



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

**Efeito da pigmentação de rotíferos *Brachionus* sp. na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Mônica Yumi Tsuzuki

CRISTIELLI SORANDRA ROTTA

Florianópolis – SC  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rotta, Cristielli Sorandra

Efeito da pigmentação de rotíferos *Brachionus* sp. na  
larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii* /  
Cristielli Sorandra Rotta ; orientador, Mônica Yumi  
Tsuzuki - Florianópolis, SC, 2014.

54 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Alimento vivo. 3. Astaxantina. 4.  
Metamorfose. 5. Sobrevivência. I. Yumi Tsuzuki, Mônica .  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Efeito da pigmentação de rotíferos *Brachionus* sp. na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*.**

Por

CRISTIELLI SORANDRA ROTTA

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 Aquicultura.

---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

---

Dra. Mônica Yumi Tsuzuki – *Orientadora*

---

Dra. Débora Machado Fracalossi

---

Dr. Evoy Zaniboni Filho

---

Dr. Ronaldo Olivera Cavalli



Dedico este trabalho à pessoa mais especial desse mundo, minha mãe, Lourdes Sibila, que sempre me incentivou e me encorajou, e nunca me deixou esquecer de que “não existem problemas sem soluções”.



## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que tornaram possível a realização deste trabalho:

À minha orientadora, professora Mônica, pela oportunidade que me deu de trabalhar com piscicultura ornamental e por toda a parceria e apoio dos últimos dois anos.

Ao eterno técnico do Lab. e quase um pai da galera, Antonio Sayão. Com ele aprendi na prática tudo que os livros de aquicultura ensinam, e comi os melhores churrascos.

Ao meu colega, amigo e namorado Maik, que foi também meu professor de estatística e revisor do trabalho, mas acima de tudo, foi meu porto seguro quando o desânimo batia, e aguentou firme a minha falta de humor nessas horas.

Ao meu colega, amigo e hoje irmão, Raoani (estepô), pela parceria sem igual que teve nesses dois anos, desde quando dividiu o “teto” comigo quando ainda não tínhamos bolsa, pelas noites no lab. esperando larvas eclodirem e também, por todas as contagens de algas e rotíferos.

À minha colega, amiga e conselheira Dani, por toda a ajuda durante o mestrado, mas acima de tudo, pela amizade que aqui começou, e espero que dure pra sempre.

Aos amigos e colegas da Pós e do lab., Renata e Wesley, pela parceria e amizade de sempre, mas também pela paciência que tiveram me aturando todos os dias.

As colegas da Pós e amigas, Alexandra e Cristina, por toda ajuda com os dados, e ao Tatu (LMM), pela ajuda nas fotos do experimento piloto.

Aos colegas do lab., Daner, Yuri (piá de prédio), Caro (colombiana), Marina, Morgana, Ana Cris e Paulo, por todos os tanques sifonados e pelos bons momentos compartilhados.

Também à Redna, nova e antiga técnica, pelo seu bom humor e pelas jabuticabas. A Renata (técnica), foram poucos momentos juntas, mas sempre tinha uma palavra carinhosa e de incentivo.

Ao querido secretario do programa, Carlito, por toda ajuda e pela imensa paciência que sempre teve com a gente.

À “nossa” Sassá (Salete), que nos mantém acordados com o melhor café e organiza nossa bagunça.

Aos meninos da “309”, parceiros de todas as horas: Emílio, Titi e o Gabriel (sempre me perguntando “quantas páginas Cris?”).

Por fim, a UFSC pelo ótimo programa de pós-graduação, e a CAPES, por financiar este estudo.

## RESUMO

A visão tem importância destacada para as larvas de peixes, já que a maioria são predadoras visuais. Porém, existem poucos trabalhos sobre a importância do aumento do contraste presa-predador na alimentação de peixes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência, o crescimento e a metamorfose de larvas de peixe-palhaço *Amphiprion clarkii* alimentadas com rotíferos *Brachionus* sp. pigmentados. Foram utilizados quatro tratamentos em triplicata, durante oito dias na larvicultura deste peixe: TA- rotíferos pigmentados com astaxantina; TAN- rotíferos pigmentados com astaxantina e a microalga *Nannocloropsis oculata*; TN- rotíferos pigmentados com *N. oculata* e TCA- rotíferos pigmentados com corante alimentício vermelho. A temperatura foi de 26°C e a salinidade de 25. Para o crescimento, o peso em TA foi significativamente maior ( $5,9 \pm 0,5$  mg; média  $\pm$  Erro Padrão) que TCA ( $4,4 \pm 0,43$  mg), porém não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Os maiores comprimentos totais encontrados foram no TA ( $7,9 \pm 0,15$  mm) e TAN ( $7,7 \pm 0,19$  mm), diferindo somente do TCA ( $7,2 \pm 0,21$  mm). Em relação à sobrevivência, o valor de TAN ( $72,6 \pm 1,52\%$ ) foi maior somente quando comparado com TCA ( $46,7 \pm 0,42\%$ ). TAN foi o tratamento onde foram observadas as primeiras larvas em processo de metamorfose (4° DAE) e no TCA este processo iniciou-se apenas no 8° DAE. No final do experimento, no TAN,  $11,8 \pm 0,91\%$  das larvas estavam metamorfoseadas, seguido de TA ( $8,0 \pm 0,58\%$ ), TN ( $5,6 \pm 0,75\%$ ) e TCA ( $1,1 \pm 0,23\%$ ). O uso do corante, apesar de pigmentar os rotíferos, não mostrou resultados positivos para nenhum dos parâmetros avaliados. Conclui-se que o uso da astaxantina não afetou de forma significativa o crescimento em peso e comprimento e a sobrevivência de larvas de *A. clarkii* em relação à microalga. Entretanto, acelerou o desenvolvimento, sendo que o início do processo de metamorfose foi influenciado pelo uso da astaxantina isolada ou conjuntamente com a microalga.

**Palavras-chave:** 1. Alimento vivo. 2. Astaxantina. 3. Crescimento. 4. Metamorfose. 5. Sobrevivência.



## ABSTRACT

Vision has an outstanding importance for fish larvae, since most of these are visual predators. Few studies have focused on the importance of increasing the contrast between predator and prey at fish feeding. In this way, the objective of this study was to evaluate general performance (survival, growth and metamorphosis) of larvae of the clownfish *Amphiprion clarkii* fed pigmented rotifers *Brachionus sp.* Four treatments were tested in triplicate for eight days during the larviculture of this fish: TA- rotifers pigmented with astaxanthin; TAN – rotifers pigmented with astaxanthin and microalgae *Nannocloropsis oculata*; TN - rotifers pigmented with *N. oculata* and TCA- rotifers pigmented with synthetic red dye. Temperature was kept at 26 ° C and salinity at 25. Regarding growth given as weight, the value at TA was significantly higher ( $5.9 \pm 0.5\text{mg}$ , mean  $\pm$  SE) than at TCA ( $4.4 \pm 0.43\text{mg}$ ), although not different from the other treatments ( $P > 0.05$ ). The greatest total lengths were observed at TA ( $7.9 \pm 0.15\text{mm}$ ) and at TAN ( $7.7 \pm 0.19\text{mm}$ ), differing only from TCA ( $7.2 \pm 0.21\text{mm}$ ). Increased survival rate was obtained at TAN ( $72.6 \pm 1.52\%$ ) compared only to TCA ( $46.7 \pm 0.42\%$ ). TAN was the treatment where the first larvae in the metamorphosis process were observed (4° DAH) and at the TCA, this process started only at the 8th DAH. At the end of the experiment,  $11.8 \pm 0.91\%$  of the larvae were metamorphosed in TAN, followed by TA ( $8.0 \pm 0.58\%$ ), TN ( $5.6 \pm 0.75\%$ ) and TCA ( $1.1 \pm 0.23\%$ ). The use of the dye, although pigmented the rotifers, did not show positive results for the parameters evaluated. It is concluded that astaxanthin did not affect significantly growth rates and survival of *A. clarkii* larvae in relation to the use of microalgae. However, the beginning of the metamorphosis process was influenced by the use of astaxanthin alone or in conjunction with microalgae.

**Keywords:** 1. Astaxanthin. 2. Growing. 3. Live food. 4. Metamorphosis. 5. Survival.



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
Produção de peixes ornamentais marinhos .....	15
Peixe-palhaço <i>Amphiprion clarkii</i> .....	15
Larvicultura de peixes marinhos: dificuldades.....	17
Importância do alimento vivo para alimentação e nutrição das larvas de peixes marinhos .....	17
Fatores abióticos que influenciam a taxa de predação pelas larvas. ....	18
Carotenoides e astaxantina .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
Objetivo geral .....	22
Objetivos específicos. ....	22
<b>Efeito da pigmentação de rotíferos <i>Brachionus sp.</i> na     larvicultura do peixe-palhaço <i>Amphiprion clarkii</i>.</b> .....	<b>23</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>23</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
2.1. Manutenção dos Reprodutores e Origem das Larvas .....	25
2.2. Delineamento Experimental. ....	26
2.3. Cultivo e Pigmentação dos Rotíferos .....	27
2.4. Avaliação do Crescimento, Sobrevivência e Metamorfose Larval .....	28
2.5. Análise Estatística .....	29
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
3.1. Pigmentação dos Rotíferos e Consumo pelas Larvas de <i>A.</i> <i>clarkii</i> .....	29
3.2. Metamorfose e Sobrevivência Larval.....	31
3.3. Crescimento Larval .....	33

<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>48</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

### Produção de peixes ornamentais marinhos

Atualmente, a piscicultura ornamental marinha é uma das atividades que mais cresce dentro da aquicultura (KODAMA et al., 2011), assumindo uma posição destacada no mercado internacional (RIBEIRO et al., 2007).

Mais de 84 espécies de peixes ornamentais são criadas mundialmente e destas, 26 pertencem à família Pomacentridae (ARVEDLUND et al., 2000), a qual pertencem os peixes-palhaço. No cenário mundial da aquicultura, as diversas espécies de peixes-palhaço são cultivadas desde 1950 e atualmente são intensamente comercializadas (WITTENRICH, 2007). A espécie *Amphiprion ocellaris* é o peixe ornamental com maior demanda, representando mais de 15% do valor total de exportação mundial (WABNITZ et al., 2003). Peixes-palhaço apresentam diversas características favoráveis a sua produção em cativeiro, como o alto valor de mercado e o domínio da tecnologia de cultivo (HOFF, 1996). No Brasil, é um dos poucos peixes ornamentais marinhos cultivados.

O Brasil é um dos cinco maiores exportadores de peixes para aquariofilia e a partir do final dos anos 90, houve um aumento considerável no interesse em organismos ornamentais marinhos (GASPARINI, 2005). Nos últimos anos, a movimentação financeira do comércio ornamental no país foi de mais de cinco milhões de dólares ao ano (IBAMA, 2008). Este mercado, no entanto, ainda está em desenvolvimento e atualmente constitui uma alternativa de geração de renda para pequenos produtores, levando em consideração que o cultivo de peixes ornamentais utiliza pequenas áreas e gera produtos com alto valor de mercado (KODAMA et al., 2011). Neste sentido, existe a necessidade da realização de pesquisas que objetivem otimizar a produtividade dos cultivos, através do aumento do desempenho zootécnico das espécies comercializadas.

### Peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*

Os peixes-palhaço são peixes recifais originários do Indo-Pacífico, que pertencem à família Pomacentridae, que é composta por

30 espécies, sendo 29 do gênero *Amphiprion* e somente uma do gênero *Premnas* (THORNHILL, 2012).

A espécie *Amphiprion clarkii* (Figura 1) é muito popular em aquários domésticos, principalmente devido a sua resistência e coloração característica, podendo ser amarela, marrom ou até mesmo próxima ao negro (MATIAS, 2011). Os exemplares adultos possuem de duas a três bandas de coloração branca ou acinzentadas perpendiculares ao corpo. Assim como diversas espécies de peixes-palhaço, vive associada a anêmonas. São hermafroditas protândricos e vivem em grupos sociais em que há uma dominância baseada no tamanho corporal, onde o maior animal do grupo geralmente é uma fêmea e os restantes são machos. Na ocasião da remoção desta fêmea, o maior macho do grupo sofre inversão sexual para ocupar a posição de dominante (KOBAYASHI et al., 2010; LE et al., 2011).



Figura 1. Exemplar adulto da espécie *Amphiprion clarkii* (fonte Google imagens).

Esta espécie é muito territorialista, agressiva e possui um apetite voraz. Seus ovos são demersais e aderidos ao substrato, sendo que a fecundação e o desenvolvimento ocorrem no meio externo. A fecundidade desta espécie varia de quatrocentos até mil e quinhentos ovos, que permanecem aos cuidados do macho durante a incubação. As larvas de *A. clarkii* apresentam comportamento voraz e iniciam a alimentação exógena logo após a eclosão (WILKERSON, 2003).

Apesar de ser um peixe altamente comercializado no mercado da aquariofilia, estudos que melhorem o seu desempenho zootécnico ainda são necessários, possibilitando assim, melhores taxas de crescimento e sobrevivência.

## **Larvicultura de peixes marinhos: dificuldades**

O desenvolvimento da aquicultura depende da obtenção de formas jovens, sendo que um dos fatores considerados mais importantes para o sucesso da etapa de larvicultura é a alimentação. O início da alimentação exógena é um processo muito importante para as larvas de peixes marinhos e constitui um dos períodos mais críticos da larvicultura (ALVAREZ-LAJONCHERE e MOLEJÓN, 2001).

A fase larval implica em muitas transformações. O tamanho da boca das larvas é pequeno para aceitar com facilidade qualquer tipo de alimento, e a maioria das espécies cultivadas são muito frágeis logo após a eclosão (CONCEIÇÃO et al., 2007). Além disso, larvas não apresentam um sistema digestório completamente formado na primeira alimentação ou no início da alimentação exógena (DABROWSKI, 1984). Desta forma, as transformações fisiológicas e anatômicas durante o desenvolvimento larval possuem necessidades nutricionais específicas (CIVERA et al., 2004). Apesar da determinação das exigências nutricionais das larvas ser uma tarefa bastante complexa, acredita-se que as formulações ótimas para as larvas devem simular a composição do vitelo (RAINUZZO et al., 1997), e maiores taxas de crescimento e melhor qualidade larval são obtidas com a utilização do zooplâncton como alimento inicial das larvas de peixes (PORTELLA et al., 2012).

### **Importância do alimento vivo para alimentação e nutrição das larvas de peixes marinhos**

O zooplâncton constitui o alimento essencial para a produção de larvas de peixes marinhos, pois fornecem aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (WATANABE et al., 1983). O alimento vivo também pode estimular as larvas de peixes na predação, já que evolutivamente as espécies se adaptaram a capturar presas em movimento e, além disto, o zooplâncton pode ser mais palatável do que as rações comerciais, apresentando também um nível maior de umidade, o que pode facilitar a aceitação do alimento pelas larvas (BENGTSON, 2003).

Apesar do desenvolvimento de muitas pesquisas para substituir o alimento vivo pelo inerte, a fase de larvicultura de peixes marinhos ainda depende exclusivamente do zooplâncton (KOVEN et al., 1990) que, segundo Portella et al., (2012) são organismos fundamentais para a

alimentação inicial das larvas, garantindo assim seu rápido desenvolvimento.

Para selecionar os organismos vivos que serão utilizados na larvicultura, alguns fatores devem ser considerados, como o tamanho adequado, valor nutritivo e facilidade de cultivo em grande escala (BARROS e VALENTI, 2003). O rotífero *Brachionus sp.* atende à estas exigências e tem sido muito utilizado como alimento vivo para larvas de peixes marinhos (WATANABE et al., 1983). Este organismo é indispensável na larvicultura de uma grande quantidade de peixes devido ao seu pequeno tamanho (120 - 300  $\mu\text{m}$ ), reduzida mobilidade, permanência na coluna d'água e facilidade de manejo em termos de assimilação de dietas enriquecedoras (GILIBERTO e MAZZOLA, 1981; SORGELOOS e LÉGER, 1992), servindo assim como veículo de substâncias nutricionalmente ricas.

Muitas técnicas de enriquecimento são utilizadas para aumentar a qualidade nutricional dos rotíferos (WHYTE e NAGATA, 1990; CARIC et al., 1993). Diversas pesquisas foram realizadas com o uso de emulsões de lipídios, microalgas e várias dietas inertes (MOURENTE et al., 1993; KOSTOPOULOU et al., 2006). Entretanto, são poucos os estudos que investigam o uso de substâncias que modifiquem a coloração natural dos rotíferos, como forma de aumentar a atratividade para as larvas de peixes.

### **Fatores abióticos que influenciam a taxa de predação pelas larvas**

Larvas de peixes marinhos são predadoras visuais e o sucesso da alimentação das mesmas depende do fornecimento de um alimento adequado, das condições do meio de cultivo e da visualização e da densidade correta da presa (INA et al., 1979). Pesquisas obtiveram resultados positivos quando melhoraram a visualização do alimento para aumentar o consumo e a sobrevivência dos peixes (DENDRINOS et al., 1984; MERIGHE et al., 2004). Entretanto, o aumento do contraste entre a presa e o predador, facilitando a captura do alimento vivo pelas larvas é um fator que pode ser ainda melhor explorado na larvicultura de peixes marinhos.

A percepção do alimento é condicionada pela capacidade visual da larva, produzida pela acuidade visual, pelos limites de visão e pela cor e contraste sobre o fundo (BLAXTER, 1968; DURAY et al., 1996). Neste sentido, a manipulação das condições ambientais pode desempenhar um papel fundamental para o desenvolvimento de protocolos de cultivo para larvas de peixes (CESTAROLLI, 2005), pois

além da disponibilidade de alimento, a detecção é importante para que ocorra a sua captura (WEINGARTNER e ZANIBONI FILHO, 2004).

A visão tem um papel decisivo nos primeiros estágios de vida da maioria dos peixes teleósteos, sendo a fase em que ocorre o desenvolvimento do olho e o estabelecimento da visão funcional essencial para percepção do alimento (GERKING, 1994). Segundo Blaxter (1986), os olhos das larvas de peixes são funcionais e pigmentados já na primeira alimentação. O olfato e o gosto também se desenvolvem cedo, da eclosão até os 16 dias (IWAI, 1980). Segundo Levine e MacNichol (1982), os olhos dos peixes possuem cones que permitem discriminar cores. Tamura e Niwa (1967) investigaram a sensibilidade espectral e a capacidade de diferenciação das cores para diversas espécies de peixes. Estes autores descobriram que dentre os peixes marinhos estudados, a tainha *Mugil cephalus* possui melhor capacidade de visão das cores, talvez pelo fato de habitar a superfície da água, onde a incidência de luz solar é maior. Já o pargo negro *Mylio macrocephalus* adulto, assim como alguns elasmobrânquios, é daltônico.

Apesar das larvas de peixes utilizarem a visão como principal órgão sensorial na alimentação (ANDRADE et al., 2004), existem poucos trabalhos sobre a importância do aumento do contraste presa-predador na alimentação de peixes (MERIGHE et al., 2004). Ostrowski (1989) relata que a cor do tanque de cultivo é o fator que mais afeta as taxas de sobrevivência em larvas do dourado marinho *Coryphaena hippurus*. Muitos trabalhos utilizam a cor do tanque (cor das paredes e do fundo) e a intensidade luminosa para obter melhores resultados de crescimento e sobrevivência (HOWELL, 1979; MATSUDA et al., 1987; OSTROWSKI, 1989; RIEGER e SUMMERFELT, 1997; PEDREIRA e SIPAÚBA-TAVARES, 2001; SOARES et al., 2001; FARIA et al., 2001; GIWOJNA, 2002; RODRIGUES et al., 2009; MATIAS, 2011). Paredes negras e fundo claro incrementam a capacidade de visão das larvas e facilitam a observação das mesmas pelo produtor (OSTROWSKI, 1989).

Entretanto, ainda são escassas pesquisas que aumentem o contraste através do próprio alimento vivo, melhorando a visualização da presa para as larvas de peixes. Neste sentido, a pigmentação de rotíferos para posterior alimentação das larvas, poderia ser uma ferramenta importante para atingir este objetivo.

## Carotenoides e astaxantina

Carotenoides são pigmentos naturais, com coloração variando do amarelo ao vermelho intenso, e são sintetizados pelas frutas, vegetais, algas, fungos e bactérias (STAHL e SIES, 2003). Aproximadamente 600 carotenoides já foram identificados na natureza. Segundo Stahl e Sies (2003), além dos efeitos antioxidantes, esses compostos podem atuar também através de outros mecanismos como regulação do crescimento celular, modulação da expressão gênica e resposta imune.

Segundo Odeberg et al., (2003) a biodisponibilidade dos carotenoides é baixa, devido a estes compostos serem lipofílicos, o que pode limitar sua dissolução pelos fluidos gastrointestinais. A lipofilicidade desses compostos também influencia sua absorção, transporte e excreção no organismo. Desta forma, sua absorção intestinal e biodisponibilidade são facilitadas quando administrados juntamente com compostos lipídicos. Segundo Wathene et al. (1998) a composição da dieta e a temperatura da água são fatores que também afetam a digestibilidade dos carotenoides.

Dentre os carotenoides, a astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) pode influenciar a qualidade dos ovos e larvas em diversas espécies de peixes (WATANABE e MIKI, 1993). Para o *Amphiprion sebae*, a mobilização ativa de carotenoides da dieta de reprodutores para os ovos ocorre em um curto período de tempo (menos de 48 h), indicando a importância deste pigmento para a qualidade dos ovos e larvas da espécie (VARGHESE et al., 2009). Outros autores também relataram a mobilização dos carotenoides para os ovários e posteriormente para as larvas (CHOUBERT et al., 1998). A astaxantina é um pigmento carotenóide do grupo das xantofilas. Segundo Miki (1991), a configuração química diferenciada da astaxantina seria a responsável pela sua elevada capacidade antioxidante, que chega a ser de 100 a 500 vezes maior que outras moléculas antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno. Na forma pura, apresenta-se como um pó fino de coloração alaranjada escura.

Naturalmente, a astaxantina ocorre em algumas algas, bactérias, peixes e frutos do mar, sendo responsável pela coloração laranja-avermelhada dos mesmos. É o principal pigmento carotenóide encontrado em animais aquáticos como o camarão, o salmão, a truta e a lagosta. Entretanto, os animais não conseguem sintetizar carotenoides, necessitando da suplementação deste nutriente na dieta. Mesmo o

salmão selvagem e a truta se não consumissem carotenoides na alimentação, teriam a coloração do músculo esbranquiçada, (SIGURGISLADOTTIR et al., 1994).

Nos animais aquáticos, além de conferir pigmentação, a astaxantina possui funções de proteção contra a oxidação de ácidos graxos e colesterol, proteção contra a radiação UVA e aumento da sobrevivência, entre outros papéis, como na reprodução (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). Este carotenoide é bastante utilizado na alimentação de pós-larvas de camarões cultivados, aumentando sua resistência a vários estresses ambientais (CHIEN et al., 2003). Vários carotenoides são encontrados nos camarões, porém, a astaxantina é o principal deles (TORRISSEN et al., 1989).

O uso de carotenoides na dieta de peixes ornamentais ocorre principalmente na fase juvenil, sendo adicionados na ração. Segundo Ho et al. (2013), as concentrações de astaxantina que apresentaram os melhores resultados na coloração de juvenis de *Amphiprion ocellaris* (30 DAE), variaram entre 80 e 160 mg. kg<sup>-1</sup> na ração. Porém, estes mesmos autores afirmam que a formulação e a concentração mínima ideal para uma boa coloração do *A. ocellaris* não foram definidas até o momento.

Apesar dos benefícios já conhecidos dos carotenoides para os peixes marinhos, a maioria das pesquisas é voltada para animais adultos e praticamente todas se referem ao uso destes pigmentos somente na ração, durante a fase de engorda. São poucos os trabalhos realizados que avaliaram o efeito dos carotenoides como suplemento alimentar, ou como forma de alterar a cor do alimento vivo, aumentando assim sua visualização pelas larvas de peixes. Sendo assim, pesquisas que investiguem o uso de carotenoides na fase larval de peixes marinhos utilizando o zooplâncton, podem esclarecer os benefícios destes compostos nesta fase de cultivo, principalmente em relação ao aumento da atratividade do alimento vivo para as larvas de peixes marinhos.

Este trabalho será submetido ao Journal of the World Aquaculture Society.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

- Avaliar o desempenho zootécnico de larvas do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii* alimentadas com rotíferos *Brachionus sp.* pigmentados.

### **Objetivos específicos**

- Avaliar o crescimento larval até o 8º dia após eclosão;
- Quantificar o início do processo de metamorfose;
- Determinar a taxa de sobrevivência larval.

## ARTIGO

### Efeito da pigmentação de rotíferos *Brachionus* sp. na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*.

#### Resumo

A visão tem importância destacada para as larvas de peixes, já que a maioria são predadoras visuais. Porém, existem poucos trabalhos sobre a importância do aumento do contraste presa-predador na alimentação de peixes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência, crescimento e metamorfose de larvas de peixe-palhaço *Amphiprion clarkii* alimentadas com rotíferos *Brachionus* sp. pigmentados. Foram utilizados quatro tratamentos em triplicata, durante oito dias na larvicultura deste peixe: TA- rotíferos pigmentados com astaxantina; TAN- rotíferos pigmentados com astaxantina e a microalga *Nannocloropsis oculata*; TN- rotíferos pigmentados com *N. oculata* e TCA- rotíferos pigmentados com corante alimentício vermelho. A temperatura foi de 26°C e a salinidade de 25. Para o crescimento, o peso em TA foi significativamente maior ( $5,9 \pm 0,5$  mg; média  $\pm$  Erro Padrão) que TCA ( $4,4 \pm 0,43$  mg), porém não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Os maiores comprimentos totais encontrados foram no TA ( $7,9 \pm 0,15$  mm) e TAN ( $7,7 \pm 0,19$  mm), diferindo somente do TCA ( $7,2 \pm 0,21$  mm). Em relação à sobrevivência, o valor de TAN ( $72,6 \pm 1,52\%$ ) foi maior somente quando comparado com TCA ( $46,7 \pm 0,42\%$ ). TAN foi o tratamento onde foram observadas as primeiras larvas em processo de metamorfose (4° DAE) e no TCA este processo iniciou-se apenas no 8° DAE. No final do experimento, no TAN,  $11,8 \pm 0,91\%$  das larvas estavam metamorfoseadas, seguido de TA ( $8,0 \pm 0,58\%$ ), TN ( $5,6 \pm 0,75\%$ ) e TCA ( $1,1 \pm 0,23\%$ ). O uso do corante, apesar de pigmentar os rotíferos, não mostrou resultados positivos para nenhum dos parâmetros avaliados. Conclui-se que o uso da astaxantina não afetou de forma significativa o crescimento em peso e comprimento e a sobrevivência de larvas de *A. clarkii* em relação à microalga. Entretanto, acelerou o desenvolvimento, sendo que o início do processo de metamorfose foi influenciado pelo uso da astaxantina isolada ou conjuntamente com a microalga.

**Palavras-chave:** 1. Alimento vivo. 2. Astaxantina. 3. Crescimento. 4. Metamorfose. 5. Sobrevivência.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da aquicultura depende da obtenção de formas jovens de organismos e um dos fatores considerados mais importantes para o sucesso da larvicultura é a alimentação. Apesar do desenvolvimento de pesquisas para substituir o alimento vivo pelo inerte, a fase larval de peixes marinhos ainda depende exclusivamente do zooplâncton (Koven et al. 1990) e o rotífero *Brachionus* sp. é um dos principais alimentos utilizados nesta fase inicial de cultivo (Watanabe et al. 1983). Diversas pesquisas foram realizadas com o uso de emulsões de lipídios, microalgas e dietas inertes para aumentar o valor nutricional dos rotíferos (Watanabe et al. 1983; Sorgeloos e Léger, 1992; Izquierdo et al. 1992, 2000; Mourente et al. 1993; Kostopoulou et al. 2006). Entretanto, são poucos os estudos que investigam o uso de substâncias que modifiquem a coloração natural dos rotíferos, como possível forma de aumentar a atratividade para as larvas de peixes.

O aumento do contraste entre presa e predador é um aspecto que pode ser melhor explorado na larvicultura de peixes. Segundo Weingartner e Zaniboni Filho (2004), além da disponibilidade de alimento, a sua detecção é importante para que ocorra a captura. A visão tem um papel decisivo nos primeiros estágios de vida da maioria dos peixes teleósteos e o desenvolvimento do olho e o estabelecimento da visão funcional, que ocorrem nestas fases, são essenciais para a percepção do alimento (Gerking, 1994). Segundo Blaxter (1986), os olhos das larvas de peixes são funcionais e pigmentados já na primeira alimentação. Assim, muitos trabalhos focam na cor das paredes e do fundo e na intensidade luminosa para obter melhores resultados de crescimento e sobrevivência (Howell, 1979; Matsuda et al. 1987; Ostrowski, 1989; Pedreira e Sipaúba-Tavares, 2001; Soares et al. 2001; Giwojna, 2002; Rodrigues et al. 2009; Matias, 2011). Contudo, apesar das larvas de peixes utilizarem a visão como principal órgão sensorial na alimentação (Andrade et al. 2004), existem poucos trabalhos sobre a importância do aumento da visualização do alimento vivo, através do contraste presa-predador (Merighe et al. 2004). A pigmentação do alimento vivo com substâncias artificiais ou naturais, como os carotenoides, poderia auxiliar neste aumento de contraste. Além disto, os carotenoides também poderiam influenciar na melhora do desempenho zootécnico das larvas.

Carotenoides são pigmentos naturais, com coloração variando do amarelo ao vermelho intenso, sendo sintetizados pelas frutas, vegetais,

algas, fungos e bactérias (Stahl e Sies, 2003). A astaxantina é o principal pigmento carotenoide encontrado em animais aquáticos como o camarão, o salmão, a truta e a lagosta e é um dos carotenoides mais utilizados na aquicultura (Wang et al. 2006). Além de apresentar uma elevada capacidade antioxidante, que chega a ser de 100 a 500 vezes maior que outras moléculas antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno (Miki, 1991), possui funções de proteção contra a oxidação de ácidos graxos, colesterol e radiação UVA, (Higuera-Ciapara et al. 2006). Estas propriedades podem proporcionar o aumento da sobrevivência e crescimento na piscicultura (Torrissen e Christiansen, 1995; Sinha e Asimi, 2007). Os peixes também utilizam os carotenoides para a pigmentação da pele, o que faz com que sejam importantes na aquicultura ornamental (Wang et al. 2006), porém, pouca ênfase tem sido dada ao uso destes compostos na fase larval.

Apesar dos benefícios já conhecidos dos carotenoides para os peixes, a maioria das pesquisas é voltada para juvenis e animais adultos e se refere ao uso destes pigmentos somente na ração, durante a fase de engorda. Assim, estudos que investiguem o uso de carotenoides na larvicultura de peixes marinhos através da suplementação do zooplâncton, podem auxiliar a esclarecer os benefícios destes compostos nesta fase de cultivo, principalmente em relação ao aumento da atratividade para as larvas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar o uso da astaxantina e outros compostos na pigmentação de rotíferos, para aumentar sua visualização pelas larvas do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*, avaliando a sobrevivência e o desempenho larval.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Manutenção dos Reprodutores e Origem das Larvas

Foram utilizadas desovas de um casal de reprodutores de *A. clarkii*, mantido em um tanque rede (1 m<sup>3</sup>) dentro de um tanque de concreto de 8.000l, com água circulando em sistema aberto. A água passava previamente por um filtro de náilon de 100  $\mu$ m, filtro biológico, “Skimmer” e filtro Ultra Violeta (11 w).

Diariamente, mediu-se a temperatura (duas vezes/dia), com um termômetro de mercúrio, esta foi mantida em  $25,9 \pm 0,02$  °C ( $\pm$  erro padrão) por meio de termostato e aquecedor de (6000 watts). A

salinidade foi mensurada uma vez ao dia com refratômetro óptico (Modelo RTS-101 ATC) e manteve-se em  $35 \pm 0,01$ .

O alimento dos reprodutores foi ofertado três vezes ao dia até a saciedade aparente. A dieta consistia de ração comercial TDO<sup>®</sup> (46% proteína bruta, 16% lipídios e 250 ppm de astaxantina), peixes e moluscos frescos e uma pasta preparada a base de pescados (com adição de vitaminas comerciais, óleo de fígado de bacalhau, farinha de peixe e astaxantina natural).

O casal de *A. clarkii* desovava regularmente em um intervalo de aproximadamente 12 dias, em um vaso de cerâmica que também servia como abrigo. A incubação dos ovos era realizada pelo macho durante sete dias. Após este período, a desova foi transferida para um tanque de eclosão.

A eclosão foi realizada em um tanque de fibra de vidro com volume útil de 80 L, com temperatura e salinidade iguais à água em que eram mantidos os reprodutores. Em ambiente natural, as larvas de peixe-palhaço eclodem ao escurecer (Wilkerson, 2003). Para simular esta situação, no fim da tarde, o tanque foi coberto com uma lona por aproximadamente duas horas para que ocorresse a eclosão. Após a eclosão, a salinidade foi reduzida gradativamente (uma parte por hora) até chegar a 25 (salinidade utilizada nas unidades experimentais), uma vez que Le et al. (2009, 2011) obtiveram melhores resultados utilizando esta salinidade para a larvicultura desta espécie.

A transferência das larvas para as unidades experimentais ocorreu 24 h após a eclosão, ou seja, no 1º dia após eclosão (DAE). Para isto, utilizou-se um béquer de 50 ml para capturar as larvas que permaneciam na coluna d'água, e uma pipeta de 25 ml para a captura das larvas que permaneciam no fundo do tanque. Foram transferidas aleatoriamente 67 larvas de *A. clarkii* para cada aquário (6,7 larvas/litro).

## 2.2. Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido do 1º ao 8º DAE, intervalo no qual são utilizados rotíferos no protocolo de larvicultura (adaptado dos trabalhos de Olivotto et al. 2008a, 2008b).

Foram testados quatro tratamentos, em triplicata: TA- rotíferos pigmentados com astaxantina; TAN- rotíferos pigmentados com astaxantina e microalga *Nannochloropsis oculata*; TN- rotíferos pigmentados com *N. oculata* e TCA- rotíferos pigmentados com corante alimentício vermelho.

Utilizou-se a astaxantina natural e corante alimentício para modificar a coloração usual dos rotíferos. A microalga foi utilizada por se tratar do alimento comumente fornecido aos rotíferos na maioria das larviculturas de peixes marinhos. Os rotíferos alimentados com *N. oculata*, normalmente apresentam coloração do trato gastrointestinal levemente esverdeado.

Foram utilizadas 12 unidades experimentais, que consistiam em aquários de vidro com volume útil de 10 L. Cada aquário foi equipado com aeração e aquecedor de 30 watts, ligados a um termostato (Modelo MT 511 RIFULLGAUGE). A temperatura utilizada foi  $26 \pm 0,02$  °C e a salinidade  $25 \pm 0,01$ . A intensidade luminosa empregada foi de 1200 lux e o fotoperíodo de 14 luz:10 escuro. O cultivo foi realizado em “água clara”, ou seja, sem a presença de microalgas nos aquários. No período da manhã, 50% da água de cada aquário era renovada, o volume de água era repostado com o auxílio de um funil, para evitar o revolvimento da água e minimizar o estresse das larvas.

Os rotíferos foram fornecidos de uma a duas vezes ao dia (dependendo do consumo de cada aquário). No período da manhã era ofertado o valor fixo de 20 rotíferos.ml<sup>-1</sup>. No período da tarde, o residual de rotíferos era contabilizado em cada aquário, procurando-se manter a densidade mínima de 20 rot.ml<sup>-1</sup>.

Dois vezes ao dia foram medidas as variáveis salinidade e temperatura, com refratômetro e termômetro digital. A amônia total (NH<sub>3</sub>) e o pH foram monitorado uma vez ao dia com kit comercial de análise (Alcon Labcon<sup>®</sup>). O nitrito (NO<sub>2</sub>) foi mensurado a cada dois dias com este mesmo kit.

### **2.3. Cultivo e Pigmentação dos Rotíferos**

Os rotíferos foram cultivados em caixas de polipropileno com volume útil de 100 L, temperatura de 26°C e salinidade 25, e alimentados com dieta comercial Culture Selco Plus (INVE<sup>®</sup>), a uma concentração diária de 0,5 g por milhão de rotíferos, ofertada quatro vezes ao dia, segundo protocolo do fabricante.

Para pigmentar os rotíferos utilizou-se astaxantina comercial (Bio-Marine<sup>®</sup> - AlgamacAST, EUA), corante alimentício de cor vermelha (Anilina Supercor<sup>®</sup>, Brasil), formulado a base de água destilada e anilina, e microalga *Nannocloropsis oculata*, produzida em laboratório.

A concentração de cada produto para a pigmentação dos rotíferos foi determinada em experimento piloto, onde os rotíferos foram

avaliados quanto à pigmentação ao longo de 2 horas, em intervalos de 15 minutos, onde se encontrou o período de uma hora, para que os rotíferos apresentassem a maior intensidade de pigmentação. Este experimento foi realizado com as mesmas condições de qualidade de água para todos os compostos (salinidade 25 e temperatura 26°C). Os rotíferos foram observados em um microscópio estereoscópio (SZ-CTV Olympus).

As concentrações encontradas foram: TA – 1250 mg de astaxantina diluída em 3 L de água; TAN – 1250 mg de astaxantina diluída em 1 L de água e 2 L de *N. oculata* (100.000 a 150.000 cel. ml<sup>-1</sup>); TCA – 20 ml de corante diluído em 3 litros de água; TN – 3 L de *N. oculata* (100.000 a 150.000 cel. ml<sup>-1</sup>). A pigmentação foi realizada em recipientes de vidros com volume útil de 3,5 L imersos em banho-maria para a manutenção da temperatura. A astaxantina foi filtrada em tela de 100 µm antes de ser fornecida aos rotíferos, para que as partículas do pigmento ficassem com um tamanho mais homogêneo e adequado para o consumo. Os rotíferos foram pigmentados por uma hora, e após este período, foram filtrados em tela de 60 µm antes de serem fornecidos às larvas de *A. clarkii*, para que nenhum pigmento fosse introduzido diretamente nas unidades experimentais. Nos tratamentos que utilizavam astaxantina, os recipientes de vidro foram cobertos por uma lona de plástico escura, já que em sua forma pura, este carotenoide é instável e sensível à luz (Higuera-Ciapara et al. 2006).

#### **2.4. Avaliação do Crescimento, Sobrevivência e Metamorfose Larval**

Para biometria, foram amostradas 20 larvas recém eclodidas e 10 larvas de cada aquário no final do experimento (8 DAE). O crescimento médio diário (mm.dia<sup>-1</sup>) foi calculado através da fórmula:  $(CT_f - CT_i)/t$ . Onde  $CT_f$  é o comprimento total final,  $CT_i$  é o comprimento total inicial, e  $t$  é o tempo de duração do experimento.

O comprimento total das larvas foi medido com um auxílio de um microscópio estereoscópio com escala, e pesou-se cada larva com uma balança analítica com precisão de 0,00001g. No processo de pesagem, foi retirado o excesso de umidade das larvas com papel toalha. No final do experimento, duas larvas de cada aquário, em estágio mais avançado de metamorfose foram fotografadas com auxílio de uma câmera Leica (EZ4HD), acoplada a um microscópio estereoscópio (SZ-CTV Olympus), para visualização da morfologia externa.

Para a realização das biometrias, as larvas foram anestesiadas com benzocaína (Reagen<sup>®</sup>/Brasil) a uma concentração de 5 mg.l<sup>-1</sup>, e sacrificadas pela imersão em água com temperatura em torno de 1°C.

Diariamente, em cada aquário, as larvas mortas foram sifonadas e contabilizadas antes da primeira alimentação (período da manhã) e ao final do dia para verificar as taxas de mortalidade diária e permitir o cálculo da sobrevivência final. A partir do segundo dia de experimento, duas observações diárias (início da manhã e final da tarde) foram realizadas para verificar o aparecimento de larvas iniciando o processo de metamorfose. Este processo consiste na transição da fase larval para a fase juvenil, em que os animais já começam a apresentar características morfológicas similares ao indivíduo adulto da espécie. No caso do *A. clarkii*, esta transição é marcada inicialmente pelo escurecimento das larvas, e posterior início da formação das bandas verticais presentes ao longo do corpo. Neste estudo, foi considerado o aparecimento da primeira banda como o início da metamorfose larval.

## **2.5. Análise Estatística**

Para constatar a ocorrência de diferenças entre os tratamentos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), com probabilidade de 95%. Quando constatada diferença entre médias, aplicou-se o teste de Tukey para comparação, para todos os parâmetros avaliados, com exceção da metamorfose, analisada através do teste Qui-quadrado. As médias de sobrevivência foram transformadas em arco-seno.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Pigmentação dos Rotíferos e Consumo pelas Larvas de *A. clarkii***

Após o período de uma hora de pigmentação nos diferentes tratamentos, os rotíferos apresentaram alterações na sua coloração. A microalga foi a que menos influenciou na mudança de cor dos rotíferos, que apresentavam o trato digestório levemente esverdeado, enquanto que nos demais tratamentos apresentaram coloração do trato avermelhada (Fig.1).

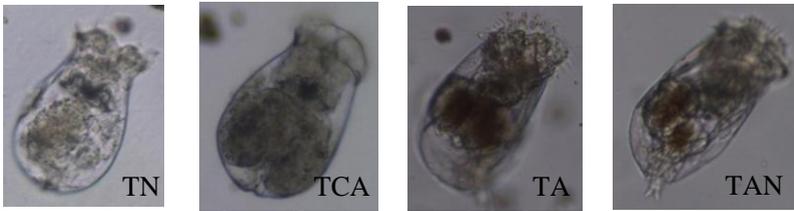


Figura 1. Coloração dos rotíferos após o período de uma hora de pigmentação nos diferentes tratamentos. TN: *N. oculata*; TCA: Corante artificial; TA: Astaxantina e TAN: Astaxantina + *N. oculata*.

No 2° e 3° DAE, o residual de rotíferos encontrado foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) no tratamento TAN (17,4 e 14 rotíferos/ml para 2 e 3 DAE respectivamente) quando comparado ao TN (7,22 e 3 rotíferos/ml). No 7° DAE, o maior valor de residual foi encontrado no TN (13,33 rotíferos/ml) e foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que o residual do TCA (4,33 rotíferos/ml) (figura 2). Entre os demais tratamentos, não houve diferenças ao longo do tratamento.

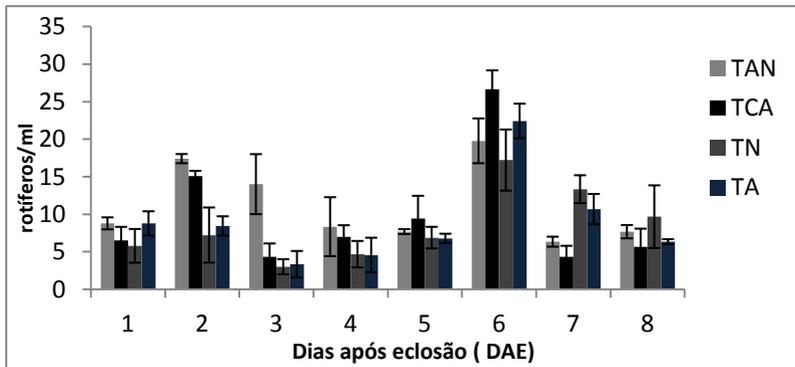


Figura 2. Residual de rotíferos ( $\pm$  erro padrão) dos tratamentos ao longo do experimento. TA: Astaxantina; TAN: Astaxantina + *N. oculata*; TCA: Corante artificial e TN: *N. oculata*.

### 3.2. Metamorfose e Sobrevivência larval

O início do processo de metamorfose ocorreu mais cedo nas larvas alimentadas com rotíferos pigmentados com astaxantina e *N. oculata* - TAN (4 DAE), seguido das larvas do TA (5 DAE). As larvas do TN iniciaram a metamorfose no 6º DAE, enquanto no TCA, apenas no último dia de experimento (8 DAE) observou-se o início deste processo (Fig. 3). No final do experimento, no TAN,  $11,8 \pm 0,91\%$  das larvas haviam sofrido a metamorfose, seguido de TA ( $8,0 \pm 0,58\%$ ), TN ( $5,6 \pm 0,75\%$ ) e TCA ( $1,1 \pm 0,23\%$ ), no entanto, no TAN este valor foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) somente em relação ao TCA (Fig. 4). Ao final do experimento, a taxa média ( $\pm$  Erro Padrão) de sobrevivência no tratamento com astaxantina e microalga - TAN ( $72,6 \pm 1,52\%$ ) - foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) somente quando comparada ao tratamento com corante artificial - TCA ( $46,8 \pm 0,42\%$ ). Não houve diferença significativa entre TAN e os demais tratamentos (TA -  $56,2 \pm 0,91\%$ ; TN -  $62,2 \pm 1,55\%$ ) (Fig. 5).

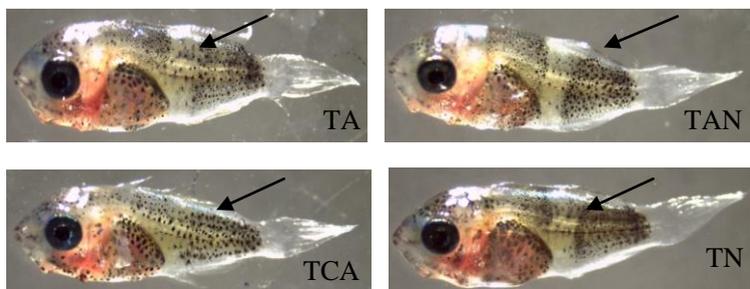


Figura 3. Larvas metamorfoseadas no 8º DAE em cada tratamento. TA: Astaxantina; TAN: Astaxantina + *N. oculata*; TCA: Corante artificial e TN: *N. oculata*. As flechas indicam a formação das bandas, que estão mais acentuadas no tratamento que utilizava astaxantina e *N. oculata* (TAN).

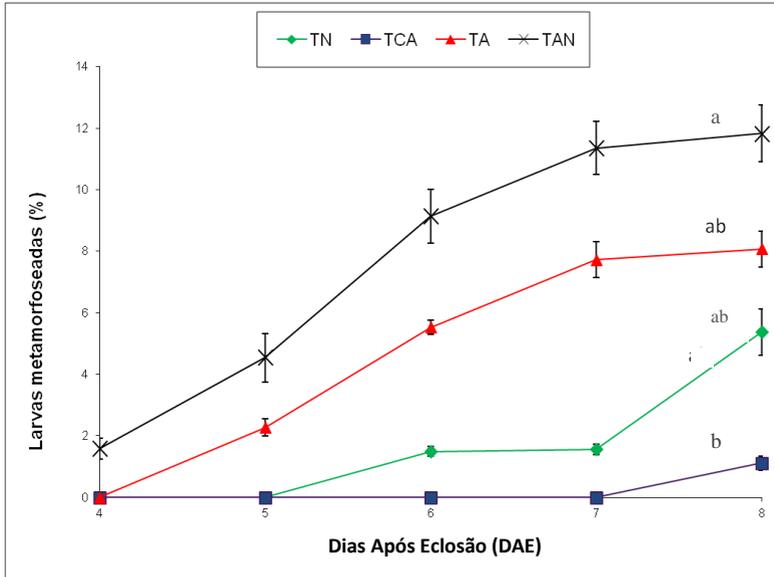


Figura 4. Porcentagem (porcentagem média  $\pm$  EP) de larvas metamorfoseadas ao longo do experimento em relação à sobrevivência diária. TN: *N. oculata*; TCA: Corante artificial; TA: Astaxantina cumulativa e TAN: Astaxantina + *N. oculata*. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

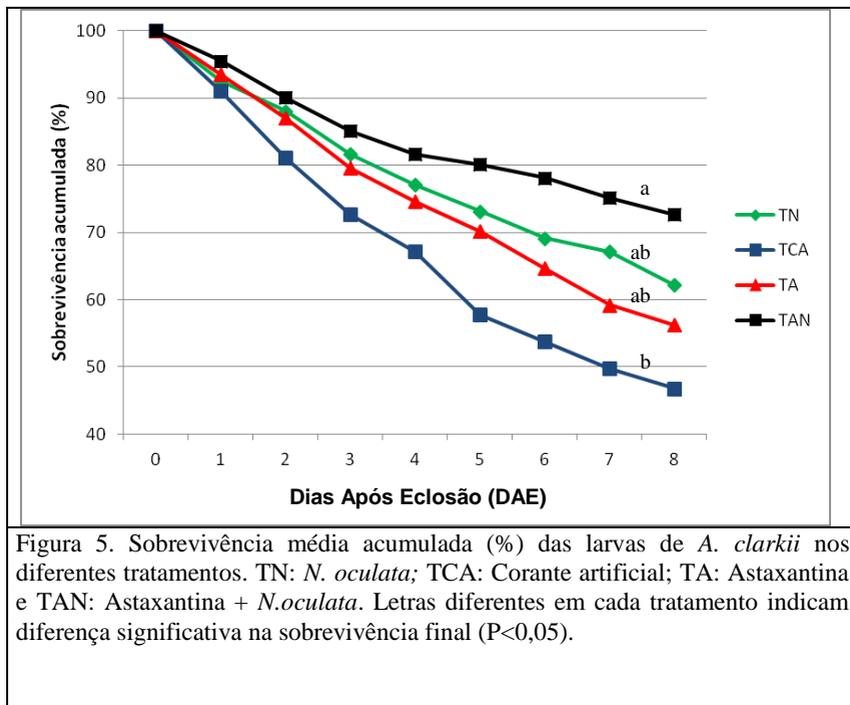


Figura 5. Sobrevivência média acumulada (%) das larvas de *A. clarkii* nos diferentes tratamentos. TN: *N. oculata*; TCA: Corante artificial; TA: Astaxantina e TAN: Astaxantina + *N. oculata*. Letras diferentes em cada tratamento indicam diferença significativa na sobrevivência final ( $P < 0,05$ ).

### 3.3. Crescimento Larval

As larvas recém eclodidas tiveram médias ( $\pm EP$ ) de peso úmido e comprimento de  $0,6 \pm 0,61$  mg e  $4,5 \pm 0,04$  mm.

A taxa média ( $\pm EP$ ) de crescimento ( $\text{mm.dia}^{-1}$ ) ao final do experimento foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) nas larvas alimentadas com rotíferos pigmentados com astaxantina - TA ( $0,43 \pm 0,04$   $\text{mm.dia}^{-1}$ ) somente quando comparada ao TCA ( $0,34 \pm 0,01$   $\text{mm.dia}^{-1}$ ), e estes dois tratamentos não diferiram dos demais, (TN -  $0,38 \pm 0,03$   $\text{mm.dia}^{-1}$  e TAN -  $0,40 \pm 0,03$   $\text{mm.dia}^{-1}$ ). O menor valor de comprimento total foi observado no TCA ( $7,2 \pm 0,21$  mm), diferente somente de TA ( $7,9 \pm 0,15$  mm) e TAN ( $7,7 \pm 0,19$  mm) ( $P < 0,05$ ). Para o TN ( $7,5 \pm 0,24$  mm), não houve diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Fig. 6A).

Em relação ao peso úmido, ao final do experimento, a média do tratamento com astaxantina (TA -  $5,9 \pm 0,5$  mg) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) somente quando comparada a do tratamento com corante artificial (TCA -  $4,4 \pm 0,43$  mg), porém, não diferiu

significativamente dos demais tratamentos. As médias de peso de TN e TAN foram de  $5,1 \pm 0,63$  e  $5,3 \pm 0,47$  mg, respectivamente (Fig. 6B).

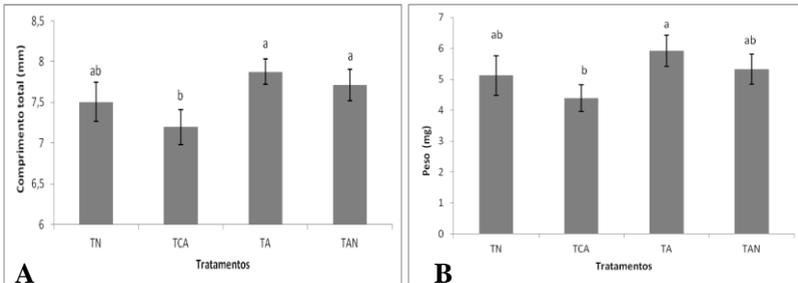


Figura 6. Comprimento total e peso final (média  $\pm$  EP) das larvas de *A. clarkii* nos diferentes tratamentos após 8 dias de cultivo. TN: *N. oculata*; TCA: Corante artificial; TA: Astaxantina e TAN: Astaxantina + *N. oculata*. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, o uso da astaxantina influenciou o início do processo de metamorfose, onde a larva começa apresentar pigmentação do corpo semelhante ao do exemplar adulto. Os resultados evidenciam que o uso da astaxantina pode antecipar este processo para as larvas de *A. clarkii*, principalmente se este carotenoide for administrado juntamente com a microalga *N. oculata*. Assim, a metamorfose iniciou mais cedo nas larvas do tratamento com astaxantina e microalga - TAN e no tratamento com astaxantina - TA (4° e 5° DAE), quando comparada ao TN e TCA (6° e 8° DAE) e a outros trabalhos realizados com peixes-palhaço (Tabela 1).

Tabela 1. Início da metamorfose em larviculturas de diferentes espécies de peixes-palhaço.

Espécies	Salinidade	Temperatura (°C)	Início da metamorfose (Dias Após Eclosão)	Referências
	25	26	4-8	Presente estudo
<i>Amphiprion clarkii</i>	20 – 30	26	10,2	Francio-Medeiros, 2013
	26	30	8	Nass, 2013
	20 a 25	26-27,5	8	Le et al. 2009
	26	-	15	Ghosh et al. 2012
<i>Amphiprion ocellaris</i>	30	28	9-12	Olivotto et al. 2011
<i>Amphiprion sebae</i>	22 a 24	28	15-18	Kumar et al. 2010

(-) não informado pelos autores.

É possível que os melhores resultados encontrados no TAN para o início da metamorfose, sejam decorrentes dos ácidos graxos presentes na microalga *N. oculata*. Segundo Olson (1994), a coadministração de carotenoides e compostos lipídicos aumenta a biodisponibilidade desses pigmentos. Desta forma, o fornecimento da astaxantina juntamente com a microalga, possivelmente favoreceu sua absorção pelas larvas de *A. clarkii*, influenciando positivamente o processo de metamorfose. Segundo Olivotto et al. (2011), os ácidos graxos, principalmente os de cadeia longa (HUFAS), são particularmente importantes durante a primeira semana de vida dos peixes, podendo influenciar o crescimento e a metamorfose. Izquierdo et al. (2008) também afirmam que as larvas de peixes marinhos são sensíveis a falta de ácidos graxos na dieta. Hamrea et al. (2005) observaram que houve uma má pigmentação do *Atlantic halibut* quando alimentados com baixa concentração de ácidos graxos. A formação de pigmentos também foi reduzida em larvas de turbot *Scophthalmus maximus* quando a dieta foi deficiente em HUFAS

e vitamina A (Reitan et al. 1994). Os resultados destes trabalhos confirmam os encontrados no presente experimento, já que houve uma diferença significativa no número de larvas metamorfoseadas entre os tratamentos TAN e TCA, e segundo Hamrea et al. (2005) a falta de nutrientes pode ter um impacto sobre a produção dos hormônios da tireoide, que estão envolvidos no processo de metamorfose larval. Provavelmente os rotíferos pigmentados apenas com corante artificial apresentaram uma deficiência nutricional, que refletiu no processo de metamorfose.

A antecipação da metamorfose é um fator favorável no comércio de peixes ornamentais, pois a diminuição do período larval implica também em menores custos no cultivo e em maior quantidade de ciclos produtivos. A larvicultura é a fase mais crítica para produção de peixes marinhos. O futuro desta atividade depende entre outros fatores, da obtenção de larvas saudáveis que irão metamorfosear com sucesso para suas formas jovens (Holt, 2003). Neste sentido, a astaxantina mostrou-se eficiente no cultivo das larvas de *A. clarkii* e, além disto, também pode influenciar a pigmentação da pele dos peixes (Gupta et al. 2007), o que pode afetar o valor de mercado destes organismos (Gouveia e Rema, 2005).

O presente estudo obteve resultados de sobrevivência final (46,8 a 72,6%), superiores a outros trabalhos utilizando a mesma espécie na fase de larvicultura. Olivotto et al. (2008a,b, 2009), obtiveram sobrevivência de 41 a 43%, utilizando rotíferos na alimentação até o oitavo dia de larvicultura. Neste trabalho, os tratamentos utilizando astaxantina (TAN e TA) não mostraram diferenças significativas em relação ao TN, o que sugere que o uso da astaxantina não teve efeito significativo sobre os parâmetros de sobrevivência e crescimento, quando comparada ao uso exclusivo da microalga *N. oculata*. Este resultado corrobora com os obtidos por Wang et al. (2006), que relataram que os carotenoides provenientes de várias fontes, ofertados na dieta do peixe ornamental de água doce *Hyphessobrycon calistus*, não afetou as taxas de crescimento e sobrevivência. Por outro lado, Higuera-Ciapara et al. (2006) citam que um dos resultados da adição de astaxantina em dietas para animais aquáticos é o aumento na sobrevivência. Rezende (2010) encontrou efeito positivo para a sobrevivência de acarás-disco *Symphysodon aequifasciatus* alimentados com cantaxantina comercial, ressaltando a importância dos carotenoides para esta espécie. Yagi et al. (2001) suplementaram rotíferos com carotenoides para alimentação de larvas de *Pagrus major* e obtiveram

maiores taxas de sobrevivência em relação aos tratamentos sem o uso destes compostos.

O residual de rotíferos indica a ocorrência de dois possíveis eventos. O primeiro sugere que a pigmentação com astaxantina não aumentou a atratividade dos rotíferos para as larvas de *A. clarkii*, já que o residual de rotíferos foi significativamente maior no tratamento utilizando astaxantina e *N. oculata* no 2° e 3° DAE, ou seja, possivelmente houve um menor consumo de rotíferos pelas larvas. Além disso, durante o restante do experimento, o residual apresentou resultados bastante similares entre todos os tratamentos. O trabalho diverge dos resultados encontrados por Dendrinis et al. (1984), em que os autores pigmentaram náuplios de artemia com diferentes corantes para alimentação de larvas de *Solea solea* e obtiveram melhor eficiência alimentar, sugerindo que o contraste do alimento melhora sua percepção pelas larvas. Os resultados do presente trabalho também sugerem que pode ter ocorrido a reprodução dos rotíferos nas unidades de cultivo, ocasionando um aumento na biomassa.

Em relação ao crescimento das larvas de *A. clarkii*, os resultados do presente estudo sugerem que o uso da astaxantina não afetou significativamente este parâmetro, já que o tratamento com astaxantina (TA), os resultados de peso e comprimento não diferiram estatisticamente do tratamento com a microalga *N. oculata*. Outros autores observaram que a suplementação de carotenoides na dieta não afetou o crescimento (Amar et al. 2001; Page e Davies, 2002) e a conversão alimentar (Amar, 2004) durante a engorda de trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Em estudo realizado com alevinos de pargo *Pagrus pagrus* observou-se que os peixes alimentados com ração comercial e camarão *Pleisonika sp.* (88% ração e 12% camarão) não apresentaram diferenças significativas no crescimento e sobrevivência, demonstrando que esta espécie não sofreu influência dos carotenoides naturais presentes no camarão (Cejas et al. 2003). Contrariamente, Sinha e Asimi (2007) relatam a importância da astaxantina para peixes e crustáceos, descrevendo que, além de promover a pigmentação de espécies cultivadas é efetiva em seu crescimento e sobrevivência. Estes mesmos autores observaram que o crescimento de kinguios *Carassius auratus* foi melhor em ganho de peso nos grupos alimentados com ração enriquecida com carotenoides. Um efeito positivo em relação ao ganho de peso foi observado também em acarás-disco alimentados com rações enriquecidas com cantaxantina comercial (Rezende, 2010).

Sugere-se que novas pesquisas sejam desenvolvidas a fim de investigar a composição nutricional dos rotíferos pigmentados com astaxantina. A maioria dos trabalhos com carotenoides enfoca, de uma maneira geral, as taxas de pigmentação na pele e no músculo dos animais aquáticos destinados ao consumo como alimento (ex: salmões e camarões), existindo, portanto, a necessidade de se esclarecer a influência dos pigmentos carotenoides no desempenho zootécnico das espécies ornamentais marinhas.

Outra abordagem para novas pesquisas seria a aplicação de testes de estresse com larvas alimentadas com rotíferos pigmentados, já que os carotenoides são considerados imunestimulantes (Miki, 1991; Christiansen e Torrissen, 1996; Chien et al. 2003; Stahl e Sies, 2003; Amar, 2004), e podem influenciar na resistência das larvas ao manejo.

## 5. Conclusão

A astaxantina isolada ou juntamente com a microalga *Nannocloropsis oculata* antecipa o início do processo de metamorfose para larvas de *Amphiprion clarkii*. Entretanto, a astaxantina não afeta de forma significativa as taxas de crescimento e sobrevivência das larvas em relação ao uso de rotíferos pigmentados exclusivamente com *N. oculata*.

## Referências Bibliográficas

- Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S. e Watanabe, T.** 2001. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 32:162-173.
- Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S. e Watanabe, T.** 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural product. *Fish & Shellfish Immunology*, 16:527-537.
- Andrade, L. S., Hayashi, C. e Souza, S.R.** 2004. Efeito da cor e da presença de refúgio artificial sobre o desenvolvimento e sobrevivência de alevinos de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. Maringá, 26(1):61-66.
- Blaxter, J. H. S.** 1986. Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115:980-114.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Tejera, N., Jerez, S., Bolanos, A. e Lorenzo, A.** 2003. Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. *Aquaculture*, 218:457-469.
- Chien, Y. H., Pan, C. H. e Hunter, B.** 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, 216:177-191.
- Dendrinis, P., Dewan, S. e Thorpe, J.P.** 1984. Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile dover sole (*Solea solea* L.) by the use of staining to improve the visibility of *Artemia* used as food. *Aquaculture*, 38:137-144.
- Francio-Medeiros, A. F.** 2013. Desenvolvimento de larvas do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*: efeito da salinidade e da temperatura. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

**Gerking, S.D.** 1994. Feeding ecology of fish. Academic Press, San Diego.

**Ghosh, S., Kumar, T. T. A., Nanthinidevi, K. e Balasubramanian, T.** 2012. Reef fish breeding and hatchery production using brackishwater, a sustainable technology with special reference to clark's clownfish, *Amphiprion Clarkii* (Bennett, 1830). International Journal Of Environmental Science And Development, 3:56-60.

**Giwojna, P.** 2002. Ocean Rider: a horse of a different color. Freshwater and Marine Aquarium, 25(7):122-150.

**Gouveia, L. e Rema, P.** 2005. Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. Aquaculture Nutrition, 11:19-23.

**Gupta, S. K., Jha, A. K., Pal, A. K. e Venkateshwarlu, G.** 2007. Use of natural carotenoids for pigmentantion in fishes. Natural Product Radiance, 6:46-49.

**Hamrea, K., Morena, M., Solbakkenb, J., Opstad, I. e Pittmanb, K.** 2005. The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L). Aquaculture, 250:555-565.

**Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. e Goycoolea, F. M.** 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46:185-196.

**Holt, G. J.** 2003. Research on culturing the early life history stages or marine ornamental species. In: Cato, J.C.; Brown, C.L. (Eds.), Marine ornamental species: collection, culture and conservation. Iowa Stage Press, Iowa:251-254.

**Howell, B. R.** 1979. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture, 18:215-225.

**Izquierdo, M. S., Arakawa, T., Takeuchi, T., Haroun, R. e Watanabe, T.** 1992. Effect of n-3 HUFA levels in Artemia on

growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 105(1):73-82.

- Izquierdo, M. S., Socorro, J., Arantzamendi, L., e Hernandez-Cruz, C.M.** 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22:97-107.
- Izquierdo, M.S., Robaina, L., Juárez, E., Oliva, R., Hernández-Cruz, C.M. e Afonso, J.M.,** 2008. Regulation of growth, fatty acid composition and delta 6 desaturase expression by dietary lipids in gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34:117-127.
- Kostopoulou, V., Miliou, H., Katis, G. e Verriopoulos, G.** 2006. Changes in the population structure of the lineage 'Nevada' belonging to the *Brachionus plicatilis* species complex, batch-cultured under different feeding regimes. *Aquaculture International*, 14:451-466.
- Koven, W. M., Tandler, A., Kissil, G.W., Skland, D., Friezlander, O. e Harel, M.** 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 1:131-141.
- Kumar, T. T. A., Setu, S. K., Murugesan, P. e Balasubramanian, T.** 2010. Studies on captive breeding and larval rearing of clownfish, *Amphiprion sebae* (Bleeker, 1853) using estuarine water. *Indian Journal Of Marine Sciences*, 39:114-119.
- Le, Y., Sheng-Yun, Y., Yu, W. e Kai-Chang, W.** 2009. Effects of salinity on the survival activity and larvicultura of anemonefish (*Amphiprion clarkii*). *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 37:162-164.
- Le, Y., Sheng-Yun, Y., Xiao-Ming, Z., Min, L., Jing-Yi, L. e Kai-Chang, W.** 2011. Effects of temperature on survival, development, growth, and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecologica Sinica*, 31:241-245.
- Matias, V. F.** 2011. Efeito da intensidade luminosa na coloração do peixe-palhaço Clarkii (*Amphiprion clarkii*). Dissertação

(Mestrado). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche.

- Matsuda, H. Tsujigado, A. e Yamakawa, T.** 1987. Effect of environmental factors on the survival and growth of larvae of stone flounder *Kareius bicoloratus*. Bulletin Fisheries Research, 2:45-50.
- Merighe, G. K. F., Pereira-da-Silva, E. M., Negrão, J. A. e Ribeiro, S.** 2004. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia, 33:828-837.
- Miki, Y.** 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure and Applied Chemistry, 63:141-146.
- Mourente, G., Rodriguez, A., Tocher, D.R. e Sargent, J.R.** 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) larvae during first feeding. Aquaculture, 112:79-98.
- Nass, D.** 2013. Efeito da antecipação da oferta de Artemia na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- Olivotto, I., Buttino, I., Borroni, M., Piccinetti, C. C., Malzonone, M. G. e Carnevali, O.** 2008a. The use of the mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. Aquaculture, 284:211-216.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A. M., Vitiello, V., Maradonna, F. e Carnevali, O.** 2008b. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: Effects on larval survival and growth. Aquaculture, 274:347-352.
- Olivotto, I., Stefano, M., Rosetti, S., Cossignani, L., Pugnaroni, A., Giantomassi, F. Carnevali, O.** 2011. Live prey enrichment, with particular emphasis on HUFAs, as limiting factor in false percula clownfish (*Amphiprion ocellaris*, Pomacentridae) larval

- development and metamorphosis: Molecular and biochemical implications. *Comparative Biochemistry And Physiology Parte A*, 159:207-218.
- Olson, J.A.** 1994. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in human. *Pure and Applied Chemistry*, 66:1011-1116.
- Ostrowski, A. C.** 1989. Effect of rearing tank background color on early survival of dolphin larvae. *Journal Progressive Fish-Culturist*, 51(3):161-163.
- Page, G. I. e Davies, S. J.** 2002. Astaxanthin and canthaxanthin do not induce liver or kidney xenobiotic-metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133:443- 451.
- Pedreira, M. M. e Sipaúba-Tavares, L. H.** 2001. Effect of light green and dark brown colored tanks on survival rates and development of tambaqui larvae, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalmidae). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, 23:521-525.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. e Olsen, Y.** 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture International*, 2:33-48.
- Rezende, F. P.** 2010. Intensificação da coloração em peixes ornamentais com uso de rações enriquecidas com pigmentos naturais. TESE (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, MG.
- Rodrigues, R.V., Freitas, L. S. e Sampaio, L. A.** 2009. Efeito da intensidade luminosa sobre a capacidade de predação de larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis*. *Ciência Rural*, Santa Maria, 39(1):246-249.
- Sinha, A. e Asimi, O.A.** 2007. China rose (*Hibiscus rosasinensis*) petals: a potent natural carotenoid source for goldfish, (*Carassius auratus* L.) *Aquaculture Research*, 38: 1123-1128.
- Soares, C. M., Hayashi, C. e Faria, A. C. E. E.** 2001. Influência da disponibilidade de presas, do contraste visual e do tamanho das larvas de *Pantala sp.* (Odonata, Insecta) sobre a predação de

*Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Crustacea). Acta Scientiarum, Maringá, 23(2):357-362.

**Sorgeloos, P. e Léger, P.** 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. Journal of the World Aquaculture Society, 23(4):251-264.

**Stahl, W. e Sies, H.** 2003. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 24:345-351.

**Torrissen, O. J. e Christiansen, R.** 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. J. Journal of Applied Ichthyology, 11:225-230.

**Wang, Y., Chien, Y. e Pan, C.** 2006. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. Aquaculture, 261:641-648.

**Watanabe, T., Kitajima, C. e Fujita, S.** 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34:115-143.

**Weingartner, M. e Zaniboni Filho, E.** 2004. Efeito de fatores abióticos na larvicultura de pintado amarelo *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803): salinidade e cor de tanque. Acta Scientiarum. Animal Sciences, Maringá, 26(2):151-157.

**Wilkerson, J. D.** 2003. Clownfishes: A guide to their captive care, breeding & natural history. Microcosm, Charlotte.

**Yagi, M., Tachibana, K., Mishima, T., Hara, K. e Tsuchimoto, M.** 2001. Effects of feeding of carotenoids supplement rotifer on splenocyte proliferation reaction of red sea bream larvae (*Pagrus major*) and tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Japan Aquaculture Society, 49:501-506.

## ANEXO



Figura. Desova do *A. clarkii* utilizada para este experimento.



Figura. Astaxantina comercial utilizada no experimento.



Figura. Unidades experimentais.



Figura. Filtragem da astaxantina antes do fornecimento aos rotíferos.



Figura. Recipientes utilizados para pigmentação dos rotíferos.



Figura. Larva de *A. clarkii* não metamorfoseada.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALVAREZ-LAJONCHERE, L.; MOLEJÓN, O.G.H. Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, 424 p., 2001.

ANDRADE, L. S.; HAYASHI, C.; SOUZA, S.R. Efeito da cor e da presença de refúgio artificial sobre o desenvolvimento e sobrevivência de alevinos de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v.26, n.1, p.61-66, 2004.

ARVEDLUND, M.; LARSEN, K.; WINSOR, H. The embryonic development of the olfactory system in *Amphiprion melanopus* (Perciformes: Pomacentridae) related to the host imprinting hypothesis. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, p.1103-1109, 2000.

BARROS, H. P.; VALENTI, W.C. Ingestion rates of *Artemia* nauplii for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.217, p.223-233, 2003.

BENGTSON, D.A. **Status of Marine Aquaculture in Relation to Live Prey**: Past, Present and Future. In: Støttrup, J.G.; McEvoy, L.A. (eds.): *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Oxford, p.1–16, 2003.

BLAXTER, J.H.S. Rearing herring larvae to metamorphosis and beyond. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, v. 48, p.17-28, 1968.

BLAXTER, J.H.S. Development of sense organs and behaviour of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. **Trans. Am. Fish. Soc.**, p.115:98-114, 1986.

CARIC, M.; SANKO-NJIRE, J.; SKARAMUCA, B. Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). **Aquaculture**, v.110, p.141-150, 1993.

CESTAROLLI, M. A. **Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans***: Aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, 2005.

CHIEN, Y.H.; PAN, C.H.; HUNTER, B. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. **Aquaculture**, v.216, p.177-191, 2003.

CHOUBERT, G.; BLANC, J. M.; POISSON, F. Effects of dietary keto-carotenoids (canthaxanthin and astaxanthin) on the reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v.4, p.249-254, 1998.

CIVERA-CERECEDO, R.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; MAYANO-LOPEZ, F.J. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: Cruz Suárez, L. E.; Ricque Marie, D. Nieto López, M. G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. **Avances en nutrición Acuícua VII**. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícua. 16-19 Nov. Sonora, México, 2004.

CONCEIÇÃO, L.C. et al. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**, v.268, p.64-81, 2007.

DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present "state of art" and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, v.24, n.6, p.807-833, 1984.

DENDRINOS, P.; DEWAN, S.; THORPE, J. P. Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile dover sole (*Solea solea* L.) by the use of staining to improve the visibility of *Artemia* used as food. **Aquaculture**, v.38, p.137-144, 1984.

DURAY, M.M.; ESTUDILLO, C.B.; ALPASAN. L.G. The effect of background colour and rotifer density on rotifer intake, growth and survival of the grouper (*Epinephelus suillus*) larvae. **Aquaculture**, v.146, p.217-225, 1996.

FARIA, A. C. E. A. et al. Predação de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, H.) por copépodos ciclopoídes (*Mesocyclops longisetus*) em diferentes densidades em ambientes com diferentes contrastes visuais. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, p. 497-502, 2001.

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

GERKING, S.D. **Feeding ecology of fish**. Academic Press, San Diego, 1994.

GILIBERTO, S.; MAZZOLA, A. Mass culture of *Brachionus plicatilis* with integrated system of *Tetraselmis suecica* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal World Mariculture Society**, v.12, n.2, p.61-62, 1981.

GIWOJNA, P. Ocean Rider: a horse of a different color. **Freshwater and Marine Aquarium**, v.25, n.7, p.122-150, 2002.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critic. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.46, p.185-196, 2006.

HO, A.F.C; O'SHEA, S.K.; POMEROY, H.F. Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. **Aquacult Int.**, v.21, p.361-374, 2013.

HOFF, F.H. **Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish**. Florida: Aquaculture Consultants. 120p., 1996.

HOWELL, B.R. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture**, v.18, p.215-225, 1979.

\_\_\_\_\_. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e aquariofilia**. Relator Herique Anatole. Brasília, DF: Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas. ago. 2008.

INA, K., RYOGI, Y.; HIGASHI, K. Color sensitivity of red sea bream, *Pagrus major*. **Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish.**, v.45, n.1, p. 1-5, 1979.

IWAI, T. Sensory anatomy and feeding of fish larvae. In: BARDACH et al. (ed). *Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes*. **International Center for Living Aquatic Resources Management**, Manila. p.124-145, 1980.

KOBAYASHI, Y. et al. Sex and tissue-specific expression of P450 aromatase in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part.A, vol. 155, p.237-244, 2010.

KODAMA, G., et al. Viabilidade econômica do cultivo do peixe-palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol.1, n.37, São Paulo, p.61-72, 2011.

KOSTOPOULOU, V., et al. Changes in the population structure of the lineage 'Nevada' belonging to the *Brachionus plicatilis* species complex, batch- cultured under different feeding regimes. **Aquaculture International**, v.14, p.451-466, 2006.

KOVEN, W.M., et al. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, v.1, p.131-141, 1990.

LE, Y., et al. Effects of temperature on survival, development, growth, and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). **Acta Ecologica Sinica**, v.31, p.241-245, 2011.

LEVINE, J.S.; MACNICHOL, E.J. Color vision in fishes. **Sci. Am.** v.216, p.108-117, 1982.

MATIAS, V. F. **Efeito da intensidade luminosa na coloração do peixe-palhaço Clarkii (*Amphiprion clarkii*)**. 2011. 39 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche, 2011.

MATSUDA, H.; TSUJIGADO, A.; YAMAKAWA, T. Effect of environmental factors on the survival and growth of larvae of stone flounder *Kareius bicoloratus*. **Bull. Fish. Res. Inst. Mie**, v.2, p.45-50, 1987.

MERIGHE, G.K.F., et al. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.828-837, 2004.

MIKI, Y. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, v. 63, p. 141-146, 1991.

MOURENTE, G., et al. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) larvae during first feeding. **Aquaculture**, v.112, p.79-98, 1993.

ODEBERG, J.M., et al. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.19, p.299-304, 2003.

OSTROWSKI, A. C. Effect of rearing tank background color on early survival of dolphin larvae. **Prog. Fish-Cult.**, v.51, n.3, p.161-163, 1989.

PEDREIRA, M.M.; SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Effect of light green and dark brown colored tanks on survival rates and development of tambaqui larvae, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalmidae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v.23, p.521-525, 2001.

PORTELLA, M.C., LEITÃO, N.J., TAKATA, R., LOPES, T.S. Alimentação e Nutrição de Larvas. In: Fracalossi, D.M., Cyrino, E.P. **Nutriaqua**: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.185-208, 2012.

RAINUZZO, J. R. et al. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. **Aquaculture**, v.155, p.103-115, 1997.

RIBEIRO, F.A.S.; RODRIGUES, L.A.; FERNANDES, J.B.K. Desempenho de juvenis de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com diferentes níveis de proteína bruta na dieta. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.33, n.2, p.195-203, 2007.

RIEGER, P.W.; SUMMERFELT, R.C. The influence of turbidity on larval walleye. *Stizostedion vitreum*, behavior and development in tank culture. **Aquaculture**, v. 159, p. 19-32, 1997.

RODRIGUES, R.V.; FREITAS, L.S; SAMPAIO, L.A. Efeito da intensidade luminosa sobre a capacidade de predação de larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.246-249, 2009.

SIGURGISLADOTTIR, S., et al. Effects of feeding natural tocopherols and astaxanthin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet quality. **Food Res. Int.**, v.27, p.23-32, 1994.

SOARES, C. M., et al. Influência da disponibilidade de presas, do contraste visual e do tamanho das larvas de *Pantala sp.* (Odonata, Insecta) sobre a predação de *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Crustacea). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.2, p.357-362, 2001.

SORGELOOS, P.; LÉGER, P. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.23. n.4, p.251-264, 1992.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Mol. Aspect. Med.**, v.24, p.345-351, 2003.

TAMURA, T.; NIWA, H. Spectral sensitivity and color vision of fish as indicated by s-potential. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 22, p.745-754, 1967.

THORNHILL, D. J. **Ecological Impacts and Pratices of the Coral Reef Wildlife Trade**. Defenders Of Wildlife, 2012.

TORRISSEN, O.J.; HARDY, R.W.; SHEARER, K.D. Pigmentation of salmonids: Carotenoid deposition and metabolism. **Crit. Rev. Aquat. Sci.**, v.1, p.209-225, 1989.

VARGUESE, B. et al. Dietary influence on the egg production and larval viability in True Sebae Clownfish *Amphiprion sebae* Bleeker 1853. **Asian Fisheries Science**, v.22, p.7-20, 2009.

WABNITZ, C. et al. **From ocean to aquarium the global trade in marine ornamental species**. UNEP-WCMC, Cambridge, 64 p., 2003.

WATANABE, T.; KITAJIMA, C.; FUJITA, S. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. **Aquaculture**, v.34, p.115-143, 1983.

WATANABE, T.; MIKI, W. Astaxanthin: An effective dietary component for red sea bream broodstock. **In: Fish Nutrition in Practice**, PINRA, Paris, p.27-36, 1993.

WATHENE, E., et al. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. **Aquaculture**, v.159, p.217-231, 1998.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Efeito de fatores abióticos na larvicultura de pintado amarelo *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803): salinidade e cor de tanque. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v.26, n.2, p.151-157, 2004.

WHYTE, J. N. C.; NAGATA, W. D. Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. **Aquaculture**, v.89, p.263-272, 1990.

WILKERSON, J. D. **Clownfishes: a guide to their captive care, breeding & natural history**. Charlotte: Microcosm, 2003.

WITTENRICH, M. L. **The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes**. T.F.H. Publications, Neptune, 2007.