



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

CULTIVO DO COPÉPODE (*Acartia tonsa*), EM SISTEMA
INTENSIVO, ALIMENTADO COM ESPIRULINA COMERCIAL
LIOFILIZADA (*Arthrospira sp.*).

Dissertação de mestrado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em
Aquicultura do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito
parcial à obtenção do título de
Mestrado em Aquicultura.

Orientadora: Mônica Yumi Tsuzuki

WESLEY FREITAS DA ANNUNCIÇÃO

Florianópolis – 2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

A615c Annuniação, Wesley Freitas da
Cultivo do Copépode, (*Acartia tonsa*), em sistema intensivo,
alimentado com espirulina comercial liofilizada (*Arthrospira*
sp.) [dissertação] / Wesley Freitas da Annuniação ;
orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki. - Florianópolis, SC, 2011.
72 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Copépode. 3. *Acartia tonsa*. 4.
Spirulina. I. Tsuzuki, Mônica Yumi. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
III. Título.

CDU 639.3

**Cultivo do copépode (*Acartia tonsa*), em sistema intensivo,
alimentado com espirulina comercial liofilizada (*Arthrospira* sp.)**

Por

WESLEY FREITAS DA ANNUNCIÇÃO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Mônica Yumi Tsuzuki – *Orientadora*

Dr. José Guilherme Bersano Filho

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente aos meus pais, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me ensinaram a ser uma pessoa correta. A minha família Watson, Creuza, Nicolas e Ayla, que mesmo distantes, se fazem sempre presentes no meu dia a dia.

A professora Mônica pela orientação, pelo apoio, pela amizade e pela paciência durante todo esse período do mestrado.

Ao pessoal LAPMAR: Sayão , Vaico, Salete, Gabriel, Chris,Thiago Hendrich, as meninas do laboratório, Nanda, Ane, Dai, Karine, Maíra, Francine, Moranguinho, Rachel; a todos estagiários e colegas de mestrado. Foi muito bom ter trabalhado com vocês, obrigado pela ajuda e pela amizade.

Ao Carlos Herique e ao pessoal do LMM, pela ajuda e pela boa vontade que sempre tiveram. A professora Anita, ao Eduardo Sanches, e ao pessoal do Instituto de Pesca de Ubatuba, pela amizade e pelos ensinamentos. Ao Luciano e Jonas da empresa Neotropical, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Ao Carlito pela sua imensa paciência com os alunos.

Ao Cnpq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e a CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos bons amigos que fiz em Floripa, Beto, Gringo, Emílio, Gabriel, Natão, Camilinha (tipinho), Katina, Cássio, Wanessa, Geovana, Seu Bradão, Dona Rosa. Com essa galera, histórias engraçadas é que não faltam.

RESUMO

Os copépodes são o principal alimento de diversas espécies de peixes marinhos no ambiente natural e são nutricionalmente superiores aos alimentos vivos tradicionalmente utilizados na larvicultura de peixes, como o rotífero e a artêmia. A utilização de copépodes na piscicultura marinha é uma alternativa viável, porém seu uso ainda é restrito. *Acartia tonsa* é um copépode que vem obtendo um crescente interesse para a aquicultura, pois possui estágios naupliares de reduzido tamanho, nada ativamente na coluna d'água, possui elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, quando comparado com rotíferos e artêmia, e representa uma fonte de enzimas digestivas exógenas para as larvas de peixes marinhos. Geralmente este copépode é cultivado com dietas multi-algais, entretanto, dietas alternativas constituem uma interessante opção para reduzir os altos custos de produção de microalgas. Neste estudo, avaliou-se o uso da espirulina comercial liofilizada (*Arthrospira sp.*), como alimento inerte, no cultivo intensivo do copépode *Acartia tonsa*. Os tratamentos foram 10, 20 e 30 mg de espirulina . L⁻¹ respectivamente para os tratamentos T10, T20 e T30, em quadruplicata. A temperatura foi mantida em 25°C±1; fotoperíodo 14L: 10E e salinidade 30‰. Foram avaliadas as taxas de sobrevivência final, desenvolvimento, produção de ovos . fêmea . dia⁻¹ e taxa de eclosão. As taxas de sobrevivência final e desenvolvimento foram avaliadas ao longo de 7 dias, enquanto as taxas de produção de ovos . fêmea . dia⁻¹ e taxa de eclosão foram avaliadas ao longo de dois dias. A maior sobrevivência ocorreu no T30 (68%), seguido por T20 (47%) e T10 (32%). A taxa de desenvolvimento não foi afetada pelas diferentes concentrações de espirulina. A média de ovos produzidos por fêmea . dia⁻¹ foi de 22,3 para T10 e 24,6 para T20 e a taxa média de eclosão foi de 56% (T10) e 61% (T20), o T30 foi descartado neste teste, devido a elevada mortalidade dos reprodutores. Foi realizado também o acompanhamento e monitoramento do cultivo de *A. tonsa*, em tanques cilindro-cônicos de 60 L, durante o período de 20 dias. A densidade média da população foi de 251 de náupios . L⁻¹; 66 copepoditos . L⁻¹ e 75 adultos . L⁻¹. As maiores densidades obtidas foram de 2.160 nauplios; 733 copepoditos e 355 adultos . L⁻¹. A espirulina liofilizada permitiu o crescimento e a reprodução da *A. tonsa*, sendo um alimento com potencial para o uso no cultivo intensivo.

ABSTRACT

Copepods are the main food source for many species of marine fish in the natural environment and are nutritionally superior to traditional live foods used in fish larviculture, such as rotifers and brine shrimp. The utilization of copepods in marine fish farming is a viable alternative, but its use is still limited. The copepod *Acartia tonsa* is gaining a growing interest for aquaculture because it presents nauplii stages of small size, swims actively in the water column, has high content of polyunsaturated fatty acids, compared with rotifers and artemia, and is a source of exogenous digestive enzymes. Generally, this copepod is cultured with multi-algal diets, however, alternative diets are an interesting option to reduce the high cost of production of microalgae. In this study, we evaluated the use of commercial freeze-dried spirulina, as inert food, in intensive production of *A. tonsa*. The treatments were 10, 20 and 30 mg of spirulina. L⁻¹ respectively for treatments T10, T20 and T30, performed in quadruplicate. The experimental units were kept in a water bath, temperature 25 ± 1°C, photoperiod 14L: 10D and 30 ‰ salinity. Rates of final survival, development, egg production. female .day⁻¹ and hatching were evaluated. The highest survival occurred in T30 (68%), followed by T20 (47%) and T10 (32%). The rate of copepod development was not affected by different concentrations of spirulina. The average number of eggs produced per female.day⁻¹ was 22.3 and 24.6 for T10 and T20 respectively and the average rate of hatching was 56% (T10) and 61% (T20), T30 was discarded in this test due to the high mortality of breeders. The cultivation of *A. tonsa*, in cylindrical tanks (60L), during the period of 20 days. The average population density in this study was 251 nauplius . L⁻¹; 66 copepodites . L⁻¹ and 75 adults . L⁻¹. The highest densities obtained were 2.160 nauplii, 733 copepodids and 355 adults. L⁻¹. The freeze-dried spirulina allowed the growth and reproduction of *A. tonsa*, being considered a food with potential for use in intensive cultivation of this copepod.

LISTA DE FIGURAS

NOTA CIENTÍFICA:

Figura 1. Variação da densidade de copépodes *A. tonsa* (náuplios, copepoditos e adultos) durante 17 dias nos tanques 1,2 e 3 respectivamente. 30

ARTIGO CIENTÍFICO: Produção do copépode *Acartia tonsa* Dana (1849), com diferentes concentrações de espirulina comercial liofilizada

Figura 1. Sobrevivência média final de copépodes, em porcentagem, de cada tratamento. T10 (10 mg . espirulina . L⁻¹); T20 (20 mg . espirulina . L⁻¹); T30 (30 mg . espirulina L⁻¹). Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05). Barras indicam desvio padrão. 50

Figura 2. Porcentagem das diferentes fases de desenvolvimento durante o cultivo de *A. tonsa* nos três tratamentos, T10 (10 mg . espirulina . L⁻¹); T20 (20 mg . espirulina . L⁻¹); T30 (30 mg . espirulina L⁻¹ 53

Figura 3. Produção de ovos fêmea⁻¹ . dia⁻¹(Média e desvio padrão) nos tratamentos T10 (10 mg . espirulina . L⁻¹) e T20 (20 mg . espirulina . L⁻¹). 54

ANEXO

Figura 1. Espirulina liofilizada..... 71

Figura 2. Partículas de espirulina após processamento no liquidificador 71

Figura 3. Diferentes estágios de desenvolvimento de *A. tonsa*. Letras a, b: náuplios; c, d: copepoditos; e, f: Fêmea adulta..... 72

LISTA DE TABELAS

NOTA CIENTÍFICA

Tabela 1. Conteúdo Nutricional da espirulina comercial liofilizada ... 27

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da espirulina comercial liofilizada.
N.I. = Ácidos Graxos Não Identificados 27

Tabela 3. Total de Ácidos Gráxos da espirulina liofilizada comercial.. 28

Tabela 4. Número máximo, mínimo e média de indivíduos . L⁻¹
observados durante o período experimental 31

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
OBJETIVOS	22
NOTA CIENTÍFICA - Cultivo do copéode <i>Acartia tonsa</i> alimentado com espirulina liofilizada (<i>Arthrospira sp.</i>)	23
1.Resumo.....	23
2.Introdução	23
3.Material e Métodos.....	25
4.Resultados e Discussão	26
5.Referências.....	35
ARTIGO CIENTÍFICO - PRODUÇÃO DO COPÉODE <i>Acartia</i> <i>tonsa</i> , COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ESPIRULINA COMERCIAL LIOFILIZADA (<i>Arthrospira sp.</i>)	43
1.Resumo.....	43
2.Introdução	44
3.Material e Métodos.....	45
4.Resultados e Discussão	49
5.Conclusões	57
5.Referências.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL..	64
ANEXO.....	71

INTRODUÇÃO GERAL

Dentro das etapas do cultivo de peixes marinhos, a larvicultura é uma das mais delicadas e que apresenta as maiores taxas de mortalidade (BELL et al., 2003). A qualidade da água e nutrição das larvas são fatores determinantes na sobrevivência dos animais, portanto, compreender os mecanismos fisiológicos e os fatores abióticos que influenciam o desenvolvimento das larvas é fundamental para aumentar as taxas de sobrevivência e de crescimento (HART et al., 1996). Um dos principais problemas dessa etapa é a transição da alimentação endógena para exógena (FYHN, 1989).

Os principais organismos utilizados nas fases iniciais de alimentação das larvas são os rotíferos (*Brachionus plicatilis* e *Brachionus rotundiformis*) e os náuplios de artêmia (*Artemia sp.*) (OLIVOTTO et al., 2008). Apesar da possibilidade de cultivo destes organismos em altas densidades, já se sabe que os mesmos são naturalmente deficientes em ácido graxos poliinsaturados, como o ácido eicosapentaenóico (EPA), 20:5 (n-3), para suprir as necessidades nutricionais das larvas de peixes marinhos (LEGER et al., 1986; NAVARRO et al., 1997).

Peixes marinhos possuem naturalmente altas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, como o EPA e o docosahexaenóico (DHA), 22:6 (n-3), em seus tecidos corporais e com isso, a demanda por esses nutrientes na dieta é alta. Esses ácidos graxos são extremamente importantes para a sobrevivência e crescimento larval e vários estudos já demonstraram como eles são essenciais na dieta das larvas (Sargent et al., 1989, 1997, 1999). O DHA atua na manutenção da conformação da membrana biológica; já o EPA e o araquidônico (ARA) 20:4 (n-6), são precursores dos eicosanóides, hormônios de alta atividade biológica, como as prostaglandinas (PLANTE et al., 2006). Nas espécies de peixes marinhos, a ingestão desses ácidos graxos na dieta é ainda mais importante, pois a habilidade de conversão de EPA para DHA é muito limitada, diferentemente dos peixes de água doce (TAKEUCHI et al., 1989; WATANABE, 1991). Deficiências em ácidos graxos podem causar baixa eficiência alimentar, pobre crescimento, anemia e altas taxas de mortalidade (SARGENT et al., 1999; BELL et al., 2003; OLIVOTTO et al., 2003, 2005, 2006; FAULK; HOLT, 2005). Para aumentar os índices de sobrevivência, crescimento e maximizar o desenvolvimento das larvas, o uso de alimentos vivos deve atender essas necessidades nutricionais, e uma alternativa é o uso de copépodes na alimentação (NÆSS; LIE, 1998; SHIELDS et al., 1999).

Os copépodes são crustáceos com cerca de 200 famílias e mais de 11.500 espécies já foram classificadas (HUMES, 1994). São o principal alimento para diversas espécies de peixes marinhos no ambiente natural e são nutricionalmente superiores aos alimentos vivos tradicionalmente utilizados na larvicultura de peixes, como rotífero e artêmia (STØTTRUP; NOSKER, 1997).

Várias espécies de copépodes foram testadas na larvicultura de peixes marinhos, como *Acartia spp.* (Schipp et al., 1999) *Eurytemora spp.* (SHIELDS et al., 1999), *Parvocalanus spp.* (OLIVOTTO et al., 2006), *Gladioferens spp.* (PAYNE et al., 2001); *Temora spp.* (RØNNESTAD et al., 1998) *Euterpina acutifrons* e *Tisbe spp.* (KAHAN et al., 1982; STØTTRUP; NORSEKER, 1997; OLIVOTTO et al., 2008). Bons resultados têm sido obtidos com o uso de copépodes da ordem calanoida, que possuem um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, geralmente possuem estágios naupliários de reduzido tamanho e estão mais suscetíveis à predação das larvas por se movimentarem pela coluna d'água (PAYNE; RIPPINGALE, 2001; OLIVOTTO et al., 2008; 2009).

Os copépodes marinhos possuem altos níveis de DHA e outros ácidos graxos poliinsaturados. O nível de DHA em copépodes selvagens pode ser dez vezes maior do que o nível encontrado na artêmia enriquecida (McEVOY et al., 1998). Além do elevado valor nutricional, os copépodes também são uma importante fonte de enzimas digestivas exógenas, sendo importantes para digestão das larvas (MUNILLA-MORAN et al., 1990). Segundo Holt (2003), copepoditos e náuplios de copépodes são predados preferencialmente pelas larvas de peixes, comparados com rotíferos e náuplios de artêmia.

Os copépodes da ordem calanoida são predominantemente pelágicos, ocorrendo em diversas profundidades. No ambiente marinho, são dominantes dentro do grupo do zooplâncton herbívoro e fazem parte da cadeia alimentar de praticamente todas as larvas de peixes marinhos (PAULY; CHRISTENSEN, 1995). São filtradores ou predadores seletivos, não visuais, se alimentando ativamente, capturando e ingerindo uma variedade de algas e presas animais (TISELIUS; JONSSON, 1990). Sua abertura oral é composta por um *labrum*, anterior e posterior, o qual possui glândulas, que permitem agregar as partículas de alimento e iniciar a digestão (DUSSART; DEFAYE, 2001). A maioria dos copépodes se reproduz sexualmente, sendo que o macho deposita o espermatóforo próximo a abertura genital da fêmea (STØTTRUP, 2003). Diversas espécies possuem ovos com estágio de

dormência em situações adversas, podendo suportar condições anormais de dessecação, frio e calor (DUSSART; DEFAYE, 2001)

Copépodes da espécie *Acartia tonsa* são calanoida cosmopolitas, habitando o oceano Atlântico, Pacífico, Índico e o Mar Negro, Mediterrâneo, Báltico, Cáspio e de Azov (MAUCHLINE, 1998). *A. tonsa* é frequentemente uma espécie dominante do plâncton costeiro e estuarino (CERVETTO et al., 1995; LEANDRO et al., 2006; SØRENSEN et al., 2007; TISELIUS et al., 2008). São animais eurialinos e euritérmicos, tolerando temperaturas entre 0 a 30°C e salinidades de 1 a 38‰ (MAUCHLINE, 1998). Os náuplios passam por seis estágios até se tornarem copepoditos, os quais passam por cinco estágios, até se tornarem adultos sexualmente maduros. Náuplios de *A. tonsa* possuem menos de 100 µm de comprimento, logo após a eclosão, e os adultos podem chegar a cerca de 1,5 mm (KLEIN BRETELER et al., 1982).

Os ovos de *A. tonsa* são esféricos, cobertos com pequenos espinhos, são levemente mais pesados que a água do mar e possuem entre 70-80 µm. (BELMONTE, 1998). As fêmeas de *A. tonsa* não carregam ovos em sacos ovígeros, elas liberam os ovos diretamente na água, o que facilita a separação e estocagem dos ovos no cultivo. Segundo Parrish e Wilson (1978) as fêmeas produzem acima de 718 ovos durante sua vida. A taxa de desenvolvimento depende primariamente da temperatura, da quantidade e qualidade do alimento (WILLIAMS; JONES, 1994; MAUCHLINE, 1998). Segundo Mauchline (1998), o tempo de geração do gênero *Acartia* pode levar em média de uma semana a meses, dependendo da temperatura do cultivo.

Acartia se alimenta primariamente de fitoplâncton, mas pode mudar sua forma de alimentação e passar a consumir ciliados, rotíferos e a preda seus próprios ovos e náuplios (MAUCHLINE, 1998). O tamanho das partículas ou presas consumidas se situam entre 5 e 100 µm (PEPTIPA, 1959). Quando a concentração de fitoplâncton é elevada, o consumo de material particulado é a principal forma de alimento (KIØRBOE et al., 1996), porém existe uma forte preferência por presas dotadas de motilidade, como flagelados e ciliados, em relação a presas como diatomáceas (SOMER, 2009). O menor limite de partículas capturadas está entre 2 – 4 µm (BERGGREEN et al., 1988). Segundo Apeitos et al. (2004), *Acartia* sobrevive com dietas microalgais de *Chaetoceros*, *Isochrysis* e *Tetraselmis*. Porém as baixas densidades obtidas e a necessidade de dietas multi-algais dificultam o cultivo de copépodes calanoida (HOLT, 2003; DRILLET et al., 2011). O uso de

microalgas em pasta ou liofilizada é uma alternativa a ser testada e pode contribuir para redução de mão-de-obra.

A utilização de copépodes na piscicultura marinha é uma alternativa viável, porém seu emprego ainda é restrito (PAYNE et al., 2001; BELL et al. 2003). A principal forma de uso dos copépodes na aquicultura têm sido através de coletas no meio ambiente (TOLEDO et al., 1999; LEMUS et al., 2002) ou em viveiros (LIAO et al., 2001). Porém esses métodos de coleta são altamente dependentes das condições ambientais e de ciclos meteorológicos, além de apresentarem o risco da introdução de vetores de doenças e parasitas no cultivo (KNUCKEY et al., 2005). O cultivo de copépodes em laboratório elimina algumas dessas desvantagens, permitindo uma produção constante, o conhecimento e a manipulação do perfil nutricional do alimento, a eliminação de espécies indesejáveis presentes no zooplâncton selvagem e o maior controle sobre a disseminação de doenças (STØTTRUP, 2000; KNUCKEY et al., 2005).

Geralmente os copépodes são mantidos em cultivo com dietas multi-algais, exigindo microalgas de alta qualidade (STØTTRUP et al., 1986; SCHIPP et. al, 1999; COWLES et al., 1988). Assim, a produção de fitoplâncton de alta qualidade e em grandes volumes constitui uma das maiores dificuldades do seu cultivo (SCHIPP et al. ,1999). Alguns autores já cultivaram *A. tonsa* com alimento inerte (TURK et al., 1982; OGLE et al., 2002). Dietas alternativas constituem uma interessante opção para reduzir os altos custos de produção de microalgas, principalmente em termos de mão-de-obra, infra-estrutura ou requerimento de espaço.

A espirulina é uma microalga simbiótica multicelular e filamentosa, que nos últimos anos vem ganhando popularidade na indústria alimentícia e farmacêutica. O gênero *Arthrospira* é comercialmente disponível como espirulina. A ficocianina é o principal pigmento fotossintético, o qual confere a cor azulada a célula. As suas bactérias simbióticas também possuem traços de clorofila e carotenóides (FAO, 2008). A espirulina apresenta uma série de vantagens como alimento, uma vez que contém alto valor protéico, de 55 a 70 % do peso seco (PHANG et al., 2000) e conteúdo de lipídeos de 5-7% do peso seco (BUJARD et al., 1970; CHALLEM et al., 1981). Além disso, a espirulina em sua forma liofilizada é facilmente encontrada no comércio.

Uma vez que poucos trabalhos foram realizados testando dietas alternativas com alimentos inertes no cultivo de *A. tonsa*, o objetivo

deste estudo é avaliar o uso da espirulina liofilizada como alimento na produção intensiva do copépode *A. tonsa*.

Os resultados deste estudo serão apresentados na forma de uma nota e um artigo científico, seguindo as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB), a qual serão submetidos.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Desenvolver tecnologia para o cultivo de copépodes em sistema intensivo, com o intuito de se obter fontes alternativas de alimento para a larvicultura de peixes marinhos.

Objetivos específicos:

- Avaliar o cultivo em sistema intensivo do copépode *A. tonsa* alimentado com espirulina liofilizada ,.

- Avaliar a taxa de desenvolvimento, produção de ovos .fêmea . dia⁻¹, taxa de eclosão e sobrevivência do copépode *A. tonsa* utilizando diferentes concentrações de espirulina liofilizada na alimentação.

NOTA CIENTÍFICA

Cultivo do copépode *Acartia tonsa* alimentado com espirulina liofilizada (*Arthrospira sp.*)

Wesley Freitas da Anunciação⁽¹⁾; Sueli Regina Baggio⁽²⁾; Mônica Yumi Tsuzuki⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratório de Piscicultura Marinha II - Universidade Federal de Santa Catarina. Servidão dos Coroaas, s/n. CEP 88061-600. Barra da Lagoa, Florianópolis-SC. wfann@zootecnista.com.br; mtsuzuki@cca.ufsc.br.

⁽²⁾ Instituto de Tecnologia de alimentos. Av. Brasil, 2880. CEP 13070-178. Campinas, SP. sueli@ital.sp.gov.br

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da espirulina comercial liofilizada no cultivo do copépode *Acartia tonsa*. Foi realizado o acompanhamento e o monitoramento do cultivo em tanques cilindro-cônico de 60 L, durante o período de 20 dias. A densidade média da população foi de 251 de náupios . L⁻¹, 66 copepoditos . L⁻¹ e 75 adultos. L⁻¹. As maiores densidades obtidas foram de 2.160 náuplios, 733 copepoditos e 355 adultos. L⁻¹. A espirulina liofilizada permitiu o crescimento e a reprodução da *A tonsa*, sendo um alimento com potencial para o uso no cultivo intensivo.

Cultivation of copepod *Acartia tonsa* fed freeze-dried spirulina (*Arthrospira sp.*)

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the use of commercial freeze-dried spirulina in the cultivation of copepod *Acartia tonsa*. Was accomplished the accompaniment and monitoring of cultivation in cylinder-conical tanks of 60 L during the period of 20 days. The average population density was 251, nauplii . L⁻¹, 66 copepodits. L⁻¹ and 75 adults. L⁻¹. The highest densities were obtained from 2,160 nauplii, 733 copepodits and 355 adults. L⁻¹. The freeze-dried spirulina allowed the growth and reproduction of *A. tonsa*, being a food with potential for use in intensive cultivation.

INTRODUÇÃO

Os copépedes são crustáceos que abrangem cerca de 200 famílias com mais de 11.500 espécies já classificadas (Humes, 1994). São o principal alimento para diversas espécies de peixes marinhos no ambiente natural e são nutricionalmente superiores aos alimentos vivos tradicionalmente utilizados na larvicultura de peixes, como rotífero e

artêmia (Støttrup; Nosker, 1997). A utilização de copépodes na piscicultura marinha é uma alternativa viável (Payne et al., 2001; Bell et al. 2003), porém seu uso ainda é restrito. O uso de copépodes na larvicultura tem envolvido copépodes da ordem calanoida como *Acartia* spp. (Schipp et al., 1999) *Eurytemora* spp. (Shields et al., 1999), *Parvocalanus* spp. (Olivotto et al., 2006), *Gladioferens* spp. (Payne et al. 2001); *Temora* spp. (Rønnestad et al., 1998) e haparticoida como *Euterpina acutifrons* e *Tisbe* spp. (Kahan et al., 1982; Støttrup; Norsker, 1997; Olivotto et al., 2008).

A principal forma de uso dos copépodes na aquicultura tem sido através de coletas no meio ambiente (Toledo et al., 1999; Lemus et al., 2002) ou em viveiros (Liao et al., 2001). Porém, esses métodos apresentam o risco da introdução de vetores de doenças e parasitas no cultivo (Knuckey et al., 2005). O cultivo de copépodes em laboratório elimina algumas desvantagens da coleta no ambiente natural, permitindo uma produção constante, conhecimento e manipulação do perfil nutricional do alimento; eliminação de espécies indesejáveis presentes no zooplâncton selvagem e maior controle sobre a disseminação de doenças (Støttrup, 2000; Knuckey et al., 2005).

Uma das dificuldades atuais para o cultivo de copépodes em laboratório é a produção de microalgas de alta qualidade (Schipp et al., 1999). Geralmente os copépodes são cultivados com dietas multi-algais com alto valor nutricional (Strøttup et al., 1986; Cowles et al., 1988; Schipp et al., 1999; Knuckey et al., 2005). Porém, alguns autores já cultivaram com sucesso *A. tonsa* com alimentos inertes, como farelo de arroz e pasta de microalga (Turk, et al., 1982; Ogle et al., 2002). Dietas alternativas constituem uma interessante opção para reduzir os altos custos de produção de microalgas, principalmente em termos de mão-de-obra, infra-estrutura ou requerimento de espaço.

A espirulina é um alimento que representa uma importante fonte protéica, com mais de 65% de proteína, possui ainda cerca de 20% de carboidratos e 6% de lipídeos (Henrikson, 2009). Além disso, a espirulina não possui celulose nas suas paredes celulares e sim um mucopolissacarídeo, o que aumenta sua digestibilidade como alimento (Henrikson, 2009).

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a manutenção do copépode *Acartia tonsa* alimentado com espirulina liofilizada em sistema intensivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Período de Estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Piscicultura Marinha II (LAPMAR II) na Estação de Maricultura da Universidade Federal de Santa Catarina, situada na Barra da Lagoa, Florianópolis, SC.

Origem, obtenção dos copépodes selvagens

Os copepódes foram coletados na Lagoa da Conceição, Florianópolis-SC, com o uso de rede de zooplâncton, malha de 300 μm . Após a coleta, os copépodes foram separados com o uso de peneiras de diferentes aberturas de malha (500, 300 e 150 μm). Os adultos de *A. tonsa* foram identificados no microscópio estereoscópico, separados com o auxílio de pipeta de Pasteur e classificados de acordo com a chave de Bradford-Grieve (1999). Após a separação, foram transferidos para tanques cilíndrico-cônicos de 100L, dotados de leve aeração, e água com parâmetros físico-químicos semelhantes aos mensurados no momento e no local da coleta: salinidade 20‰, temperatura 24°C e pH 8.3.

Análise bioquímica e perfil de ácidos graxos da Espirulina

O alimento utilizado em substituição ao uso de microalgas vivas no cultivo do copépode *A. tonsa* é uma microalga do gênero *Arthrospira*, conhecida popularmente como espirulina, sendo utilizada na sua forma liofilizada. Sua forma comercial liofilizada possui 65,3% de proteína; 5,9 % de cinzas; 253,9 mg . 100g⁻¹ de carotenóides e densidade aparente de 0,5659 g . mL⁻¹, dados fornecidos pelo laudo da importadora do produto (DEG importação de produtos químicos LTDA).

Para obtenção da composição dos lipídeos da espirulina liofilizada foi realizada a análise do perfil ácidos graxos no Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas.

Para a determinação do tamanho médio das partículas de espirulina, algumas amostras foram analisadas em microscópio óptico, Leica modelo DM5000 (aumento de 40x), e mensuradas com o software, Leica Application Suite LAZ EZ[®].

Cultivo

Foi realizado o acompanhamento do cultivo em laboratório do copépode, a partir de indivíduos selvagens, alimentado com espirulina liofilizada durante o período de 20 dias. A salinidade foi gradualmente elevada de 20 para 30 ‰. O cultivo foi feito em três tanques cilíndrico-cônicos, dotados de leve aeração e aquecidos com o uso de termostatos-aquecedores.

A densidade de estocagem inicial foi diferente entre os três tanques, sendo 325 náuplios e 320 adultos. L^{-1} para o tanque 1; 250 náuplios e 38 adultos L^{-1} para o tanque 2; e de 306 náuplios e 25 copepoditos L^{-1} para o tanque 3. Devido a essa diferença da densidade de estocagem, os três tanques foram analisados separadamente.

Os copépodes foram alimentados duas vezes ao dia (08 e 14 h) com espirulina liofilizada, pesada em balança de precisão, e diluída em volume conhecido, processada no liquidificador e filtrada em peneira de 60 μm , para retenção de pequenos aglomerados de células e retirada do excesso de espuma formada. A quantidade de espirulina fornecida diariamente variou entre 1, 2 e 8 mg L^{-1} e foi baseada na observação da densidade média de copépodes, nos níveis de amônia, na transparência e na formação do biofilme nas paredes dos tanques de cultivo

O volume inicial do cultivo foi de 30 L, elevado gradualmente até 60 L, durante um período de 5 dias. Após esse período, os copépodes eram filtrados, em peneira com malha de 45 μm , e o cultivo reiniciado, nas mesmas condições de temperatura e salinidade. Uma troca de água de 20% era realizada a cada dois dias com o uso de malha de 45 μm , para evitar a retirada de náuplios e ovos do cultivo. Durante o período do cultivo, monitorou-se diariamente a densidade de náuplios, copepoditos e indivíduos adultos. Os parâmetros de qualidade de água, temperatura e salinidade foram amostrados diariamente. O pH e a amônia eram monitorados semanalmente através de kits de teste da Alcon[®]. O fotoperíodo utilizado foi de 14h luz: 10h escuro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição bioquímica, o perfil e a quantidade de ácidos graxos do lote de espirulina utilizado no cultivo está descrita nas tabelas 1, 2 e 3., respectivamente. Durante o período de monitoramento, a temperatura manteve-se em $25 \pm 1^\circ C$, salinidade em 30‰, pH 8.4 e a amônia tóxica manteve-se na maior parte do período experimental abaixo de 0,042 mg L^{-1} .

Tabela 1. Conteúdo nutricional e densidade aparente da espirulina comercial liofilizada

Parâmetros	Resultado
Densidade Aparente	0,5659g/ml
Carotenóides	253,9mg/100g
Cinzas	5.90%
Proteína	65.30%
Arsênio	0,27ppm
Mercúrio	0,011ppm
Cádmio	0,08ppm

Fonte: Laudo da empresa DEG Importação de produtos químicos .

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da espirulina comercial liofilizada.
N.I. = Ácidos Graxos Não Identificados

Acido Graxo	% área	g/100g
N.I.	9.9	0.58
C 14:0	0.2	0.01
N.I.	1.2	0.07
C 16:0	44.8	2.65
N.I.	0.8	0.05
C 16:1 w 7	2.1	0.12
C 17:0	0.4	0.02
C 17:1	0.4	0.02
N.I.	0.1	0.01
C 18:0	1.5	0.09
C 18:1 w 9	3.6	0.21
N.I.	0.2	0.01
C 18:2 w 6	19.9	1.18
C 18:3 w 6	14.4	0.85
C 20:2 w 6	0.2	0.01
C 20:3 w 6	0.3	0.02
TOTAL	100.0	

Fonte: ITAL, Campinas.

Tabela 3. Total de Ácidos Graxos da espirulina liofilizada comercial

Ácidos graxos	Área	
Totalizados	%	g/100g
Saturado	46.9	2.74
Monoinsaturado	6.1	0.36
Poliinsaturado	34.8	2.03
NI	12.2	0.19
TOTAL	100.0	

Fonte: ITAL, Campinas.

Deve-se ressaltar que, o perfil de ácidos graxos na espirulina não segue um padrão, podendo variar de uma cepa para outra, principalmente na fração de ácidos poliinsaturados como mostra o estudo de Cohen et al.(1987). Desta forma, torna-se necessária sua determinação. Além disso, o ambiente de cultivo e a fase de crescimento também influenciam diretamente nessa composição de ácidos graxos (Cohen et al., 1987; Olguin et al., 2001). Mühling et al. (2005) ao avaliar 35 cepas de diferentes localidades do globo observaram que dependendo da cepa a composição de ácido linoléico corresponde de 13-31,5%, γ -linoleico 12-29.4% e o palmítico de 42.3-47.6% do total de ácidos graxos. Na presente análise o perfil de ácidos graxos encontra-se dentro da faixa observada por Mühling et al. (2005), sendo que o ácido linoléico correspondeu a 19.9%; o γ -Linoléico 14,4% e o palmítico 44.8%.

No presente estudo, o uso da espirulina permitiu a manutenção, o crescimento e a reprodução de *A. tonsa*. Porém, no decorrer do experimento, a densidade da população nos tanques de cultivo variou bastante, devido às variadas taxas de mortalidade no tanque, que podem ter ocorrido por influência da alimentação, da densidade e devido ao manejo para realizar a limpeza dos tanques. A baixa densidade observada na primeira semana do cultivo, nos três tanques, pode estar relacionada ao estresse provocado pelo manejo realizado no momento da captura e pela aclimação dos animais com brusca mudança da alimentação do ambiente natural para o alimento inerte. A diferença da variação e oscilação da população entre os três tanques pode ser resultado das diferentes taxas de estocagem inicial (Fig. 1).

A partir da segunda semana, observou-se maior crescimento na população dos copépodes. Porém, ao se alcançar densidades mais elevadas de indivíduos adultos, observou-se que a taxa de mortalidade aumentava consideravelmente (chegando a 90% de mortalidade), ocorrendo um declínio acentuado da população no tanque (Fig. 1). De acordo com Santos (2005), a sobrevivência de *A. tonsa* é afetada negativamente por altas densidades. Ao testar diferentes densidades de estocagem Santos (2005) observou que a taxa de sobrevivência caiu de 25%, no tratamento com 200 adultos L^{-1} , para 14%, no tratamento com 400 adultos L^{-1} , ao final do período experimental de 7 dias. Segundo esse autor, a densidade elevada age como um fator de estresse devido à competição por alimento e por espaço. As diferenças nos padrões temporais e de desenvolvimento apresentado entre os três tanques podem estar relacionados à grande diferença da densidade de estocagem inicial. Segundo Støttrup (2006) altas densidades de copépodes geralmente são obtidas por poucos dias, após esse período ocorre o declínio e a estabilização da população em densidades mais baixas.

As maiores densidades de náuplios foram observadas em baixas densidades de adultos no tanque (Fig. 1). Uma hipótese é de que com o declínio da densidade de adultos houve uma redução na taxa de canibalismo, permitindo assim o aumento da densidade de náuplios no tanque. Segundo Støttrup et al. (1986) e Ohno et al. (1990) o canibalismo de náuplios por adultos e copepoditos, nos estágios mais avançados, representam um problema quando são mantidas altas densidades de náuplios no cultivo de *Acartia*. O posterior declínio da densidade de náuplios foi acompanhado pela elevação da densidade de copepoditos e de adultos como consequência do crescimento e desenvolvimento dos copépodes.

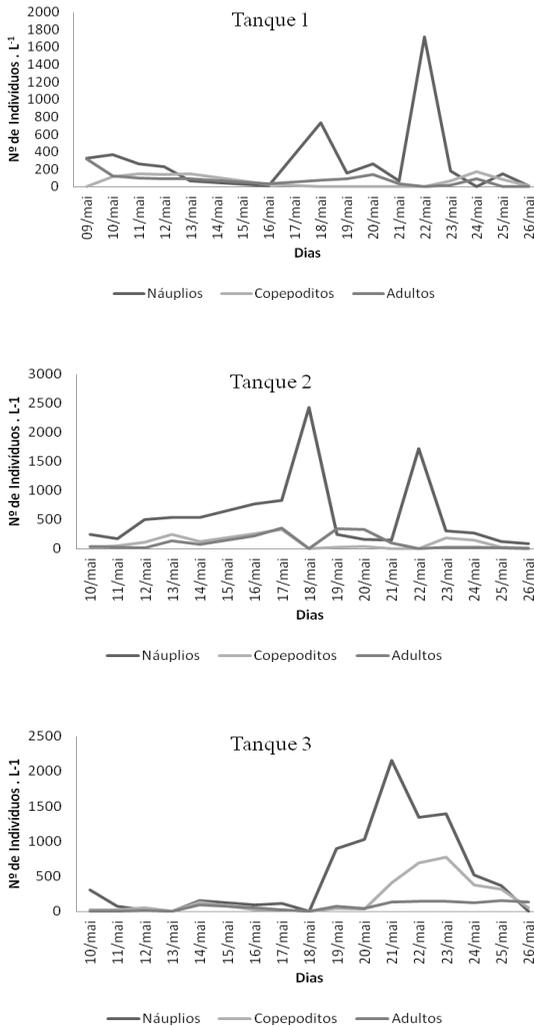


Figura 1 – Variação da densidade de copépodes *A. tonsa* (náuplios, copepoditos e adultos) durante 17 dias nos tanques 1,2 e 3 respectivamente.

Os índices de produtividade do presente trabalho estão dentro da média obtida em outros trabalhos de cultivo de *A. tonsa*. A densidade média da população no presente estudo foi de 251 de náuplios . L⁻¹; 66 copepoditos . L⁻¹ e 75 adultos . L⁻¹. As maiores densidades obtidas foram de 2.160 náuplios L⁻¹; 733 copepoditos e 355 adultos. L⁻¹ (Tabela 4). Ogle et al. (2002), utilizando seis diferentes dietas artificiais no cultivo de *A. tonsa*, obtiveram como melhor densidade média de estocagem de 15,5 adultos . L⁻¹ e 110 náuplios . L⁻¹. Segundo estes autores, o maior aumento da densidade foi observado no tratamento que consistia de fitoplâncton artificial, pasta da microalga *Tetraselmis sp.*, alcançando a densidade máxima de 240 adultos . L⁻¹, e a maior densidade de náuplios foi alcançada no tratamento com dieta a base do produto comercial Rotirich®, apresentando a densidade máxima de 171 náuplios . L⁻¹.

Um sistema de cultivo para *Acartia sp.* é descrito por Schipp et al. (1999), que obtiveram resultados consistentes, utilizando tanques de 1000L para o cultivo baseado em ciclos de 8 dias, utilizando uma mistura de três microalgas, *Rhodomonas sp.*, *Tetraselmis sp.* e *Isochrysis sp.* Os autores iniciaram os cultivos com uma densidade entre 50-100 adultos . L⁻¹ e 150-250 copepoditos . L⁻¹, obtendo após 7 dias cerca de 2000 náuplios, 750 copepoditos e 300 adultos.L⁻¹. Ohno e Okamura (1988) obtiveram a densidade máxima de 1136 náuplios; 588 copepoditos e 288 adultos . L⁻¹ no cultivo de *Acartia tsuensis* em tanques externos. Støttrup et al (1986) ao cultivar *A. tonsa* em tanques de 200–450 L alimentados com a microalga *Rhodomonas báltica* obtiveram a densidade média de estocagem de adultos entre 50-100 . L⁻¹. Turk et al.(1982) obtiveram altas densidades (densidade máxima de 1529 copepoditos . L⁻¹) ao cultivar *A. tonsa*, em tanques de 170L, sem o uso de microalgas, apenas usando farelo de arroz, por um período experimental de 4 meses, entretanto, as densidades eram instáveis.

Tabela 4. Número máximo, mínimo e média de indivíduos . L⁻¹ observados durante o período experimental.

	Máximo	Média	Mínimo
Náuplios	2160	251	7
Copepoditos	773	66	5
Adultos	355	75	3

Apesar dos resultados de densidade do presente experimento estar dentro da média obtida por outros autores, o perfil de ácidos graxos altamente insaturados de *A. tonsa* cultivada com espirulina é provavelmente baixo em comparação ao cultivo utilizando microalgas ricas em EPA e DHA, pois segundo Velosa et al. (2006) a composição de lipídeos dos copépodes depende diretamente da composição do alimento ingerido e a espirulina é um alimento deficiente nesses ácidos graxos altamente insaturados.

Houde e Roman (1987) encontram para composição química da *A. tonsa* 27.7% proteína; 19.5% lipídeos e 25.4% carboidratos. Segundo Ederington et al. (1995), *Acartia* coletada no meio ambiente, Mobile Bay - Golfo do México, possui predominância do ácido graxo 16:0 (palmítico), com concentrações significantes de 18:1(n-9) e de ácidos graxos saturados, incluindo 14:0; 16:0, 18:0, que são típicos de calanoida (Harvey et al, 1987; Sargeant; Falk-Petersen, 1988). Barroso (2010), ao analisar o perfil de ácidos graxos do copépode *A. tonsa* cultivados com *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana*, obteve como principais ácidos graxos da composição do copépode, 14:0 (9,36%); 16:0 (30,6%); 18:0(8,62%); 20:5(n-3) (0,85%); 22:6(n-3) (1,45%) e 18:2(n-6) (4,06%). Já os copépodes selvagens analisados pelo mesmo autor apresentam na sua composição de ácidos graxos, 14:0 (5,73%); 16:0 (20,72%); 18:0 (6,22%); 20:5(n-3) (9,58%); 22:6 (n-3) (17,03%) e 18:2 (n-6) (4,36%), o que demonstra que a dieta influencia consideravelmente na composição de ácidos graxos do copépode. A composição de ácidos graxos de *A. tonsa* cultivada com diferentes dietas por Vellozo et al. (2005), apresentou também uma variação considerável dos ácidos graxos de acordo com a dieta ofertada. O conteúdo de DHA dos copépodes variou de $8,3 \pm 5,3$ a $36,0 \pm 5,3$ $\mu\text{g mg}^{-1}\text{C}$ e o de EPA de $6,5 \pm 4,1$ a $21,9 \pm 4,0$ $\mu\text{g mg}^{-1}\text{C}$. Os mesmos autores também observaram uma correlação positiva entre o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados da dieta e a composição final do copépode. Dentro desse grupo de ácidos graxos principais, a espirulina possui: 16:0 (44,8%); 18:0 (1,5%); 18:2 (n-6) (19,9%) e 14:0 (0,2%).

Para alguns copépodes, o EPA e o DHA são considerados ácidos graxos particularmente importantes e estão correlacionados com o crescimento e desenvolvimento dos copépodes (Jónasdóttir, 1994; Jónasdóttir; Kjørboe, 1996; Støttrup et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que copépodes alimentados continuamente com *Dunaliella tertiolecta*, uma microalga rica do ácido graxo α -linolenico, porém com baixa concentração de EPA e DHA, apresentaram esterilidade das fêmeas, deterioração dos oócitos (Lacoste et al., 2001),

baixo crescimento e desenvolvimento (Koski et al., 1998; Tang et al., 2001). Porém Støttrup e Jensen (1990) ao avaliarem a produção de ovos por *A. tonsa* alimentada com *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, observaram que a produção foi mais alta com *I. galbana*, mesmo a *T. weissflogii* sendo mais rica em EPA e DHA. Vellozo et al. (2006), verificaram o conteúdo de ácidos graxos do copépode *A. tonsa* alimentado com dietas pobres em EPA, e sugerem que o EPA pode ser catabolizado por este copépode.

Enright et al. (1986), sugere que os ácidos graxos insaturados EPA e DHA seriam ácidos graxos essenciais para o crescimento e desenvolvimento de animais marinhos. De acordo com Houde e Roman (1987) a taxa de eclosão é influenciada positivamente pela ingestão de ácidos poliinsaturados 18:3(n-3), 20:5(n-3) e 22:6(n-3). Segundo Jónasdóttir e Kiørboe (1996) e Tang et al. (2001), a composição de ácidos graxos é importante para o sucesso de eclosão em *Acartia tonsa*. Porém, os resultados do presente trabalho são contraditórios a observação desses autores, pois a espirulina mesmo sendo pobre em EPA e DHA, permitiu o crescimento e a reprodução dos copépodas. Desta forma, o EPA e DHA podem não ser os únicos fatores essenciais relacionados com a reprodução e crescimento dos copépodas.

Segundo Ederington et al. (1998), através da observação contínua da produção de ovos em *A. tonsa*, sugerem que esta espécie não é tão rigorosa em exigência nutricional de ácidos graxos altamente insaturados. A habilidade de conversão do EPA e DHA foi demonstrada pelo copépode calanoida *Paracalanus parvus* (Moreno et al. 1979) e em alguns copépodas haparticoida (Norsker; Støttrup, 1994; Nanton; Castell, 1998). Desvillettes et al. (1997) sugere também que a espécie de cyclopoida *Eucyclops serrulatus* pode realizar essa conversão. Brett e Muller-Navarra (1997) refutam a possibilidade dessa conversão argumentando que essa bioconversão é lenta demais para poder suportar o crescimento e desenvolvimento.

Carotenóides são pigmentos que agem provavelmente como um eficiente repressor de radicais livres e podem estar envolvidos no rápido metabolismo e armazenagem de lipídeos, principalmente em náuplios (Lotocka et al., 2004). Segundo esses autores, os copépodas assim como todos os outros animais, não conseguem sintetizar os carotenóides, são capazes apenas de transformações metabólicas dos carotenóides ingeridos na alimentação, como da luteína e da zeaxantina em astaxantina, seu principal ceto-carotenóide (Andersson et al., 2003). Alguns pesquisadores acreditam que a astaxantina seja o principal pigmento ativo do metabolismo dos copépodas, atuando como

antioxidante, na fotoadaptação e como quimiorreceptor (Bliss; Mantel, 1985; Miki, 1991; Speekmann et al., 2000). Diversos autores observaram a dominância da astaxantina e dos produtos da sua esterificação, sugerindo sua importância na oxidação e no metabolismo de lipídeos em copépodes. (Mayzaud et al., 1998; Phleger et al., 1998; Falk-Petersen et al., 1999; Sargent, 2000). Lotocka et al.(2004) obteve a concentração média de carotenóides para *Acartia spp.* nos estágios naupliários de $619 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco; $764 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. peso seco em copepoditos I a III e $872 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco em copepoditos IV–V e adultos. A espirulina possui $2.539 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de carotenóides (Henrikson, 2009), o que seria suficiente para atender as necessidades da *A. tonsa*.

O elevado teor de proteína na espirulina (65,3%) é bastante relevante, pois a proteína tem um importante papel na regulação da taxa de ingestão do alimento pelos copépodes. Houde e Roman (1987) sugerem que *A. tonsa* pode regular a taxa máxima de ingestão de proteína celular, nitrogênio, e carbono, sendo que ela pode detectar diferenças nos níveis de proteína e nitrogênios celulares antes da ingestão e também podem responder a diferenças na composição da alga após a ingestão, se saciando mais rapidamente em algas ricas em proteínas. Segundo Roman (1983), a proteína e o nitrogênio algal podem ser um dos mais importantes critérios na regulação da taxa de ingestão dos copépodes. *A. tonsa* absorve a proteína do alimento mais rapidamente que os outros nutrientes (Roman, 1991) e tanto a ingestão de alimento quanto a taxa de produção de ovos podem ser influenciadas pelas concentrações de nitrogênio (Kjørboe, 1989).

O consumo de partículas de algas é influenciado pelo tamanho, quantidade e qualidade do alimento (Paffenhöfer 1976; Kjørboe et al. 1985; Støttrup; Jensen, 1990; Kjørboe et al., 1996), sendo que o tamanho é importante em relação aos apêndices da cavidade oral (Støttrup; Jensen, 1990). Payne e Rippingdale (2000) sugerem que o pequeno tamanho das partículas sejam uma das causas prováveis para a baixa sobrevivência, desenvolvimento e fecundidade de *Gladioferens imparipes* alimentados *Nannochloropsis oculata*. No presente estudo, as partículas de espirulina, após o processamento no liquidificador, se encontravam na faixa de 2-90 μm (Fig. 2 - ANEXO), sendo a maior parte das partículas encontradas em torno de 9-17 μm . Essa variação no tamanho das partículas pode ter possibilitado a ingestão da espirulina nos diferentes estágios de desenvolvimento da *A. tonsa*. Segundo Berggreen et al. (1988), o tamanho mínimo estimado de partículas capturadas por *A. tonsa* é de 2-4 μm para todos os estágios de desenvolvimento e o tamanho ótimo de partículas aumenta de acordo

com o desenvolvimento do animal, sendo de 7-14 μm para náuplios NII e NIII e de 14-70 μm para adultos, sendo que o tamanho máximo de captura por estes é de 250 μm . Entretanto segundo alguns autores a eficiência de captura de partículas pela *Acartia* é maior em partículas acima de 8 μm de diâmetro em comparação a partículas menores. (Nival; Nival, 1976; Donaghay; Small, 1979; Bartram, 1980). De acordo com Berggren et al. (1988) o tamanho ótimo da partícula deve corresponder de 2 a 5% do comprimento do prossoma independente do estágio de desenvolvimento.

Com estes resultados preliminares, a espirulina liofilizada mostrou ser uma alternativa viável e com potencial para manutenção do copépode *A. tonsa* em sistema intensivo. Porém novos estudos deverão ser realizados para aprimorar o cultivo, determinar o perfil de ácidos graxos de copépodos cultivados com espirulina e o seu uso na larvicultura de peixes marinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, M.V. **Utilização do copépode *Acartia tonsa* nas diferentes fases de desenvolvimento da larva do robalo-peva *Centropomus paralelus***. 2010. 82p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BARTRAM, W. C. Experimental development of a model for the feeding of neritic copepods on phytoplankton. **J. Plankton Res.**, v.3, p. 25-51. 1980

BELAY, A. The potencial application of Spirulina (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health manangement. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v.5, p. 27-48. 2002.

BELL, J.G.; MC EVOY, L.A.; ESTEVEZ, A.; SHIELDS, R.J.; SARGENT, J.R. Optimizing lipid nutrition in first-feeding flat fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 211-220. 2003.

BERGGREEN, U.; HANSEN, B.; KIØRBOE, T. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. **Mar. Biol.**, v. 99, p. 341-352. 1988.

BRADFORD-GRIEVE, J.; MARKHASEVA, E.L.; ROCHA, C.E.F.; ABIAHY, B. *In* South atlantic zooplankton. 2. **Copepopoda**. Ed. B. Leiden, Netherlands: Boltovskoy, 1999. p. 869-1098.

BRETT, M.T.; MÜLLER-NAVARRA, D..C. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. **Freshwater Biol**, v.38, p. 483-499. 1997.

COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Fatty acid composition of spirulina strains grown under various environmental conditions. **Phytochemistry**, v.26, p. 2255-2258. 1987.

COWLES, T.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W. Food selection by copepods: Discrimination on the basis of food quality. **Mar. Biol.**, v. 100, p. 41-49. 1988.

DESVILLETES, C.; BOURDIER, G; BRETON, J.C. On the occurrence of a possible bioconversion of linolenic acid into docosahexaenoic acid by the copepod *Eucyclops serrulatus* fed on phytoplankton. **J Plankton Res.**, v. 19, p. 273-278. 1997.

DONAGHAY, P.L.; SMALL, L.F. Food selection capabilities of the estuarine copepod *Acartia clausi*. **Mar. Biol.**, v. 52, p. 137-146. 1979.

EDERINGTON, M.C.; MCMANUS, G.B.; HARVEY, H.R. Trophic transfer of fatty acids, sterols, and a triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. **Limnol Oceanogr**, v. 40(5), p.860-867. 1995

ENRIGHT, G.F.; NEWKIRK, J.S.; CRAIGIE, J.D. CASTELL, L. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v.96, p. 1-13. 1986.

FALK-PETERSEN, S.; SARGENT, J.R.; LOENNE, O.J.; TIMOFEEV, S. Functional biodiversity of lipids in Antarctic zooplankton: *Calanoides acutus*, *Calanus propinquus*, *Thysanoessa macrura* and *Euphausia crystallorophias*. **Polar Biol.**, v.21, p. 37-47. 1999.

HARVEY, H.R.; EGLINTON, G.; O'HARA, S. C. M.; CORNER, E.D. S. Biotransformation and assimilation of dietary lipids by *Calanus* feeding on a dinoflagellate *Geochim. cosmochim. Acta*, v. 51, p. 3031-3040. 1987

- HEINLE, D.R. Temperature and zooplankton. **Chesapeake Sci.**, v. 10, p. 186-209. 1969.
- HOUDE, S.E.L.; ROMAN, M.R. Effects of Food Quality on the Functional Ingestion Response of the Copepod *Acartia tonsa*. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 40(1-2), p. 69-77. 1987.
- HUMES, A.G. How many copepods? **Hydrobiologia**, v. 292-293, p. 1-7. 1994
- JONASDOTTIR, S.; KIØRBOE, T. Copepod recruitment and food composition: do diatoms affect hatching success? **Mar. Biol.**, v. 126, p. 743-750. 1996.
- JONASDOTTIR, S.H. Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. **Mar. Biol.**, v.121, p. 67-81. 1994.
- KAHAN, D.. Effects of some ecological factors on the growth of the copepod *Schzopera elatensis* a potential food organism for hatcheries. Kiel. **Meerersforsch Sonderh** , v.5, p.544-553. 1981.
- KAHAN, D.; Uhlig, G.; Schwenzler, D.; Horowitz, L. A simple method for cultivating harpacticoid copepods and offering them to fish larvae. **Aquaculture**, v. 26, p. 303-310. 1982.
- KIØRBOE, T. Phytoplankton growth rate and nitrogen content: implications for feeding and fecundity in a herbivorous copepod. **Mar Ecol Prog Ser.**, v. 55, p.229-234. 1989.
- KIØRBOE, T.; MØHLENBERG, F.; HAMBURGER, K. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa* : relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 26, p. 85-97. 1985
- KIØRBOE, T.; SAIZ, E.; VIITASALO, M. Prey switching behaviour in the planktonic copepod *Acartia tonsa*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 143, p. 65-75. 1996.
- KNUCKEY, R.M.; SEMMENS, G.L.; MAYER, R.J.; RIMMER, M.A. 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**, v.249, p. 339-351. 2005

KOSKI, M.; KLEIN BRETELER, W.; SCHOGT, N. Effect of food quality on rate of growth and development of the pelagic copepod *Pseudocalanus elongatus* (Copepoda, Calanoida). **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 170, p. 169-187. 1998.

LACOSTE, A.; POULET, S.A.; CUEFF, A.; KATTNER, G.; IANORA, A.; LAABIR, M. New evidence of the copepod maternal food effects on reproduction. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 259, p. 85-107. 2001.

LEMUS, J.T.; OGLE, J.T.; LOTZ, J. M. Extensive copepod culture using a highly nutritious natural water source. **World Aquaculture**, v. 33, p. 60-62. 2002.

LIAO, I.; SU, H. M.; CHANG, E. Y. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. **Aquaculture**, v. 200, p. 1-31. 2001.

LOTOCKA, M.; JUREWICZ, E.S.; BLEDZKI, L.A. Changes in carotenoid composition in different developmental stages of copepods: *Pseudocalanus acuspes* Giesbrecht and *Acartia* spp. **Journal of Plankton Research**, v. 26, p. 159-166. 2004

MAYZAUD, P.; ERRHIF, A.; BEDO, A. Distribution of plankton lipids and their role in biological transformation of Antarctic primary production. **J. Mar. Syst.**, v. 17, p. 391-403. 1988.

MORENO J.J.; DE MORENO, J.E.A.; BRENNER, RR. Fatty acid metabolism in the calanoid copepod *Paracalanus parvus*: 1. Polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v. 14, p. 313-322. 1979

MÜHLING, M.; HARRIS, N.; BELAY, A.; WHITTON, B.A. Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*. **J. Phycol.**, v.39, p. 360-367. 2003.

NANTON, D.A.; CASTELL, J.D. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe sp.*, for use as a live food for marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 163, p. 251-261. 1998.

NIVAL, P.; NIVAL, S. Particle retention efficiencies of a n herbivorous copepod, *Acartia clausi* (adult and copepodite stages): effects on grazing. **Lirnnol. Oceanogr.** v. 21: 24-30. 1976

NORSKER, N.H.; STØTTRUP, J.G. The importance of dietary HUFA's for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Tisbe holothuriae* Humes. **Aquaculture**, v.125, p. 155–166. 1994

OGLE, J. T; NICHOLSON, L. C.; LOTZ M. J. Culture of copepod *Acartia tonsa* utilizing various artificial feeds. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 53, p. 234-240. 2002.

240.OHNO, A.; OKAMURA, Y. Propagation of the calanoida copepoda *Acartia tsuensis* in outdoor tanks. **Aquaculture**, v. 70, p. 39-51. 1988.

OHNO, A.; TAKAHASHI, T.; TAKI, Y. Dynamics of exploited populations of the calanoid copepod, *Acartia tsuensis*. **Aquaculture**, v. 84, p. 27-39. 1990.

OLGUIN, E.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp. (Arthrospira)* grown on digested pig waste. **Biores. Technol**, v. 77, p.19-24. 2001.

OLIVOTTO, I.; CAPRIOTTI, F.; BUTTINO, I.; AVELLA, A.M.; VITIELLO, V., MARADONNA; F., CARNEVALI, O. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarki* larviculture: effects on larval survival and growth. **Aquaculture**, v. 274, p. 347-352. 2008.

OLIVOTTO, I.; HOLT, S.A.; CARNEVALI, O.; HOLT, J.G. Spawning, early development and first feeding in the lemonpeel angel fish *Centropyge flavissimus* . **Aquaculture**, v. 253, p. 270-278. 2006.

PAFFENHÖFER, G.A.; STRICKLER, J.R.; LEWIS, K.D.; RICHMAN, S. Motion behavior of nauplii and early copepodid stages of marine planktonic copepods. **J. Plankton Res.**, v.18, p.1699-1715. 1996.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferen imparipes*. **Aquaculture**, v. 201, p. 329-342. 2001.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J.; CLEARY, J.J. Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. **Aquaculture**, v. 194, p. 137-15. 2001.

PHLEGER, C. F.; NICHOLS, P.; VIRTUE, P. Lipids and trophodynamics of Antarctic zooplankton. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 120, p.311-323. 1998.

ROMAN, M. R. Pathways of carbon incorporation marine copepods: effects of developmental stage and food quality. **Limnol. Oceanogr.**, v. 36, p. 796-807. 1991

ROMAN, M.R. Nitrogenous nutrition of marine invertebrates, In E. J. Carpenter and D. G. Capone [eds.], Nitrogen in the sea. **Academic**, p. 347-383. 1983.

RØNNESTAD, I.; HELLAND, L. Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. **Aquaculture**, v.165, p. 159-164. 1998.

SANTOS, F.M. **Efeito da densidade de estocagem no cultivo do copépe *Acartia tonsa* e avaliação do seu potencial como alimento vivo na larvicultura do robalo-peva *Centropomus parallelus***. 2005. 57p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SARGENT, J.R.; HENDERSON, R.J.. In: The Biological Chemistry of Marine Copepods. **Lipids**. New York: Oxford University Press, 1986. p.59 –108.

SARGENT, J.R.; FALK-PETERSEN, S. The lipid biochemistry of calanoid copepods. **Hydrobiologia**, v. 167-168, p. 101-114. 1988.

SARGENT, J.R. Functions and metabolism of lipids in marine organisms: an overview. Proceedings of Marine Lipids Symposium, Brest (France), 19–20 November 1998. **Actes Colloq. IFREMER**, v. 27, p.181-182. 2000

SCHIPP, G.R.; BOSMANS, J.M.P.; MARSHALL, A.J. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia spp.* **Aquaculture**, v.174, p. 81-88. 1999.

SHIELDS, R.J.; BELL, J.G.; LUIZI, F.S.; GARA, B.; BROMAGE, N.R.; SARGENT, J.R. Natural copepods are superior to enriched *Artemia nauplii* as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. **J. Nutr**, v.129, p. 1186-1194. 1999.

SPECKMANN, C. L.; BOLLENS S. M.; AVENT S. R. The effect of ultraviolet radiation on the vertical distribution and mortality of estuarine zooplankton. **J. Plankton Res.**, v. 22, p. 2325-2350. 2000.

STØTTRUP, J.G. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. **Aquacult. Res**, v. 31, p. 703-711. 2000.

STØTTRUP, J.G. A review on the status and progress in rearing copepods for marine larviculture. In: Avances en Nutrición Acuícola VIII. Memorias del Octavo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. **Advantages and disadvantages among calanoid, harpacticoid and cyclopoid copepods**. México: Mazatlán, Sinaloa, 2006. p. 62-83.

STØTTRUP, J.G.; BELL, J.G.; SARGENT, J.R. 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**, v. 176, p. 257- 26. 1999.

STØTTRUP, J.G.; JENSEN, J. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol**, v. 141, p. 87-105. 1990.

STØTTRUP, J.G.; NORSKER, N.H. Production and use of copepods in marine fish larviculture. **Aquaculture**, v. 155, p. 231-247. 1997.

STØTTRUP, J.G.; RICHARDSON, K.; KIRKEGAARD, E.; PIHL, N.J. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 52, p. 87-96. 1986.

TANG, K.W.; DAM, H.G. Phytoplankton inhibition of copepod egg hatching: test of an exudate hypothesis. **Mar. Ecol. prog. ser.**, v. 209, p. 197-202. 2001.

TOLEDO, J.D.; GOLEZ, M.S.; DOI, M.; OHNO, A. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*. **Fish. Sci.**, v. 65, p. 390-397. 1999.

TURK, P.E.; KREJCI, M.E.; YANG, W.T. A laboratory method for the culture of *Acartia tonsa* (Crustacea: Copepoda) using rice bran. **J. Agricult. Aquat. Sci.**, v. 3, p.25-27. 1982.

VELOZA, A. J.;CHU, F.E.;TANG, K.W. Trophic modification of essential fatty acids by heterotrophic protists and its effects on the fatty acid composition of the copepod *Acartia tonsa*. **Marine Biology**, v. 148, p.779-788. 2006.

ARTIGO CIENTÍFICO

PRODUÇÃO DO COPÉPODE *Acartia tonsa*, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ESPIRULINA COMERCIAL LIOFILIZADA (*Arthrospira sp.*)Wesley Freitas da Anunciação⁽¹⁾; Mônica Yumi Tsuzuki⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratório de Piscicultura Marinha II - Universidade Federal de Santa Catarina. Servidão dos Coroaos, s/n. CEP 88061-600. Barra da Lagoa, Florianópolis-SC. wfann@zootecnista.com.br, mtsuzuki@cca.ufsc.br

RESUMO – O copépode *Acartia tonsa* é geralmente cultivado com dietas multi-algais, entretanto, dietas alternativas constituem uma opção para reduzir os altos custos de produção de microalgas. Neste estudo, avaliou-se o uso da espirulina comercial liofilizada, como alimento inerte, no cultivo intensivo do copépode *Acartia tonsa*. Os tratamentos utilizados foram 10, 20 e 30 mg de espirulina . L⁻¹ respectivamente para os tratamentos T10, T20 e T30, em quadruplicata. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia, 08 e 16 h. A temperatura foi mantida em 25±1°C; fotoperíodo 14L: 10E e salinidade 30‰. Foram avaliadas as taxas de sobrevivência final, desenvolvimento, produção de ovos . fêmea . dia⁻¹ e eclosão. A maior sobrevivência ocorreu no T30 (68%), seguido por T20(47%) e T10(32%). A média de ovos produzidos por fêmea dia⁻¹ foi de 22,3 para T10 e 24,6 para T20 e a taxa média de eclosão foi de 56%(T10) e 61%(T20). O T30 foi eliminado neste teste devido a elevada mortalidade. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que espirulina liofilizada é uma alternativa viável para manutenção do copépode *A. tonsa* em sistema intensivo.

ABSTRACT - The copepod *Acartia tonsa* is generally cultured with multi-algal diets, however, alternative diets are an option to reduce the high cost of production of microalgae. In this study, we evaluated the use of commercial freeze-dried spirulina as inert food, in intensive cultivation of the copepod *Acartia tonsa*. The treatments were 10, 20 and 30 mg of spirulina. L⁻¹ respectively for treatments T10, T20 and T30, performed in quadruplicate. Food was provided twice daily, at 08 and 16 o'clock. The experimental units were kept in a water bath, temperature was kept at 25 ± 1°C, photoperiod 14L: 10D and 30 ‰ salinity. Rates for final survival , development, production . egg . female . day⁻¹ and hatching were evaluated. The highest survival occurred in

T30 (68%), followed by T20 (47%) and T10 (32%). The average number of eggs . female . day⁻¹ was 22.3 and 24.6 for T10 and T20 respectively, and the average rate of hatching was 56% (T10) and 61% (T20), T30 was discarded in this test due to the high mortality of breeders. The results of this study indicate that freeze-dried spirulina is a viable alternative for maintenance of the copepod *A. tonsa* in intensive system.

INTRODUÇÃO

Os copépodes são crustáceos que constituem a principal fonte de alimento para as larvas de diversas espécies de peixes marinhos no ambiente natural (Norskee; Støttrup, 1994). Os copépodes marinhos utilizados na aquicultura são divididos em três principais ordens, calanoida, haparticoida e cyclopoida. A utilização de copépodes da ordem calanoida na aquicultura vem demonstrando bons resultados devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, ao tamanho adequado dos estágios naupliares e ao comportamento pelágico, se tornando mais suscetíveis à predação das larvas por se movimentarem na coluna d'água (Payne; Rippingale, 2001; Olivotto et al., 2008, 2009).

A utilização de copépodes na piscicultura marinha é uma alternativa viável (Payne et al., 2001; Bell et al., 2003), porém seu uso ainda é restrito. A principal forma de uso dos copépodes na aquicultura têm sido através de coletas no meio ambiente (Toledo et al., 1999; Lemus et al., 2002) ou em viveiros (Liao et al., 2001). Esses métodos de coleta são altamente dependentes das condições ambientais e ciclos meteorológicos, além de apresentarem o risco da introdução de vetores de doenças e parasitas no cultivo (Knuckey et al., 2005). O cultivo de copépodes em laboratório elimina algumas dessas desvantagens, permitindo uma produção constante, o conhecimento e a manipulação do perfil nutricional do alimento, a eliminação de espécies indesejáveis presentes no zooplâncton selvagem e o maior controle sobre a disseminação de doenças (Støttrup, 2000; Knuckey et al., 2005).

A espécie *Acartia tonsa* é um copépode calanoida cosmopolita, eurialino e euritérmico de vida livre que vem obtendo um crescente interesse para a aquicultura (Støttrup, 2003; Mauchline, 1998). Uma série de estudos vem sendo realizados ao longo dos anos, com o intuito de desenvolver tecnologia para o cultivo de *A. tonsa* (Støttrup; Jensen,

1990; Jónasdóttir, 1994; Kiørboe et al., 1996; Schipp et al., 1999; Bersano, 2003; Teixeira et al., 2010).

Acartia é mantida em cultivo com dietas multi-algais (*Chaetoceros*, *Isochrysis* e *Tetraselmis*), de alta qualidade (Støttrup et al., 1986; Schip et al., 1999; Cowles, et al., 1988; Apeitos et al., 2004). Porém, alguns autores já cultivaram com sucesso *A. tonsa* com alimento inerte (Turk et al. 1982; Ogle et al., 2002). Dietas alternativas constituem uma interessante opção para reduzir os altos custos de produção de microalgas, principalmente em termos de mão-de-obra e infra-estrutura.

A microalga do gênero *Arthrospira* é comercialmente conhecida como espirulina, sendo utilizada como complemento alimentar na dieta de humanos e animais (Belay, 2002), como fonte protéica e suplemento alimentar (FAO, 2008). Nos últimos anos vêm ganhando popularidade na indústria alimentícia e farmacêutica, devido a sua composição nutricional. Por estar disponível em escala comercial é possível sua utilização na aquicultura (Ceballos et al., 2006). Alguns estudos com crustáceos, utilizando espirulina, vêm sendo realizados para testar propriedades terapêuticas e imunoestimulantes (Belay et al., 1993; Takeuchi et al., 2002) e a presença de compostos antioxidantes (Miranda et al., 1998; Estrada et al., 2001) desta microalga.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização de espirulina liofilizada no cultivo intensivo do copépode *A. tonsa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Período de Estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Piscicultura Marinha II (LAPMAR II) na Estação de Maricultura da Universidade Federal de Santa Catarina, situada na Barra da Lagoa, Florianópolis, SC.

Origem, obtenção e manutenção dos copépodes selvagens

Os copepódes foram coletados na Lagoa da Conceição, Florianópolis-SC, durante a primavera, com o uso de rede de zooplâncton, malha de 300 µm. Após a coleta, os copépodes foram separados com malhas de diferentes aberturas de malha (500, 300 e 150 µm). Os adultos da espécie foram isolados no microscópio estereoscópico com o auxílio de pipetas de Pasteur e classificados como

Acartia tonsa de acordo com a chave de Bradford-Grieve (1999). Após a separação, foram transferidos para tanques cilindro-cônicos de 100L, dotados de leve aeração, e água com parâmetros físico-químicos semelhantes aos mensurados no momento e no local da coleta: salinidade 20‰, temperatura 24°C e pH 8.3.

Os copépodes foram alimentados somente com espirulina liofilizada (Fig. 1 – Anexo), adquirida em farmácia de manipulação na região de Florianópolis, SC, processada no liquidificador e filtrada em tela de 60µm, para retenção de pequenos aglomerados de células e retirada do excesso de espuma formada. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia, sendo que a quantidade de espirulina fornecida diariamente variou entre 1,2 e 8 mg . L⁻¹ e foi baseada na observação da densidade média de copépodes, nos níveis de amônia, na transparência e na formação do biofilme nas paredes dos tanques de cultivo

Destes tanques foram obtidos os náuplios e adultos utilizados nos experimentos seguintes.

Análise bioquímica e perfil de ácidos graxos da Espirulina

O alimento utilizado em substituição ao uso de microalgas vivas no cultivo do copépode *A. tonsa* é uma microalga do gênero *Arthrospira*, conhecida popularmente como espirulina. Sua “forma” comercial liofilizada possui 65,3% de proteína; 6,18% de lipídeos totais; 5,9% de cinzas; 253,9 mg . 100g⁻¹ de carotenóides e densidade aparente de 0,5659 g . mL⁻¹, dados obtidos pelo laudo da importadora do produto, DEG importação de produtos químicos LTDA

A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas. Para realização desta análise, uma alíquota do extrato lipídico contendo aproximadamente 400 mg de lipídios, foi seca em evaporador rotatório. A transmetilação foi realizada de acordo com o método de Hartman e Lago (1973). A cromatografia gasosa foi realizada em um cromatógrafo a gás, equipado com amostrador automático; injetor split, razão 75:1; coluna capilar CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm i.d., 0,20 µm de filme); detector por ionização em chama (FID) e workstation para aquisição dos dados. A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e padrões e co-cromatografia. A quantificação foi realizada por normalização de área e os resultados foram expressos em g . 100g⁻¹.

Para expressar os resultados em g . 100 g⁻¹ de amostra para cada um dos ácidos graxos individuais, utilizou-se a fórmula, AGI = A . L .

$0,956 \cdot 100^{-1}$, sendo A correspondente a porcentagem de área nos picos obtidos pelos cromatogramas; L = teor de lípidos totais e 0,956 o fator de conversão (Holland et al., 1994).

Para a determinação do tamanho médio das partículas de espirulina, algumas amostras foram analisadas em microscópio óptico, Leica DM5000, em aumento de 40x, e mensuradas com o software, Leica Application Suite LAZ EZ®.

Experimento I Crescimento e sobrevivência do copépode *Acartia tonsa* alimentado com diferentes concentrações de espirulina liofilizada comercial

Foram testados três tratamentos, com quatro repetições, com diferentes concentrações de espirulina: Tratamento T10, T20 e T30 com 10, 20 e 30 mg de espirulina. L^{-1} , respectivamente. As densidades utilizadas foram baseadas em ensaios previamente realizados. Os copépodes foram alimentados duas vezes ao dia, 08 e 16 h, com espirulina, pesada em balança de precisão, diluída em volume conhecido, processada no liquidificador e filtrada em peneira de $60\mu m$.

Para este experimento, utilizaram-se náuplios de *A. tonsa* para avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento, da fase naupliar à fase adulta. Assim, foram estocados inicialmente em cada repetição, 950 náuplios $\cdot L^{-1}$, em recipientes cilíndrico-cônicos, com capacidade de 1,5 L, dotados de leve aeração. Esta densidade de estocagem foi baseada em estudos anteriores realizados com a mesma espécie (Kaminski, 2004; Santos, 2005). Os náuplios foram obtidos a partir de ovos retirados dos tanques de cultivo massivo de 100 L, após filtragem por copo coletor com malha de $45\mu m$ e colocados em frascos de vidro de 4 L para eclosão. Após o período de 48 h, alíquotas foram retiradas para contagem e estimativa da densidade de náuplios.

As unidades experimentais foram mantidas em banho-maria, temperatura $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$; fotoperíodo controlado em 14L: 10E e salinidade 30‰. Os parâmetros de qualidade da água, amônia, pH, salinidade e temperatura, foram medidos diariamente. Para o monitoramento da amônia e pH foram utilizados kits de teste da Alcon® e para salinidade foi utilizado refratômetro com precisão de 1‰. Para a manutenção da qualidade da água, 50% desta era renovada diariamente, através de sifonamento, com uso de malha de $45\mu m$ na parte inferior do cano, para evitar a remoção dos náuplios. A alimentação com a espirulina era realizada após a renovação da água.

Foram retiradas diariamente alíquotas de 50 mL, para se acompanhar o estágio de desenvolvimento dos copépodes (Kaminski, 2004). Ao se detectar que os organismos atingiram a maturidade sexual, todo o conteúdo dos frascos foi filtrado, fixado em formaldeído 4% e armazenado em frascos plásticos de 50 mL, para posterior contagem do número de náuplios, copepoditos e adultos. Foram analisadas as taxas de sobrevivência final e de desenvolvimento (porcentagem de cada estágio de desenvolvimento, náuplio, copepodito, adulto, ao longo do período experimental).

Experimento II – Capacidade reprodutiva do copépode *Acartia tonsa* alimentado com espirulina liofilizada

Com o objetivo de avaliar a fecundidade (taxa de produção de ovos . fêmea⁻¹) bem como a taxa de eclosão dos ovos, foram utilizadas as mesmas concentrações de espirulina do experimento anterior (T10, T20 e T30), em quatro repetições.

Náuplios de *A. tonsa* foram separados dos tanques de cultivo de 100L e estocados em frascos cilíndricos de 4 L até atingirem a fase adulta para que todos os adultos tivessem a mesma idade. Esses adultos foram separados na proporção de 10 fêmeas: 2 machos (Holste; Peck, 2006) para cada repetição, e foram estocados em recipientes plásticos de 500 mL. Cada unidade experimental de 500 mL era composta de dois recipientes plásticos sobrepostos, sendo o recipiente interno dotado de malha de 150 µm no fundo do recipiente. Segundo Marcus e Wilcox, (2007) os ovos de *Acartia* são levemente mais pesados que a água salgada, conseqüentemente vão para o fundo após a reprodução. Com isso, o uso da malha de 150 µm no fundo do recipiente de cultivo permitiu remover diariamente os adultos sem remover os ovos, que ficavam depositados no fundo do recipiente externo. As unidades experimentais foram mantidas em banho-maria dentro de um tanque de fibra, com temperatura controlada em 25 ± 1 °C, fotoperíodo controlado em 14L: 10E e salinidade 25 ‰.

Durante o período experimental de dois dias, foi realizada a contagem dos ovos a cada 24 h. Antes do início do experimento os animais passaram por um período de aclimação de 24 h. Os ovos foram isolados com uso de malha de 45 µm e analisados sob microscópio estereoscópico em placas de Petri. Após a contagem dos ovos, estes foram incubados em recipientes cilíndricos de 500 mL, com as mesmas condições de temperatura e salinidade, porém o fotoperíodo passou a ser de 24h Luz. Após o período de 48h os náuplios recém

eclodidos foram contados e foi calculada a taxa de eclosão (n° de náuplios eclodidos . n° de ovos produzidos⁻¹).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância Unifatorial (ANOVA), e as médias ($n=4$) comparadas pelo teste Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o software Biostat®. As taxas, em porcentagem, de sobrevivência, desenvolvimento e eclosão dos ovos foram transformadas através da raiz do arco-seno (Centeno, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I - Crescimento e sobrevivência do copépode *Acartia tonsa* alimentado com diferentes concentrações de espirulina liofilizada comercial

As diferentes concentrações de alimento influenciaram a sobrevivência final da *A. tonsa*. A maior sobrevivência final (68%) ocorreu no tratamento alimentado com 30 mg de espirulina. L⁻¹ (T30), entretanto, somente se comparado ao T10 (32%) ($P<0,05$). O tratamento T20 (47%) não diferiu estatisticamente dos outros tratamentos (Fig. 1). Kaminski (2004) testando o desenvolvimento e sobrevivência de *A. tonsa*, da fase naupliar até adultos, com diferentes alimentos obteve taxas de sobrevivência final médias de 51% para o tratamento utilizando a microalga *Isochrysis* (T-iso) 0,04% para tratamento com *Thalassiosira fluviatilis*; 55% para o com misto das duas algas e 3,86% para o com alimento artificial Algamac®. Santos (2005) cultivando adultos *A. tonsa* em diferentes densidades e alimentados com *Isochrysis* (T-iso) e *Thalassiosira weissflogii*, obteve a taxa de sobrevivência 62%, para a densidade de estocagem de 1000 indivíduos . L⁻¹.

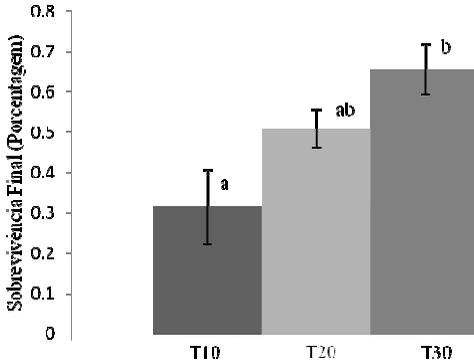


Figura 1 – Sobrevivência média final de copépodes, em porcentagem, de cada tratamento. T10 (10 mg . espirulina . L⁻¹); T20 (20 mg . espirulina . L⁻¹); T30 (30 mg . espirulina L⁻¹). Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05). Barras indicam desvio padrão.

Apesar da melhor sobrevivência no T30, os níveis de amônia tóxica chegaram a 0,126 mg . L⁻¹ ao final do experimento, enquanto os níveis no T10 e T20 mantiveram-se estáveis e próximos a 0,021 e 0,042 mg . L⁻¹. Foi observada a diminuição da atividade natatória dos copépodes com o excesso de partículas suspensas na água e com o aumento da amônia, principalmente no último dia de experimento. Conforme verificado no microscópio, essas partículas ficavam aderidas aos apêndices da *A. tonsa*, o que pode ter contribuído para a redução da atividade natatória. Segundo Buttino (1994) os copépodes calanoida são bastante sensíveis a elevados níveis de amônia, sendo a viabilidade dos ovos de *Acartia clausi* afetada negativamente em níveis de amônia superiores a 0,12 mg . L⁻¹. Dessa forma, neste trabalho, mesmo o T30 tendo obtido a melhor taxa de sobrevivência, esta concentração de alimento pode não ser a melhor opção para o cultivo em longo prazo, devido ao aumento dos níveis de amônia e de partículas em suspensão.

Pelo fato da espirulina liofilizada ser um alimento inerte, foi observada a formação de um biofilme, a partir do quarto dia de experimento, no fundo dos tanques nas maiores concentrações do alimento fornecido (T30 e T20), o que pode ter contribuído para o aumento dos níveis de amônia. No T30, ainda foi observada a presença do ciliado *Euplotes sp* nos últimos dois dias de experimento. Segundo Støttrup (2003) em cultivos intensivos, a presença de certos ciliados,

como as espécies de *Euplotes*, são frequentemente um indicativo de excesso de alimento no cultivo.

Práticas de manejo e de melhorias da qualidade da água podem aumentar a viabilidade do cultivo, permitindo a utilização de concentrações mais elevadas de espirulina no cultivo. Entretanto, devido à *A. tonsa* ser sensível ao manejo, e ao pequeno volume dos recipientes utilizados no experimento, não foi possível realizar uma renovação diária maior do que 50% do volume. O uso de filtros biológicos e uma maior frequência alimentar poderiam minimizar os efeitos negativos do uso do alimento inerte.

As partículas de espirulina, após o processamento no liquidificador, se encontram na faixa de 2-90 μm , sendo a maioria das partículas observadas na faixa de 6 a 17 μm . Essa variação na faixa de tamanho das partículas de espirulina pode ter possibilitado o desenvolvimento dos diferentes estágios de *A. tonsa*. Segundo Berggreen et al. (1988), o tamanho mínimo estimado de partículas capturadas por *A. tonsa* é de 2-4 μm para todos os estágios de desenvolvimento e o tamanho ótimo de partículas aumenta de acordo com o desenvolvimento do animal, sendo de 7-14 μm para náuplios NII e NIII e de 14-70 μm para adultos, sendo que o tamanho máximo de captura por estes é de 250 μm .

A alimentação e reprodução de *A. tonsa* são influenciadas diretamente pela abundância e pela qualidade da dieta (Houde; Roman, 1987), levando em conta o tamanho (Berggreen et al., 1988), a composição bioquímica e o formato do alimento (Støttrup; Jensen, 1990). A espirulina é um alimento que representa uma importante fonte protéica, com mais de 65% de proteína, possui ainda cerca de 20% de carboidratos e 6% de lipídeos (Henrikson, 2009). Além disso, a espirulina não possui celulose nas suas paredes celulares e sim um mucopolissacarídeo, o que aumenta sua digestibilidade (Henrikson, 2009). De acordo com a análise realizada no presente experimento para a espirulina, dentro da composição dos lipídeos totais 34,8% são poliinsaturados; 6,1% monoinsaturados e 46,9% saturados. Apesar de possuir 6,18% de lipídeos, o nível de ácidos graxos altamente insaturados na espirulina é baixo. Os principais ácidos graxos são: 16:0(44,8%); 18:2(n-6) (19,9%). 18:1(n-9) (3,6%); 16:1(n-7) (2,1%); 18:3(n-6) (2,1%); 18:0 (1,5%); 14:0 (0,2%).

Alguns autores observaram que a composição nutricional dos copépodes está diretamente relacionada com a composição bioquímica do alimento consumido (Velosa et al., 2006; Barroso, 2010). Apesar de não ter sido realizada a análise do perfil de ácidos graxos dos copépodes

no presente experimento, provavelmente o nível de ácidos graxos altamente insaturados nos copépodes alimentados com espirulina deve ser baixo, decorrente das baixas concentrações destes ácidos na espirulina, em comparação com dietas mais ricas, principalmente em relação ao EPA (eicoisapentaenóico) e ao DHA (docosa-hexaenóico). Ederington et al.(1995) observaram que *Acartia* alimentada com diatomáceas apresentou um teor mais elevado de ácidos graxos insaturados na sua composição corporal e nos ovos produzidos, em relação a dieta a base de ciliados. Porém esses autores, através da observação contínua da produção de ovos em *A. tonsa* sugerem que esta espécie não é tão rigorosa em exigência nutricional de ácidos graxos altamente insaturados.

Apesar da taxa de desenvolvimento dos copépodes depender diretamente da temperatura da água (Heinle, 1969; Kiørboe et al., 1985), outros fatores como a disponibilidade e a qualidade do alimento também influenciam nesse desenvolvimento (Berggreen et. al., 1988). No presente trabalho, não foi observada diferença significativa entre os estágios de desenvolvimento em relação às diferentes concentrações de alimento (Fig. 2). Os náuplios predominaram nos dois primeiros dias, diminuindo gradativamente até o sexto dia. Os adultos começaram a ser verificados no sexto dia e ao final do experimento constituam a maioria dos indivíduos (Fig. 3 – Anexo). Os resultados da taxa de desenvolvimento foram semelhantes aos encontrados por Kaminski (2004) e Santos (2005).

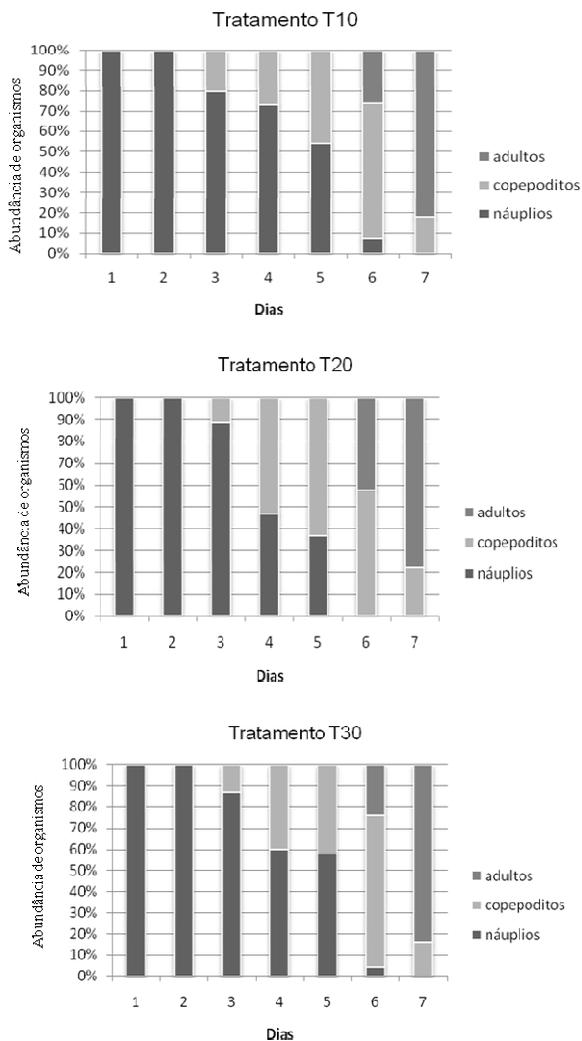


Figura 2 . Porcentagem das diferentes fases de desenvolvimento do copépode *A. tonsa* alimentados com diferentes concentrações de espirulina liofilizada. T10 (10 mg · espirulina · L⁻¹); T20 (20 mg · espirulina · L⁻¹); T30 (30 mg · espirulina L⁻¹)

Experimento II – Capacidade reprodutiva do copépode *Acartia tonsa* alimentado com espirulina liofilizada

A média de ovos produzidos por fêmea dia^{-1} foi de 22,3 para o tratamento T10 e 24,6 para T20, não diferindo estatisticamente ($P > 0,05$). O tratamento T30 foi eliminado, pois houve uma grande mortalidade dos adultos após o período de aclimação. Essa mortalidade provavelmente foi provocada pelo aumento rápido dos níveis de amônia tóxica, que chegou próxima a $0,12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ou pelo aumento da concentração de partículas em suspensão que acabaram se aderindo ao corpo dos copépodes, conforme observado posteriormente no microscópio estereoscópico.

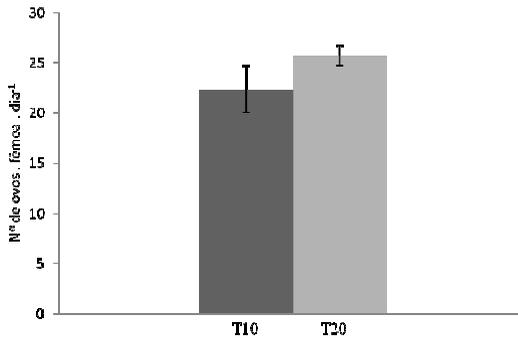


Figura 3. Produção de ovos fêmea . dia^{-1} (Média e desvio padrão) nos tratamentos T10 (10 mg . espirulina . L^{-1}) e T20 (20 mg . espirulina . L^{-1}).

A produção de ovos observada no presente experimento ficou dentro da faixa encontrada por outros autores, que obtiveram média de 20-30 ovos fêmea . dia^{-1} (Støttrup et al. 1986; Bersano, 2003; Kaminski, 2004; Teixeira, 2010). A produção de ovos . fêmea . dia^{-1} do presente experimento não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Porém, Almeida (2006) obteve diferenças significativas ao testar diferentes concentrações de alimento na produção de *A. tonsa*, utilizando a microalga *Thalassiosira fluviatilis*. A produção de ovos por fêmea aumentou gradativamente com a oferta de alimento, variando de aproximadamente 15 ovos . fêmea . dia^{-1} , na dieta com 5000 células . mL^{-1} à aproximadamente 60 ovos fêmea dia^{-1} na dieta com 80.000 células . dia^{-1} . Teixeira et al. (2010) ao avaliarem a produção de ovos de *A. tonsa* alimentadas com *T. weissflogii*, *Chaetoceros muelleri* e

Isochrysis galbana também observaram que a produção de ovos . fêmea . dia⁻¹ aumentou de acordo com o aumento da densidade alimentar para as três microalgas. Porém os autores relatam que esse aumento chegou a um ponto de saturação, em que nas densidades mais elevadas de alimento não houve alteração da produção de ovos, que se manteve estável. Essa pode ser uma explicação para a pequena variação da produção de ovos por fêmea entre os diferentes tratamentos no presente experimento.

Comparando-se a produção de ovos . fêmea dia⁻¹ com o uso da espirulina em relação a outros alimentos inertes, esta foi superior. Almeida (2006) ao utilizar o alimento inerte CultureSelco3000® obteve a média de 2 ovos . fêmea . dia⁻¹, enquanto Kaminski (2004) ao utilizar o Algamac® obteve a média de 0,5 ovos . fêmea . dia⁻¹ e sobrevivência máxima de 3,9%. No presente estudo, a média de ovos produzidos por fêmea dia⁻¹ ficou em torno de 23,4. Essas diferenças podem estar relacionadas, a qualidade nutricional e ao tamanho das partículas do alimento.

De acordo com a as análises do presente experimento, a espirulina é um alimento pobre em ácidos graxos altamente insaturados. Embora não seja totalmente bem esclarecida a relação entre a fecundidade dos copépodes e a concentração de EPA e DHA na dieta (Støttrup; Jensen, 1990; Koski et al., 1998; Lee et al., 1999), as maiores taxas de produção de ovos coincidiram com as maiores relação EPA: DHA para *A. tonsa* (Støttrup; Jensen 1990; Jónasdóttir 1994; Jónasdóttir; Kjørboe, 1996). Vargas et al. (2006) observaram ao utilizar diferentes microalgas no cultivo de *A. tonsa* que as dietas com altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e ácidos graxos altamente insaturados favoreceram a maior produção de ovos pelas fêmeas, mas paradoxalmente as análises demonstraram que o DHA e a quantidade total de ácidos ômega 3 tiveram uma correlação negativa com a taxa de eclosão e sobrevivência dos náuplios.

Veloza et al. (2006) verificaram o conteúdo de ácidos graxos do copépode *A. tonsa* alimentado com dietas pobres em EPA, e sugerem que o EPA pode ser catabolizado por este copépode. O papel dos ácidos poliinsaturados ômega 3 em copépodes ainda não é claro, mas eles são descritos como importantes na manutenção da fluidez da membrana em meio ambientes frios (Benson; Lee, 1975) e facilitam o catabolismo de ácidos graxos monoenólicos de cadeia longa (Sargent; Henderson, 1986).

Além dos lipídeos, outros nutrientes podem ser importantes para a taxa de fecundidade dos copépodes. Kleppel et al. (1998) demonstraram que o conteúdo de aminoácidos da dieta está relacionado

com a produção de ovos em *A. tonsa*. Apesar dos lipídeos exercerem uma influência superior na fecundidade de *A. tonsa*, o conteúdo de proteína e nitrogênio na alimentação têm uma correlação positiva com a fecundidade (Jónasdóttir, 1994).

No presente estudo, a taxa média de eclosão foi de 56 e 61% para T10 e T20, não diferindo estatisticamente ($P > 0,05$). Esses valores ficaram dentro da média observada por Lincoln et. al. (2005), que ao testarem a influência da alimentação de *A. tonsa* com as diatomáceas *Pseudo-nitzschia multiseriis* e *Pseudo-nitzschia pungens* observaram a taxa de eclosão entre 22 e 76%, sendo a média de 45% para as duas dietas. Porém, ficaram abaixo do observado por Santos (2005), que obteve taxas médias de eclosão próximas a 85%, no cultivo *A. tonsa* com *Isochrysis* (T-isso) e *Thalassiosira weissflogii*. Essa diferença pode ser resultado da composição de lipídeos da espirulina, principalmente em relação às baixas quantidades de DHA, EPA e de esteróides.

Broglia et al. (2003) observaram que a viabilidade dos ovos de *Acartia tonsa* estava correlacionada à ingestão de ácidos graxos essenciais encontrados em presas heterotróficas, mas a produção de ovos não. Jónasdóttir e Kiørboe (1996) e Tang et al. (2001) observaram que o sucesso de eclosão de ovos foi influenciada pela ingestão de ácidos graxos poliinsaturados e pela soma dos ácidos graxos essenciais ARA (Aracônico), EPA e DHA. Dessa forma, esses autores consideraram a composição e a quantidade de ácidos graxos como um importante fator para se determinar o sucesso da taxa de eclosão de ovos e para o desenvolvimento embrionário em *A. tonsa*. Hassett (2004) observou que a taxa de eclosão de ovos para *Acartia hudsonica* foi maior quando alimentada com *T. weissflogii* e suplementada com colesterol (91% de eclosão) do que quando alimentada com a dieta sem o suplemento (40% de eclosão).

Apesar da taxa de produção de ovos e da taxa eclosão do presente estudo ser menor do que as taxas obtidas em alguns trabalhos que utilizaram alimentos mais ricos em ácidos graxos altamente insaturados, a espirulina ainda se mostra uma alternativa potencial como alimento inerte para o cultivo de *A. tonsa*. Porém novos estudos devem ser realizados para analisar: o perfil de ácidos graxos dos copépodes cultivados com esse alimento; o enriquecimento da espirulina com ácidos graxos essenciais; o uso desses copépodes na larvicultura de peixes, bem como seu cultivo em maior escala e a sua viabilidade econômica.

CONCLUSÕES

O uso da espirulina liofilizada permitiu a sobrevivência e o desenvolvimento das diferentes fases do copépode *A. tonsa*, assim como a sua reprodução. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que espirulina liofilizada é uma alternativa viável e com potencial para o cultivo do copépode *A. tonsa* em sistema intensivo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. F. **Uso de copépodes na alimentação de larvas do linguado *Paralichthys orbgnyanus* (Valenciennes, 1842)**. 2006. 28p. Dissertação (mestrado). Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande.

APEITOS, A., LOTZ, J., OGLE, J.; LEMUS, J.. The effect of diet on fecundity of *Acartia tonsa*, a calanoid copepod. **The Journal of the Mississippi Academy of Sciences**, p.49-94. 2004

BELAY, A., OTA, Y., MIYAKAWA, K., SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J Appl Phycol**; v. 5, p. 235-4. 1993.

BELAY, A. The potencial application of *Spirulina*(*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health manangement. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, p. 27-48. 2002.

BELL, J. G., McEVOY, L.A., ESTEVEZ, A., SHIELDS, R.J., SARGENT, J.R.. Optimizing lipid nutrition in first-feeding flat fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 211-220. 2003.

BERGGREEN, U., HANSEN, B., KIØRBOE, T. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implic ations for determination of copepod production. **Mar. Biol.**, v. 99, p. 341-352. 1988.

BENSON, A.A.; LEE, R.F. The role of wax in oceanic food chains. **Sci. Am.**, v. 232, p. 77-86. 1975.

BERSANO, J.G.F. In: Word Aquaculture. **Intensive cultivation of the calanoid copepod *Acartia tonsa* a potential source of live food for aquaculture**. Salvador, BA, Brazil, 2003. p. 95–195.

BRADFORD-GRIEVE, J.M.; MARKHASENA, E.L.; ROCHA, C.E.F.; ABIAHY, B. In "South Atlantic Zooplankton". **Copepoda**. Leiden, Netherlands: Boltovskoy, D, 1999. p.869-1098.

BROGLIO E, JÓNASDÓTTIR, S.H. , CALBET, A., JAKOBSEN, H.H., SAIZ, E. Effect of heterotrophic versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. **Aquat Microb Ecol**, v. 31, p. 267-278. 2003.

BUTTINO I. The effect of low concentrations of phenol and ammonia on egg production rates, fecal pellet production and egg viability of the calanoid copepod. **Marine Biology**, v. 119, p. 629-634. 1994.

CEBALLOS, B., HERNANDEZ-LLAMAS, A., GARCIA, T., PEREZ-JAR, L., VILLAREAL , H. Substitution of *Chaetoceros mulleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae, **Aquaculture**, v. 266, p. 215-220. 2006.

CENTENO, A. J. **Curso de estatística aplicada à biologia**. 2ª Ed. Goiânia: Ufg, 1999. 234p.

COWLES, T.J., OLSON, R.J., CHISHOLM, S.W. Food selection by copepods: Discrimination on the basis of food quality. **Mar. Biol.**, v. 100, p. 41-49. 1988.

DELBARE, D., DHERT, P., LAVENS, P. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture Zooplankton**. Rome: FAO Fisheries Technical Papers 361, 1996. p 252-282.

DONAGHAY, P.L., SMALL, L.F. Food selection capabilities of the estuarine copepod *Acartia clausi*. **Mar. Biol.**, v.52, p. 137-146. 1979.

EDERINGTON, M.C., MCMANUS, G.B., HARVEY, H.R. Trophic transfer of fatty acids, sterols, and a triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. **Limnol Oceanogr**, v. 40(5), p. 860-867. 1995.

ESTRADA J.E., BESCÓS, P., VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. II **Farmaco**; v. 56, p. 497-500. 2001

FAULK, C.K., HOLT, G.J. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. **Aquaculture**, v. 249, p. 231243. 2005.

HARTMAN, L.,LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, v.22, p.475-481. 1973.

HASSET, R. P. Supplementation of a diatom diet with cholesterol can enhance copepod egg-production rates. **Limnol. Oceanogr.**, v. 49(2), p. 488-494. 2004

HEINLE, D. R. Temperature and zooplankton. **Chesapeake Sci.**, v. 10, p. 186-209. 1969.

HENRIKSON, R. **Earth Food Spirulina**. Hawaii: Ronore Enterprises, Inc., 2009. 188 p.

HOUDE, S.E.L.; ROMAN, M.R. Effects of Food Quality on the Functional Ingestion Response of the Copepod *Acartia-Tonsa*. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 40(1-2), p. 69-77. 1987.

HOLSTE, L. AND PECK, M.A. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. **Mar. Biol.**, v. 148(5), p.1061-1070. 2006.

JONASDOTTIR, S., KIØRBOE, T. Copepod recruitment and food composition: do diatoms affect hatching success? **Mar. Biol**, v. 126, p. 743-750. 1996.

JONASDOTTIR, S.H. Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. **Mar. Biol.** v. 121, p. 67-81. 1994.

KAHAN, D. Effects of some ecological factors on the growth of the copepod *Schzopera elatensis* a potential food organism for hatcheries. **Kiel. Meerersforsch Sonderh.** v. 5, p. 544-553. 1981.

KAMINSKI, S. M. **Influência da alimentação sobre a reprodução e desenvolvimento do copépode Calanoida *Acartia tonsa* Dana 1849,**

em cultivo intensivo. 53p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. 2004.

KIØRBOE, T., MØHLENBERG, F., HAMBURGER, K. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 26, p. 85-97. 1985.

KIØRBOE, T.; SAIZ, E.; VIITASALO, M. Prey switching behaviour in the planktonic copepod *Acartia tonsa*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 143, p. 65-75. 1996.

KLEPPEL, G.S., BURKART, C.A., HOUCHIN, L. Nutrition and their regulation of egg production in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. **Limnol Oceanogr.**, v. 43, p. 1000-1007. 1998.

KNUCKEY, R.M., SEMMENS, G.L., MAYER, R.J., RIMMER, M.A. 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**, v. 249, p. 339-351. 2005.

KOSKI, M., KLEIN BRETELER, W., SCHOGT, N. Effect of food quality on rate of growth and development of the pelagic copepod *Pseudocalanus elongatus* (Copepoda, Calanoida). **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 170, p. 169-187. 1998.

LEE, H.W., BAN, S., ANDO, Y., OTA, T., IKEDA, T. Deleterious effect of diatom diets on egg production and hatching success in the marine copepod *Pseudocalanus newmani*. **Plankton Biol. Ecol.**, v. 46, p. 104-112. 1999

LEMUS, J.T., OGLE, J. T., LOTZ, J. M. Extensive copepod culture using a highly nutritious natural water source. **World Aquaculture**, v. 33, p. 60-62. 2002.

LIAO, I., SU, H. M. AND CHANG, E. Y. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. **Aquaculture**, v. 200, p. 1-31. 2001.

MAUCHLINE, J. **The biology of calanoid copepods**. San Diego: Academic Press, 1998. 710 p.

MCKINNON, D., DUGGAN, S., NICHOL, P.D., RIMMER, M.A., SEMMENS, G., ROBIN, B. The potential of tropical paracalanoid copepods as live feeds in aquaculture. **Aquaculture**, v. 223, p.89-106. 2003.

MIRANDA MS, CINTRA RG, BARROS SB, MANCINI FILHO J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, p. 1075-1079. 1998

NORSKER, N.H., STØTTRUP, J.G. The importance of dietary HUFA's for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Tisbe holothuriae*, humes. **Aquaculture**, v. 125, p. 155-166. 1994.

OGLE, J. T; NICHOLSON, L. C.; LOTZ M. J. Culture of copepod *Acartia tonsa* utilizing various artificial feeds. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 53, p. 234-240. 2002.

OLIVOTTO, I., AVELLA, M.A. , BUTTINO, I., CUTIGNANO, A., CARNEVALI, O. Calanoid copepod administration improves yellow tail clown fish (*Amphiprion clarkii*) larviculture: biochemical and molecular implications. **Aquacult. Aquarium. Conserv. Legislation Bio flux**, v. 2(3), p. 355-367. 2009.

OLIVOTTO, I., CAPRIOTTI, F., BUTTINO, I., AVELLA, A.M., VITIELLO, V., MARADONNA, F., CARNEVALI, O. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarki* larviculture: effects on larval survival and growth. **Aquaculture**, v. 274, p. 347-352. 2008.

OLIVOTTO, I., CARDINALI, M., BARBARESI, L., MARADONNA, F., CARNEVALI, O. Coral reef fish breeding: the secrets of each species. **Aquaculture**, v. 224, p. 69-78. 2003.

PAYNE, M. F., RIPPINGALE, R.J. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes* . **Aquaculture**, v. 201, p. 329-342. 2001.

SANTOS, F.M. **Efeito da densidade de estocagem no cultivo do copépode *Acartia tonsa* e avaliação do seu potencial como alimento vivo na larvicultura do robalo-peva *Centropomus parallelus***. 2005. 57p.Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SARGENT, J.R., HENDERSON, R.J. Lipids. In: **The Biological Chemistry of Marine Copepods**. New York: Corner, E.D.S. & O'Hara, S.C.M., eds, 1986. p. 59–108.

SARGENT, J.R., MCEVOY, L.A., BELL, J.G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, v. 155, p. 117-127. 1997.

SCHIPP, G.R., BOSMANS, J.M.P., MARSHALL, A.J. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia spp.* **Aquaculture**, v. 174, p. 81-88. 1999.

STØTTRUP, J.G., RICHARDSON, K., KIRKEGAARD, E., PIHL, N.J. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. **Aquaculture**, v.52, p. 87-96. 1986.

STØTTRUP, J.G., JENSEN, J. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol**, v. 141, p. 87-105. 1990.

STØTTRUP, J.G. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. **Aquacult. Res**, v. 31, p. 703-711. 2000.

STØTTRUP, J.G. Production and nutritional value of copepods. In: (Eds.), **Live Feeds in Marine Aquaculture**., Oxford, UK: Støttrup, J.G., McEvoy, L.A., 2003. p. 318.

TANG, K.W., DAM, H.G., Phytoplankton inhibition of copepod egg hatching: test of an exudate hypothesis. **Mar. Ecol. Prog. Ser**, v. 209, p. 197-202. 2001.

TAKEUCHI, T., LU, J., YOSHIZAKI, G., SATOH, S. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw Spirulina. **Fish. Sci.**, v. 68, p. 34-40. 2002.

TEIXEIRA, P. F., KAMINSKI S. M., AVILA T. R., CARDOZO A. P., BERSANO, J. G., BIANCHINI, A. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82(2), p. 333-339. 2010.

TOLEDO, J.D., GOLEZ, M.S., DOI, M., OHNO, A. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides* . **Fish. Sci.**, v. 65, p. 390-397. 1999.

TURK, P.E., KREJCI, M.E., YANG, W.T. A laboratory method for the culture of *Acartia tonsa* (Crustacea: Copepoda) using rice bran. **J. Agricult. Aquat. Sci.**, v. 3, p. 25–27. 1982.

VARGAS C., ESCRIBANO, R., POULET, S.A. Phytoplankton food quality determines time-windows for successful zooplankton reproductive pulses. **Ecology**, v. 87, p. 2992–2999. 2006.

VELOZA, A. J., CHU, F.E., TANG, K. W. Trophic modification of essential fatty acids by heterotrophic protists and its effects on the fatty acid composition of the copepod *Acartia tonsa*. **Marine Biology**, v. 148, p.779-788. 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

APEITOS, A.; LOTZ, J.; OGLE, J.; LEMUS, J. The effect of diet on fecundity of *Acartia tonsa*, a calanoid copepod. **The Journal of the Mississippi Academy of Sciences**, v. 49, p. 94. 2004.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J Appl Phycol**, v. 5, p.235-41. 1993.

BELAY, A. The potencial application of *Spirulina*(*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health manangement. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, p.27-48. 2002.

BELL, J.G.; McEVOY, L.A.; ESTEVEZ, A.; SHIELDS, R.J.; SARGENT, J.R. Optimizing lipid nutrition in first-feeding flat fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 211-220. 2003.

BELMONTE, G. The egg morphology of 7 Acartiidae species: a preliminary survey of the ootaxonomy of calanoids. **Journal of Marine Systems**, v. 15, p. 35-39. 1998.

BERGGREEN, U.; HANSEN, B.; KIØRBOE, T. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implic ations for determination of copepod production. **Mar. Biol.**, The effect of diet on fecundity of *Acartia tonsa*, a calanoid copepod. **The Journal of the Mississippi Academy of Science.**, v. 99, p. 341– 352. 1988.

BUJARD, E.U.; BRACO U.; MAURON, J.; MOTTU, F.; NABHOLZ, A., WUHRMANN, J.J.; CLÉMENT, G. Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use in Food Formulations. In: **3rd.international Congress of Food Science and Technology**. Washington, 1970.

CERVETTO, G. **Comparaison de la repartition spatio-temporelle et de l'ecophysiologie de deux especes de copepodes calanoides congeneriques (*Acartia tonsa* et *Acartia clausi*) en milieu cotier et lagunaire (Golfe de Fos, Etang de Berre)**. 1995. 225p. Tese Doutorado. Universite d'Aix-Marseille II, Marselle. 1995.

CHALLEM, J.J.; PASSWATER, R.A.; MINDELL EM.. **Spirulina**. New Canaan, Connecticut: Keats Publishing Inc, 1981.

COWLES, T.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W. Food selection by copepods: Discrimination on the basis of food quality. **Mar. Biol.**, v. 100, p. 41–49. 1988.

DRILLET, G.; FROUËL, S.; SICHLAU, M.H.; JEPSEN, P.M.; HØJGAARD, J.K.; JOARDER, A.K.; HANSEN, B.W. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. **Aquaculture**, v. 315, p. 155-166. 2011.

DUSSART, B.H.; DEFAYE, D. **Introduction to the Copepoda**. Backhuys: Leiden. 2001.

FAO. **A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish**. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations 2008. 25 p.

FYHN, H.J. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy? **Aquaculture**, v. 80, p. 111-12. 1989

FAULK, C.K.; HOLT, G.J. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. **Aquaculture**, v. 249, p. 231– 243. 2005.

HART, P.R.; HUTCHINSON, W.G.; PURSER, G.J. Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*, Gunther, 1862). **Aquaculture**, v. 144, p. 303–311. 1996.

HOLT, G.J., Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), *Marine Ornamental Species: Collection. Culture and Conservation*. Iowa State Press, Ames, IA, p. 251 –254. 2003.

HUMES, A.G. How many copepods? **Hydrobiologia**, v. 292-293, p. 1–7. 1994.

KAHAN, D.; UHLIG, G.; SCHWENZER, D.; HOROWITZ, L. A simple method for cultivating harpacticoid copepods and offering them to fish larvae. **Aquaculture**, v. 26, p. 303–310. 1982.

KIØRBOE, T.; SAIZ, E.; VIITASALO, M. Prey switching behavior in the planktonic copepod *Acartia tonsa*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 143, p. 65–75. 1996.

KLEIN BRETELER, W.C.M.; FRANZ, H.G.; GONZALEZ, S.R. Growth and development of four calanoid copepod species under experimental and natural conditions. **Neth. J. Sea Res.**, v. 16, p. 195–207. 1982.

KNUCKEY, R.M.; SEMMENS, G.L.; MAYER, R.J.; RIMMER, M.A. 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**, v. 249, p. 339 – 351. 2005.

LEANDRO, S.M.; QUEIROGA, H.; RODRIGUEZ-GRANA, L.; TISELIUS, P. Temperature-dependent development and somatic growth in two allopatric populations of *Acartia clausi* (Copepoda: Calanoida). **Mar. Ecol., Prog. Ser.**, v. 322, p. 189-197. 2006.

LEGER, G.R.; BENGSTON, D.A.; SIMPSON, K.L.; SORGELOOS, P. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.**, v. 24, p. 521–623. 1986.

LEMUS, J.T.; OGLE, J. T.; LOTZ, J. M. Extensive copepod culture using a highly nutritious natural water source. **World Aquaculture**, v. 33, p. 60-62. 2002.

LIAO, I.; SU, H.M.; CHANG, E.Y. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. **Aquaculture**, v. 200, p. 1-31. 2001.

MAUCLINE, J. **The biology of calanoid copepods**. San Diego: Academic Press, 1998. 710 pp.

MCEVOY, L.A.; NAESS, T.; BELL, J.G.; LIE, Ø. Lipid and fatty acid composition of normal and Eicosapentaenoic acids. **Aquaculture**, v. 180, p. 321 –343. 1998.

MUNILLA-MORAN, R.; STARK, J.R.; BARBOUR, A. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 88, p. 337 – 350. 1990.

NÆSS, T.; LIE, Ø. A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, juveniles: the role of diet. **Aquac. Res.**, v. 29, p. 925 – 934. 1998.

NAVARRO, J.C.; MCEVOY, L.A.; BELL, M.V.; AMAT, F.; HONTORIA, F.; SARGENT, J.R. Effect of different dietary levels of docosahexaenoic acid(DHA, 22:6n-3) on the DHA composition of lipid classes in sea bass larvae eyes. **Aquacult. Int.**, v.5, p. 509–516. 1997.

OGLE, J. T; NICHOLSON, L. C.; LOTZ M. J. Culture of copepod *Acartia tonsa* utilizing various artificial feeds. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 53, p. 234-240. 2002.

OLIVOTTO, I.; CARDINALI, M.; BARBARESI, L.; MARADONNA, F.; CARNEVALI, O., Coral reef fish breeding: the secrets of each species. **Aquaculture**, v. 224, p. 69 –78. 2003.

OLIVOTTO, I.; ZENOBI, A.; ROLLO, A.; MIGLIA RINI, B.; AVELLA, M.; CARNEVALI, O. Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae* . **Aquaculture**, v. 250, p. 175 – 182. 2005.

OLIVOTTO, I.; HOLT, S.A.; CARNEVALI, O.; HOLT, J.G. Spawning, early development and first feeding in the lemonpeel angel fish *Centropyge flavissimus* . **Aquaculture**, v. 253, p. 270 – 278. 2006.

OLIVOTTO, I.; CAPRIOTTI, F.; BUTTINO, I.; AVELLA, A.M.; VITIELLO, V.; MARADONNA, F.; CARNEVALI, O. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects on larval survival and growth. **Aquaculture**, v. 274, p. 347 – 352. 2008.

OLIVOTTO, I.; AVELLA, M.A.; BUTTINO, I.; CUTIGNANO, A.; CARNEVALI, O. Calanoid copepod administration improves yellow tail clown fish (*Amphiprion clarkii*) larviculture: biochemical and

molecular implications. **Aquacult. Aquarium. Conserv. Legislation Bio flux**, v. 2 (3), p. 355–367. 2009.

PAES, E. T. **Nécton Marinho. Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2002. p. 179-193.

PAULY, D.; CHRISTENSEN, V. Primary production required to sustain global fisheries. **Nature**, v. 374, p. 255–257. 1995

PARRISH, K.; WILSON, D. Fecundity studies on *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) in standardized culture. **Mar. Biol.**, v. 46, p. 65–8. 1978.

PAYNE, M. F.; RIPPINGALE, R. J. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. **Aquaculture**, v. 201, p. 329–342. 2001.

PETIPA, T.S. Feeding of the Copepod *Acartia clausi* Giesbrecht. **Proceedings of the USSR AS Sevastopol Biological Station**, v. 11, p. 72-79. 1959.

PHANG, S.M; MIAH, M.S.; CHU, W.L; HASHIM, M. Spirulina culture in digested sago starch factory waste water. **J. Appl. Phycol.**, v. 12, p. 395-400. 2000.

PLANTE, S.; PERNET, F.; HACHÉ, R.; RITCHIE, R.; JI, B.; McINTOSH, D. Ontogenetic variations in lipid class and fatty acid composition of haddock larvae. *Melanogrammus aeglefinus* in relation to changes in diet and microbial environment. **Aquaculture**, v. 263, p.107-121. 2007.

SARGENT, J.R.; HENDERSON, R.J.; TOCHER, D.R. **The lipids**. In: Halver, J. Ed. ,Fish Nutrition. New York: ed. Academic Press, 1989. p. 153–218.

SARGENT, J.R.; MCEVOY, L.A.; BELL, J.G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, v. 155, p. 117–127. 1997.

SARGENT, J.; MCEVOY, L.; ESTEVEZ, A.; BELL, G.; BELL ,M.; HENDERSON, J.; TOCHER, D. Lipid nutrition of marine fish durin g

early development: current status and future directions. **Aquaculture**, v. 179, p. 217–229. 1999.

SCHIPP, G.R.; BOSMANS, J.M.P.; MARSHALL, A.J. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia spp.* **Aquaculture**, v. 174, p. 81–88. 1999.

SHIELDS, R.J.; BELL, J.G.; LUIZI, F.S.; GARA, B.; BROMAGE, N.R.; SARGENT, J.R. Natural copepods are superior to enriched *Artemia nauplii* as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1186–1194. 1999.

SOMMER, U. Copepod growth and diatoms: insensitivity of *Acartia tonsa* to the composition of semi-natural plankton mixtures manipulated by silicon:nitrogen ratios in mesocosms. **Oecologia**, v. 159(1), p. 207–215. 2009.

SØRENSEN, T.F.; DRILLET, G.; ENGELL-SØRENSEN, K.; HANSEN, B.W.; RAMLØV, H. Production and biochemical composition of eggs from neritic calanoid copepods reared in large outdoor tanks (Limfjord, Denmark). **Aquaculture**, v. 263, p. 84–96. 2007.

STØTTRUP, J.G.; RICHARDSON, K.; KIRKEGAARD, E.; PIHL, N.J. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 52, p. 87–96. 1986.

STØTTRUP, J.G. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. **Aquacult. Res.**, v. 31, p. 703–711. 2000.

STØTTRUP, J.G. **Production and nutritional value of copepods.** In: Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. 2003.

STØTTRUP, J.G.; NORSKER, N.H. Production and use of copepods in marine fish larviculture. **Aquaculture**, v. 155, p. 231–247. 1997.

TAKEUCHI, T.; ARAKAWA, T.; IMAIZUMI, K.; SEKIYA, T.; KITAJIMA, C. Comparison between eicosapentanoic and docosahexanoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in

juvenile striped jack *Pesudocaranx dentex*. **Nippon Suisa Gakkaishi**, Tokyo, v.55(11), p. 1989-1995. 1989.

TISELIUS, P.; JONSSON, P.R. Foraging behaviour of six calanoid copepods: observations and hydrodynamic analysis. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 66, p. 23–33. 1990.

TISELIUS, P.; ANDERSEN BORG, C.M.; HANSEN, B.W.; HANSEN, P.J.; NIELSEN, T.G.; VISMANN, B. High reproduction, but low biomass: mortality estimates of the copepod *Acartia tonsa* in a hyper-entrophic estuary. **Aquatic Biology**, v. 2, p. 93-103. 2008.

TOLEDO, J.D.; GOLEZ, M.S.; DOI, M.; OHNO, A. Use of copepod nauplii during early feedingstage of grouper *Epinephelus coioides*. **Fish. Sci.**, v. 65, p. 390–397. 1999.

TURK, P.E.; KREJCI, M.E.; YANG, W.T. A laboratory method for the culture of *Acartia tonsa* (Crustacea: Copepoda) using rice bran. **J. Agricult. Aquat. Sci.**, v. 3, p. 25–27. 1982.

WATANABE, T. **Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish**. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), Larvi'91-Fish and crustacean Larviculture symposium. European Aquaculture Society, special publication. Belgium: Gent, 1999. p: 19.

WILLIAMS, T.D.; JONES, M.B. Effects of temperature and food quantity on postembryonic development of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 183, p. 283–298. 1994.

ANEXO – ILUSTRAÇÕES

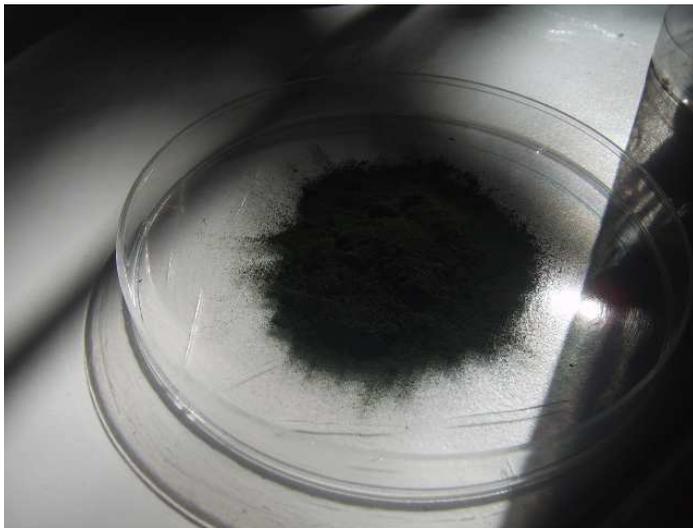


Figura 1 – Espirulina liofilizada

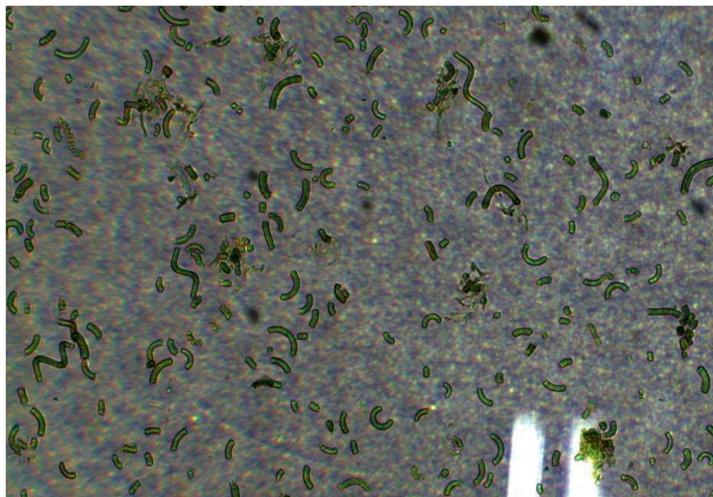


Figura 2 – Partículas de espirulina após processamento no liquidificador.

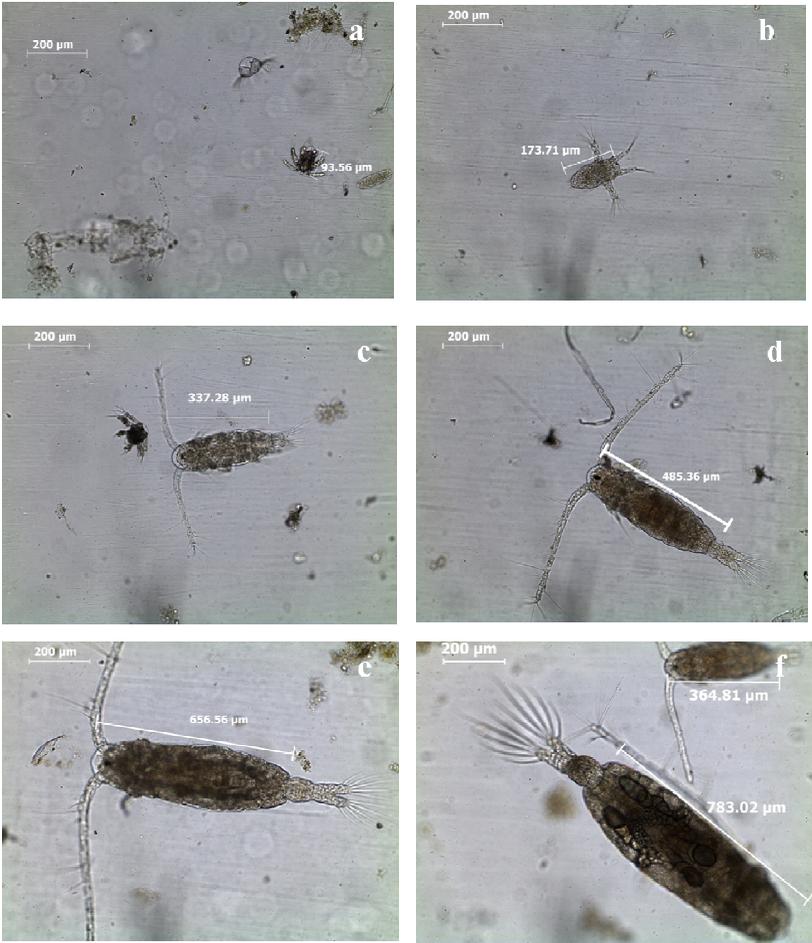


Figura 3 – Diferentes estágios de desenvolvimento de *A. tonsa*. Letras a, b: náuplios; c, d: copepoditos; e, f: fêmea adulta.