirulina* apresentou resultados que induzem à uma excelente digestibilidade da dieta, sendo equivalente à ração controle, que por sua vez possui uma grande quantidade de farinha peixe em sua formulação
- A ração contendo biomassa de *Spirulina* mostrou ser um alimento alternativo para o enriquecimento de ração para organismos aquáticos, sendo uma alternativa à farinha de peixe por ser uma excelente fonte de proteína que agrega grande valor à ração. Além disso, o cultivo de microalgas é de maior facilidade, gerando baixo impacto ao meio ambiente. A ração em nível de fortificação de 10% de incorporação da biomassa apresentou valores satisfatórios de composição bioquímica e digestibilidade pelo peixe, figurando o melhor custo/benefício, uma vez que a biomassa algácea ainda representa um alto custo de produção (PEREIRA, 2017)

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULRAHMAN, N. M.; HAMA, H. J.; HAMA, Sh. R.; HASSAN, B.R.; NADER, P. J., Effect of microalgae *Spirulina* spp. as food additive on some biological and blood parameters of common carp *Cyprinus carpio* L. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 33, No. 1, 2019

AIBA, S.; OGAWA, T. Assesment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis* in axenic and continous culture. *J. Gen. Microbiol*, v.102, p.179-82, 1977.

ALVA, J. C. R., Farinha de peixe e rações com proteína de origem vegetal formuladas com base na proteína ideal: desempenho, rendimento de carcaça e análise sensorial de carne de frangos de corte. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Campus De Jaboticabal, 2010.

ALAGAWANY, M., TAHA, A. E., NORELDIN, A., EL-TARABILY, K. A., EL-HACK, M. E. A., Nutritional applications of species of spirulina and *Chlorella* in farmed fish: a review. *Aquaculture*, v.542, 2021.

ANDERSON, J., JACKSON, A.J., MATTY, A.J. AND CAPPER, B.S. Effects of dietary carbohydrate and fibre on the tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.). *Aquaculture* **37**, 303–314, 1984

ANDRADE, L. M., ANDRADE, C. J., NASCIMENTO, C. A., MENDES, M., Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Processing & Technology*, MesCrave, v6, issue 2, 2018.

AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 3. ed. Champaign, v. 1-2, 1995.

BECKER, E.W. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, U.K. 1994.

BECKER, W. Microalgae for human and animal nutrition. In: A. RICHMOND and Q. HU, eds. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2nd ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, pp. 461-503, 2013.

BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal Proteins: Extraction, Application and Challenges Concerning Production. *Foods*, v.6, n. 5, p.33, 2017.

BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577, 2010.

COLDEBELLA, I. J., NETO, J. R., Farelo De Soja Na Alimentação De Alevinos De Jundiá (*Rhamdia quelen*), *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.3, p.499-503, 2002

CYRINO, J. E. P., CASTAGNOLLI, N. Produção da tilápia vermelha da Flórida em tanques-rede. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 56, p. 673-679, 2002.

DEMARCO, M. Produção e caracterização de pós de spirulina por diferentes métodos de secagem. Dissertação de mestrado. Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

DIOUNDICK, O.B.; STOM, D. Effects of dietary alfa cellulose on the juvenile tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, v.91, n.3/4, p.311-315, 1990.

DUBOIS, M, GILLES KA, HAMILTON, JK, REBERS, PA, & SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 350 – 356, 1956.

DUPREE, H. K., Vitamins essential for growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Tech. Pap. 7, US Fish and Wildlife Service, 148-150, 1966.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. THE STATE OF THE WORLD series of the Food and Agriculture Organization of the United Nations Aquaculture, Rome, Italy, v. 35, n. 227, 2018.

FELTES, M. M.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, L. H.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.

FERREIRA, M. M., Spirulina: Uma Revisão. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal De Uberlândia, Minas Gerais, 2020.

FOLCH J, LEES M, STANLEY GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry, 1957.

FURUYA, W.M., HAYASHI, C., FURUYA, V. R. Exigência de proteína para alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia. V.29, n.6, p. 1912-1917, 2000.

GOGOI, S., MANDAL, S., & PATEL, A. Effect of dietary *Wolffia arrhiza* and *Spirulina platensis* on growth performance and pigmentation of Queen loach *Botia dario* (Hamilton, 1822). Aquaculture Nutrition, 24, 285–291, 2018.

GONZÁLEZ-FÉLIX M.L., MINJAREZ-OSORIO C., PÉREZ-VELÁZQUEZ M., SUÁREZ-JIMÉNEZ G.M., IBARRA-GARCÍAPARRA G.E. A solha de Cortez *Paralichthys aestuarius* como espécie candidata para a aquicultura: primeiro relatório sobre o crescimento em cativeiro em resposta a diferentes dietas níveis de proteína. Aquaculture 420-421: 225-230, 2014.

GRESSLER, V.; YOKOYA, N. S.; FUJII, M. T.; COLEPICCOLO, P.; MANCINI, J. F.; TORRES, R. P.; PINTO, E.; Food Chem. 120, 585, 2010.

GONG, M. BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. Biotechnology Advances, 34, 2016.

GUIMARAES, I. G., PEZZATO, L. E., BARROSOS, M. M. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Nutrition, 14, 396– 404, 2008.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L.; Lipids and Lipid Metabolism in Eukaryotic Algae. Progress in Lipid Research, 45, 160, 2006

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular. N° 1034. Roma, FAO. 33p. 2008.

HAMDAN, V. P. T., Cultivo de microalgas em soro de fécula de mandioca. Tese de Doutorado, Universidade Federal De Campina Grande, Pernambuco, 2019

HANLEY, F., The digestibility of foodstuffs and effects of feeding selectivity and digestibility determinations in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, vol. 66, no. 2, pp. 163-179, 1987.

HONORATO, C. A.; ALMEIDA, L. C.; NUNES, C. S.; CARNEIRO, D. J.; MORAES, G. Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Nutrition*, v. 16, p. 91-99, 2010.

HORN, M. H., MESSER, K.S. Fish guts as chemical reactors: a model of the alimentary canals of marine herbivorous fishes. *Marine Biology*, 113, 527-535, 1992.

JAMES, R., VASUDHEVAN, I., SAMPATH, K., Interação da espirulina com diferentes níveis de vitamina E no crescimento, reprodução e coloração em peixes dourados (*Carassius auratus*). *Jornal Israelense de Aquicultura*, 61 (4), 330-338, 2009.

JOBLING, M. Nutrient repartitioning and the influence of feed composition on body composition. In: HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Ed.). *Food Intake in Fish*. Oxford: Blackwell Publishing, cap. 15, p. 354-375, 2001.

KOVAČ, D.J. et al. Algae in food and feed. *Food Feed Research*. v. 40, p. 21–31, 2013.

KUBITZA, F., *Nutrição e alimentação dos peixes cultivados*. Jundiaí: F. Kubitza, 123p. 2011.

LAFARGA, T., FERNÁNDEZ-SERVILHA, J.M., GONZÁLEZ-LÓPES, C., ACIÉN-FERNÁNDEZ, F.G. Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*. 137, 2020.

LEARY, D. F., LOVELL, R. T. Value of Fiber in Production-Type Diets for Channel Catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*. Volume 104, Issue 2 p. 328-332, 1975

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-276, 1951.

LUPATINI, A. Extração de Proteínas e Carboidratos da Biomassa de *Spirulina Platensis* e Caracterização da Fração Pro. Dissertação de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2016.

MADAR, Z.; THORNE, R. Dietary fiber. *Progress in Food and Nutrition Science*, v.11, p.153-174, 1987.

MADEIRA, M. S. et al. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, v. 205, p. 111–121, 2017.

MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232, 2010.

MENDOZA H., JARA, A., PORTILLO, E. Planta piloto de cultivo de microalgas: Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias, 60 pp. Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Cruz de Tenerife, 2011.

MONTALVO, G. E. B., DISCOVERY OF NOVEL BIOACTIVE PEPTIDES FROM *Spirulina (Arthrospira) maxima*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Tocantins, 2018.

MORETTO, E. Introdução à ciência de alimentos. 2.ed. Ampliada e revisada. Florianópolis: Editora da UFSC, 2008.

MOTA, M. Caracterização e hidrólise enzimática da microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

MOURTHÉ, K. Obtenção de Biomassa de *Arthrospira Platensis (Spirulina)* Utilizando do Soro de Leite. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, Washington DC, 2011.

OLSEN, R.L., HASAN, M.R. A limited supply of fishmeal: impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 27, no. 2, pp. 120-128, 2012.

PEREIRA, M. I. B., Avaliação do cultivo mixotrófico da *spirulina platensis* (*arthrospira platensis*) utilizando soro de queijo mozzarella de búfala como fonte de carbono orgânico. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte – Ufrn, Rio Grande do Norte, 2017.

PEREIRA-FILHO, M. Efeito de diferentes níveis de proteína e de fibra no desempenho, digestibilidade da fração protéica e características da carcaça de carpa (*Cyprinus carpio L. 1758*). Jaboticabal: Universidade Estadual de São Paulo, 96p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Universidade Estadual de São Paulo, 1995.

PÉREZ, A. H., LABBÉ, J. I. Microalgas, cultivo y beneficios. Rev. biol. mar. oceanogr. vol.49 no.2 Valparaíso, 2014.

PHANG, S. M.; MIAH, M. S.; YEOH, B. G.; HASHIM, M. A. Spirulina culture in digested sago starch factory waste water. Journal of Applied Phycology, v. 12, p. 395-400, 2000.

PRATIWI, F. M.; PRATIWI, D. Y. The potentiality of microalgae as a source of DHA and EPA for aquaculture feed: A review. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 8(4): 39-41, 2020.

RAJI AA, ALABA PA, YUSUFH, BAKAR NHA, TAUFEEK NM, MUIN H, ALIAS Z, MILOW P, RAZAK SA. Fishmeal replacement with *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* in African catfish (*Clarias gariepinus*) diet: effect on antioxidant enzyme activities and haematological parameters. Res Vet Sci 119:67–75, 2018.

RAJI, A. A., JIMOH, W. A., ABU BAKAR, N. H. MOHD TAUFEEK, N.H., MUIN H., ALIAS Z., MILOW, P., ABDUL RAZAK S. Dietary use of *Spirulina* (*Arthrospira*) and *Chlorella* instead of fish meal on growth and digestibility of nutrients, amino acids and fatty acids by African catfish, 2020.

SIMÃO, B. L., Pirólise de *Spirulina maxima*: valores de energia de ativação e catálise insitu aumentando a seletividade para hidrocarbonetos aromáticos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2017.

ROOHANI, A.M; KENARI, A.A; KAPOORCHALI, M.F; BORANI, M.S; ZORRIEHZAHRA, M.J; SMILEY, A. H; ESMAEILI, M; ROMBENSO, A. N. Effect of spirulina *Spirulina platensis*

as a complementary ingredient to reduce dietary fish meal on the growth performance, whole-body composition, fatty acid and amino acid profiles, and pigmentation of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*. P.1-13. 2018.

ROSAS, V.T., MONSERRAT, J.M., BESSONART, M., MAGNONE, L., ROMANO, L.A., TESSER, M.B. Comparison of β -carotene and *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) in mullet (*Mugil liza*) diets and effects on antioxidant performance and fillet colouration. *Journal of Applied Phycology*. 31, 2019.

SARKER, P.K., FOURNIER, J., BOUCHER, E., PROULX, E., DE LA NOÛE, J., VANDENBERG, G.W. Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim Feed Sci Technol*, 168, 241–249, 2016.

SASAKI, K. Farinha e óleo de peixe: duas matérias primas importantes no mercado global dos ingredientes. *Revista Graxaria*, 2017.

SHAH, M.R., LUTZU, G.A., ALAM, A., SARKER, P., KABIR CHOWDHURY, M.A., PARSAEIMEHR, A., LIANG, Y., DAROCH, M. 2. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*. 30, 197–213, 2018.

SHIAU, S.Y.; YU, H.L.; HWA, S. et al. The influence of carboxymethylcellulose on growth, digestion, gastric emptying time and body composition of tilapia. *Aquaculture*, v.70, p.345-354, 1988.

SIKOTARIYA, S., YUSUFZAI, S.I. Effect of *Ocimum sanctum* (Tulsi) powder on the growth and survival in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, vol. 7, no. 4, pp. 239-244, 2019.

SILVA, S. P., VALLE, A. F., PERRONE, D. Microencapsulated *Spirulina maxima* biomass as an ingredient for the production of nutritionally enriched and sensorially well-accepted vegan biscuits. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. *Journal Bioscience Bioengineering*. v.101 n. 2, p. 87–96, 2006.

SUGIHARTO, S. Nutraceutical aspects of microalgae *Spirulina* and *Chlorella* on broiler chickens. Department of animal science, Faculty of Animal and Agricultural Sciences, Diponegoro University, Indonesia, 2020.

TEIMOURI, M., YEGANEH, S., & AMIRKOLAIE, A. The effects of *Spirulina platensis* meal on proximate composition, fatty acid profile and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Aquaculture Nutrition*, 22, 559–566, 2016.

TEULING, E, SCHRAMA, J. W., GRUPPEN, H., WIERENGA, P.A. Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 479, 490–500, 2017.

TOCHER, D. R.; ZHENG, X.; SCHLECHTRIEM, C.; HASTINGS, N.; DICK, J. R. TALE, A. J. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl Δ^6 desaturase of atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids*, v. 41, p. 1003-1016, 2006.

TOKER, O. S., *Porphyridum Cruentum* as a natural colorant in chewing gum, *Food Sci. Technol* 39, S.1, 2019

VELASQUEZ, S.F., CHAN, M.A., ABISADO, R.G., TRAI FALGAR, R.F.M., TAYAMEN, M.M., MALIWAT, G.C.F., RAGA ZA, J.A. Dietary *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Phycology*, 28, 1023–1030, 2016.

YUCETEPE, A.; SAROGLU, O.; DASKAYA-DIKMEN, C.; BILDIK, F.; OZCELIK, B.; Optimisation of ultrasound assisted extraction of protein from *Spirulina platensis* using RSM. *Journal Czech Food Science*. V. 36, p. 98-108, 2018.

WANG, Y., YU, S., WANG, Y., CHE, J., ZHAO, L., BU, X., YANG, Y. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion of juvenile *Pseudobagrus ussuriensis*. *Aquaculture Research*, vol. 47, no. 10, pp. 3145-3155, 2016.

WYSOCZAŃSKI, T.; SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, E.; PEKALA, J.; LOCHYŃSKI, S.; CZYŻ, K.; BODKOWSKI, R.; LIBROWSKI, T. Omega-3 fatty acids and their role in central nervous system – A review. Retrieved from *Current Medicinal Chemistry*. V. 23(8), p. 816–831, 2016.