



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

Marcia Souza da Cruz

**DIFERENTES SALINIDADES NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO E
EXPRESSÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM LARVAS DO PEIXE-PALHAÇO**

Amphiprion ocellaris CUVIER, 1830

FLORIANÓPOLIS

2019

Marcia Souza da Cruz

**DIFERENTES SALINIDADES NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO E
EXPRESSÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM LARVAS DO PEIXE-PALHAÇO**

Amphiprion ocellaris CUVIER, 1830

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mônica Yumi Tsuzuki

Florianópolis

2019

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

Cruz, Marcia Souza da

Diferentes salinidades na sobrevivência, crescimento e expressão de enzimas digestivas em larvas do peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830 / Marcia Souza da Cruz ; orientadora, Monica Yumi Tsuzuki, 2019.

36 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Cultivo. 3. Fator abiótico. 4. Peixes ornamentais marinhos. I. Tsuzuki, Monica Yumi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. III. Título.

Marcia Souza da Cruz

DIFERENTES SALINIDADES NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM LARVAS DO PEIXE-PALHAÇO
Amphiprion ocellaris CUVIER, 1830

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Mônica Yumi Tsuzuki, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Aimê Rachel Magenta Magalhães, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Carlos Peres Silva Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Profa. Dra. Leila Hayashi
Coordenadora do Programa

Profa. Dra. Mônica Yumi Tsuzuki
Orientadora

Florianópolis, 30 de maio de 2019

Este trabalho é dedicado aos meus
maravilhosos pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por ter me concedido a graça da vida, por estar presente em todos os momentos, mesmo quando eu duvidei do seu amor, e por um dos bens mais preciosos da minha vida a minha família.

À minha mãe Izabete, a mulher de minha vida, o dia em que eu encontrar com DEUS agradecerei pela mãe que Ele me deu de presente, não poderia ser outra, nem sei o que dizer ou expressar, é tanto amor que o peito as vezes parece que vai explodir. Eu te amo mãe.

Ao meu pai Antônio, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e desta batalha, que apesar da distância sempre me deu força e apoio e amor, te amo paião.

Às minhas irmãs que me ajudaram e deram apoio incondicional, em especial a Carolina, que deixou a sua vida em Belém para vir me ajudar como segunda mãe de minha filha Arcelina o meu muito obrigada. Obrigada por tudo minha mana do coração.

Às minhas outras irmãs: Daluana, que mesmo distante teve um papel fundamental me apoiando sempre, à Natália, Claudilene e à Claudionora (*In memorian*) que mesmo lá do céu sempre torceu e esteve ao meu lado.

Ao Elielson Santo pai de minha filha Arcelina, pelo companheirismo e apoio desde o momento em que decidi fazer o mestrado, muito obrigada por tudo.

À minha irmã em Cristo e grande amiga Helen, que me ajudou em todos os momentos, antes, durante e depois do experimento, sem ela eu não sei se teria conseguido. Não tenho como agradecer por tudo que fizeste amiga, até deixaste tua família para dormir comigo as noites em que precisei ficar no laboratório, sem palavras para agradecer, serei eternamente **grata** a você. DEUS te abençoe grandemente.

À professora Mônica Tsuzuki por ter me dado a oportunidade de vivenciar esses anos no laboratório e pela experiência incrível que eu tive ao trabalhar com peixe ornamental marinho, cultivar rotífero, *Artemia* e muitas outras coisas. Neste sentido também sou agradecida pela realização deste trabalho, pela orientação, apoio, revisões, muitas revisões, confiança, oportunidade, puxão de orelha e pela paciência, muita paciência que ela teve e tem comigo. Muito obrigada minha professora do coração.

Às minhas amigas Marillyse Vieira e Fernanda Carmo que me deram apoio durante todo o tempo, desde que eu havia passado no mestrado e já grávida, sempre diziam que eu iria conseguir, e que eu chegaria lá. Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado. E serem minhas melhores amigas. Amo amo. E nos três últimos dias antes da defesa, em especial agradeço a Marillyse que me abrigou em sua casa, e ajudou na elaboração da apresentação de

defesa de mestrado, na verdade os elogios da professora Aimê Magalhães são para você minha amiga, é você mesma, se não fosse sua ajuda, pobre de mim, eita, e já ia esquecendo, obrigada por não ter deixado eu surtar, e olha que não faltou nada, rrsrsrs..

À professora Aimê Magalhães, uma pessoa incrível e espetacular, e que diante dos meus momentos de desespero, sempre sabia dar uma palavra de conforto e ânimo. Muito obrigada professora.

Ao professor Carlos Silva pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos, que foi extremamente necessário para a realização das análises, e pelas dicas valiosíssimas na realização destas, o meu muitíssimo obrigada.

Ao Rafael Sales pela amizade, paciência e força em todos os momentos, pela grande ajuda com a estatística do trabalho, e pelos chás que tomamos em muitas tardes.

Ao Sérgio Araujo também quero agradecer pela amizade, e pela preocupação comigo, pois eu percebia o quanto ele ficava preocupado quando um experimento não dava certo. Obrigada Serginho.

Ao insuportável Raoani Mendonça, que amo de coração, menino chato mas que eu gostava de estar perto, e não posso negar que me ajudou bastante, os meus eternos agradecimentos.

Ao Carlito Klunk uma das pessoas mais incríveis que conheci nessa vida, nunca imaginei que me ajudaria tanto como ajudou. Em meus momentos de desespero e angústia, pela vez em que não aguentei o choro em sua frente, e ele me surpreendeu com um forte e carinhoso abraço, amizade que levarei para a vida toda e no coração também. Muitíssimo obrigada por tudo. Deus te abençoe sempre.

À Tânia Lopes e Lucianny Bastos que nas últimas semanas antes da defesa se tornaram minhas amigas, sei que o tempo pareceu pouco para eu chamar de amigas, mas foi o suficiente para eu reconhecer essas amizades importantes. Agradeço a Deus por vocês duas.

Ao professor Roberto Bianchini também contribuiu com a pesquisa e sempre perguntava como estava o experimento, obrigada professor.

À Renata Ozório nossa técnica do laboratório, que foi mais mãe que técnica. Meus agradecimentos também quando eu tive que ir para a “força” do colegiado para solicitar prorrogação e ela se dispôs a ir comigo. Obrigada minha flor por tudo...

À Paula Lira que também foi importante para o desenvolvimento desta pesquisa, foi ideia dela fazer o trabalho com salinidade. Agradeço pela amizade e pelo apoio nos momentos difíceis. Obrigada por tudo Paulinha.

Cristina Rios, o que dizer de você? Sempre muito paciente, solícita, alegre, e compreensiva comigo, foste meu alicerce nas análises de enzimas que pareciam intermináveis. Aqui o meu muito e eterno agradecimento.

À minha segunda família, meus irmãos de igreja que em um dos momentos mais difíceis (período em que os experimentos não davam certo) se reuniram e rezaram com muita fé para que o mesmo desse certo. Muito obrigada por todas as orações, pensamentos positivos e apoio.

À minha terceira família o “LAPOM” que me ajudou direta e indiretamente, meus agradecimentos a toda a equipe: Desde quando eu havia chegado até o presente momento: Ana Carolina Ricardo, Daner Ferreira, Danilo Santana, Douglas Matos, Gabriel Santini, Ilson Neoroci, Jeorgélia Marques, Letícia Trajano, Mariana Moraes, Ksênia Santos, Maria Salete.

Ao pessoal do LAPMAR, que também foi fundamental para o andamento da pesquisa, com o fornecimento de rotíferos, muitos rotíferos e equipamentos. Quero agradecer em especial a Vanessa pela sua enorme amizade e pela singular companhia nos cafés da manhã, no almoço, no café da tarde e no último café da tarde também rrsrsrs. Também meu agradecimento especial a senhorita Cleize Sales que sempre foi muito solícita e companheira, sua amizade levarei para a vida toda. Ao Fábio Carneiro que também me ajudou bastante quando surgiam dúvidas e pela companhia nos cafés de todas as tardes, e principalmente pelas conversas descontraídas com risos, muitos risos e gargalhadas, obrigada por fazer minhas tardes pesadas ficarem mais leves.

A toda equipe do laboratório de Moluscos Marinhos que nos cederam as microalgas para alimentar os rotíferos, sempre foram muito solícitos.

E finalmente agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa da Pós-graduação em Aquicultura, pela oportunidade ímpar de fazer parte deste programa, e a CAPES pela bolsa de estudo.

“As dificuldades são os degraus para chegar ao topo”

(Marcia Cruz, 2019)

RESUMO

Este trabalho avaliou a sobrevivência, o crescimento e a expressão de enzimas digestivas na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* em diferentes condições salinas (14, 21, 28 e 35‰) na densidade de 6,25 larvas por litro. Portanto, foram testadas quatro salinidades, em triplicata, com animais de 3 dias após a eclosão (DAE) até o 23° DAE (período em que completaram 100% da metamorfose, quando surge a terceira e última banda corporal). No início e ao final do experimento foram coletadas larvas em cada tratamento para medição dos parâmetros zootécnicos e análise de enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase). Os resultados mostraram melhor crescimento (peso, comprimento, comprimento diário, ganho em peso), especialmente quando comparado a 14‰, e maior atividade da amilase, na salinidade de 35‰. Apesar disto, nas salinidades de 14 a 28 ‰, os peixes mostraram crescimento e boas taxas de sobrevivência, viabilizando assim o cultivo das larvas de *Amphiprion ocellaris* nestas condições. O cultivo de *A. ocellaris* em salinidades mais baixas pode contribuir consideravelmente com a redução dos custos de produção, uma vez que o processo de salinização da água apresenta alto custo para os produtores que não tem acesso à água do mar.

Palavras-chave: Aquicultura. Cultivo. Fator abiótico. Peixes ornamentais marinhos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the survival, growth parameters and expression of digestive enzymes of clownfish (*Amphiprion ocellaris*) larviculture in different saline conditions (14, 21, 28 and 35‰). It was tested four salinities in triplicate, with animals from 3 days after hatching (DAH) until the 23rd DAH (period in which they completed 100% of the metamorphosis, when the third and the last body band appeared). At the beginning and at the end of the experiment, larvae were collected in each treatment for measurement of the growth parameters and analysis of digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin and amylase). Growth parameters (weight, length, daily length, weight gain) showed better results when compared to 14‰, and the amylase activity increased at 35‰ salinity. However, fish showed better growth parameters and survival rates at salinities of 14 to 28‰ enabling the larvae cultivation of the *Amphiprion ocellaris* in these conditions. Lower salinities can reduce production costs of the larvae cultivation of *A. ocellaris*, because the water salinization is one of the most *expensive* process.

Key-words: Aquaculture. Culture. Abiotic factors. Marine ornamental fish.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1	COMÉRCIO DE PEIXES ORNAMENTAIS	12
1.2	CULTIVO DE PEIXES ORNAMENTAIS	13
1.3	<i>Amphiprion ocellaris</i> (peixe-palhaço).....	14
1.4	EFEITO DA SALINIDADE NOS ORGANISMOS AQUÁTICOS.....	15
1.5	ENZIMAS DIGESTIVAS.....	16
1.6	OBJETIVOS.....	16
1.6.1	Objetivo geral	16
1.6.2	Objetivos específicos	17
2	ARTIGO CIENTÍFICO	18
2.1	INTRODUÇÃO.....	18
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.2.1	Manutenção dos reprodutores	20
2.2.2	Manutenção das larvas e delineamento experimental	21
2.2.3	Análise de enzimas digestivas	22
2.2.3.1	Extrato enzimático.....	23
2.2.4	Análise estatística	24
2.3	RESULTADOS	24
2.3.1	Qualidade de água	24
2.3.2	Sobrevivência e crescimento larval	24
2.3.3	Metamorfose	26
2.3.4	Atividade da Tripsina, Quimotripsina e Amilase	27
2.4	DISCUSSÃO.....	28
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS DO ARTIGO	31
	REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL	34

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 COMÉRCIO DE PEIXES ORNAMENTAIS

A indústria da aquariofilia é um setor que apresenta um crescimento vertiginoso, sendo considerado altamente lucrativo (WOOD, 2001; TLUSTY, 2002). As exportações mundiais de peixes ornamentais aumentaram de US\$ 177,7 milhões para US\$ 364,9 milhões no período de 2000 a 2011, declinando para US\$ 347,5 milhões em 2014 (DEY, 2016). Dessa forma, percebe-se que mesmo com oscilações monetárias ainda é um mercado lucrativo. Os peixes ornamentais marinhos constituem mais de 15% do mercado em termos de valor.

De forma geral, esse comércio envolve diversos países em todo o mundo (MADDUPPA *et al.*, 2014), com um total de 125 países (DEY, 2016). O número representativo de países envolvidos nesse comércio deve-se à crescente popularidade dos aquários marinhos, refletindo diretamente no aumento da captura de espécies selvagens e consequente preocupação com a depleção dos estoques naturais (MADHU *et al.*, 2006). Além disso, há preocupação com a destruição das áreas recifais em virtude da utilização de métodos inadequados de captura, tais como cianeto e explosivos (SAILA; KOCIC; MANUS, 1993). Neste contexto, algumas espécies de peixes ornamentais marinhos tornam-se alvo de intensa atividade relacionada à captura, para sustentar a crescente demanda do mercado.

No Brasil, o comércio da aquariofilia também segue em ascensão devido ao aumento da demanda mundial (LIMA; BERNADINO; PROENÇA, 2001). Em 2007, o país foi considerado o 18º exportador mundial de peixes ornamentais, sendo o Amazonas e o Pará responsáveis por mais de 95% das exportações de peixes de água doce, oriundos de cultivo (RIBEIRO *et al.*, 2008). Diferente deste comércio, a maioria dos exemplares (98%) de peixes ornamentais marinhos é proveniente de captura em ambiente natural e somente 2% origina-se de cultivo (DEY, 2016).

Um dos entraves para a comercialização de peixes ornamentais é a necessidade de maior organização por meio da criação de cooperativas, associações ou condomínios de produtores, visando aumentar a margem de lucros do cultivo (ZUANON; SALARO; FURYA, 2011). Além disso, Faria (2018) cita que o mercado está cada vez mais exigente por animais saudáveis, com cores vivas e formatos diferenciados. Desta forma, a produção em cultivo vem ganhando seu espaço para atender o mercado, visando a produção lucrativa, o desenvolvimento social, conservação do meio ambiente e dos peixes ornamentais.

1.2 CULTIVO DE PEIXES ORNAMENTAIS

O cultivo de peixes ornamentais é uma atividade que vem se expandindo (PALMA *et al.*, 2008), tornando a piscicultura ornamental marinha uma das mais promissoras dentro da aquicultura (KODAMA *et al.*, 2011) uma vez que, além de constituir uma atividade interessante do ponto de vista econômico por apresentar características que favorecem a geração de trabalho e renda para pequenos empreendedores (KODAMA *et al.*, 2011), também contribui para a sustentabilidade dos estoques naturais das várias espécies cultivadas (WABNITZ; TAYLOR; RAZAK, 2003). Nos Estados Unidos a produção de peixes ornamentais é o quarto setor em termos econômicos dentro da aquicultura, perdendo somente para o cultivo de bagre, truta e salmão (TLUSTY, 2002).

No Brasil os produtores ornamentais marinhos mais representativos do setor são: Peixepalhaço.com, Azul FishFarm, Ari dos Palhaços, Eco Reef e Aqua King, localizados no estado de São Paulo (MEDEIROS, 2013). No Nordeste, a Piscicultura de Tanganyika e se destaca, trabalhando com aproximadamente 162 espécies ornamentais entre dulcícolas e marinhas (FARIA *et al.*, 2016).

Percebe-se que a produção no Brasil ainda se mostra incipiente por estar limitada a algumas regiões, o que é contrastante para um país que tem grande potencial para cultivo de organismos aquáticos, por possuir um vasto território e uma considerável zona costeira. Isto reforça, portanto, a importância de desenvolver mais pesquisas direcionadas para cultivo de peixes ornamentais marinhos no país.

Atualmente, no país, existem instituições de ensino que atuam na área da pesquisa com a produção de ornamentais marinhos, entre elas a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a Universidade Federal do Rio Grande (FURG), a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE):

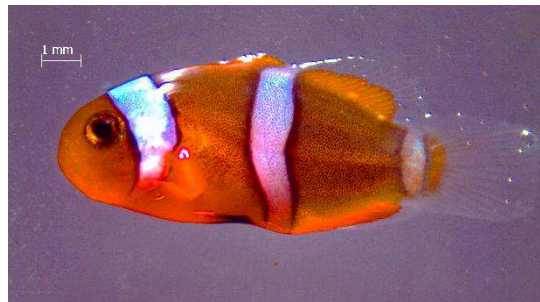
Atualmente os avanços na pesquisa têm gerado conhecimento e tecnologia para a produção em cultivo de diversas espécies aquáticas ornamentais, difundindo assim a informação e contribuindo com o avanço do setor (FARIA, 2018). Entretanto, ainda são necessários estudos para melhorar as técnicas de cultivo relacionadas à nutrição, crescimento e sobrevivência, assim como o efeito de fatores abióticos, contribuindo para fechar pacotes tecnológicos para diferentes espécies.

1.3 *Amphiprion ocellaris* (peixe-palhaço)

Peixes-palhaço ou “anemonefish” são recifais, originários do Indo-Pacífico, conhecidos por apresentarem relação de simbiose com algumas espécies de anêmonas. Pertencem à família Pomacentridae, composta por 30 espécies, das quais 29 são do gênero *Amphiprion* e apenas uma do gênero *Premnas* (THORNHILL, 2012). Essa espécie é hermafrodita protândrica (BUSTON, 2003), cujas gônadas funcionam inicialmente como masculinas (VAZZOLER, 1996). Além disso existe uma hierarquia de dominância dentro dos grupos baseado no tamanho, onde a fêmea apresenta tamanho maior, enquanto que o segundo maior do grupo é o macho funcional (BUSTON, 2003).

A. ocellaris (Figura 1) é uma espécie que apresenta cores vibrantes, normalmente laranja, com três bandas brancas, sendo a do meio um pouco mais acentuada em comparação às demais (FAUTIN; ALLEN, 1992). São exemplares de pequeno porte, fascinante comportamento e fácil adaptação ao cultivo (MADHU *et al.*, 2006; AVELLA *et al.*, 2007). É uma das espécies mais populares no mercado da aquariofilia, e um dos primeiros peixes marinhos ornamentais a serem cultivados.

Figura 1 - Exemplar de *Amphiprion ocellaris* utilizado na pesquisa.



Fonte: autor

Em 2003, o lançamento e sucesso mundial do filme “Procurando Nemo” nos Estados Unidos, contribuiu para que o peixe-palhaço se tornasse uma das espécies mais populares no aquarismo marinho e isto resultou no aumento da demanda de mercado e conseqüentemente a exploração deste peixe em ambiente natural (WABNITZ; TAYLOR; RAZAK, 2003). Neste sentido, os programas de reprodução em cultivo podem contribuir para mudar esse cenário de pressão sobre muitas espécies ornamentais, entre elas o peixe-palhaço, além de promover o crescimento da indústria de aquarismo em nível mundial (WULILIAN, 2009).

O peixe-palhaço é uma das espécies alvo de muitas pesquisas, especialmente sobre melhores condições para sua produção em cultivo, haja visto que, apresenta grande importância dentro do comércio de peixes ornamentais marinhos (FAUTIN; ALLEN, 1992). A determinação de melhores parâmetros ambientais para o cultivo, dentre outros fatores, pode otimizar taxas de crescimento e sobrevivência, reduzindo o período de larvicultura e os custos de produção (HART; HUTCHINSON; PURSER, 1996).

1.4 EFEITO DA SALINIDADE NOS ORGANISMOS AQUÁTICOS

O desenvolvimento e o crescimento de peixes são controlados por fatores internos como o sistema nervoso central (SNC), endocrinológico e neuroendócrinos (BOEUF; PAYAN, 2001) e fatores ambientais como a salinidade, a temperatura e o fotoperíodo (HART; HUTCHINSON; PURSER, 1996; BOEUF; PAYAN, 2001; KAMLER, 2002). Assim, estudos sobre como estes parâmetros podem afetar os animais são de extrema importância para o aprimoramento do cultivo de peixes, maximizando o crescimento, a sobrevivência larval, a redução de período de cultivo e assim os custos produtivos (BOEUF; PAYAN, 2001; HART; HUTCHINSON; PURSER, 1996).

Diversos estudos mostram que a salinidade influencia o desenvolvimento dos peixes em diferentes estágios da vida, desde a sobrevivência e o crescimento larval (TSUZUKI *et al.*, 2000; BOEUF; PAYAN, 2001; TSUZUKI *et al.*, 2007; HORA *et al.* 2016), a fertilização e a incubação de ovos (GRIFFIN *et al.*, 1998), o desenvolvimento de juvenis e de adultos (RESLEY; WEBB; HOLT., 2006; LIN; ZHANG; LIN, 2009), o consumo de oxigênio (PETERSON-CURTIS, 1997; TSUZUKI; STRÜSSMANN; TAKASHIMA, 2008), a conversão alimentar (IMSLAND *et al.*, 2001) até o comportamento (PETERSON-CURTIS, 1997).

Estudos sobre o efeito da salinidade em peixes-palhaços *Amphiprion* sp. já foi avaliado no crescimento, na natação e na metamorfose larval (ARVEDLUND, LARSEN, WINSOR, 2000; GREEN; FISHER, 2004; DHANEESH *et al.*, 2012; YE *et al.*, 2009; MEDEIROS, 2013). Contudo, estudos para avaliar o efeito da salinidade sobre as atividades de enzimas digestivas em *Amphiprion ocellaris* ainda não foram realizados.

1.5 ENZIMAS DIGESTIVAS

As enzimas digestivas são proteínas globulares que funcionam como catalisadores com o objetivo de aumentar a velocidade das reações químicas no organismo, controlando quase todos os processos que ocorrem nas células (NELSON; COX, 2018).

Neste sentido a caracterização das proteases digestivas é importante por permitir o conhecimento sobre as condições ótimas para que estas atinjam a atividade máxima (SIMPSON, 2000). É sabido que a alimentação da espécie em conjunto com o seu hábito alimentar pode influenciar de maneira positiva ou negativa no perfil da atividade dessas enzimas. Além destes fatores, a sua correta caracterização mostra o efeito que as condições ambientais têm sobre a espécie estudada (ÁLVAREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

A salinidade pode afetar as atividades de enzimas digestivas e interferir no desenvolvimento dos peixes (MOUTOU; PANAGIOTAKI; MAMURIS, 2004), em virtude da alteração no conteúdo do trato intestinal e digestibilidade do alimento (WANG *et al.*, 1997). Quando submetido à diferentes salinidades, o peixe pode apresentar um gasto energético para a osmorregulação numa tentativa de equilibrar o meio interno com o externo (BOEUF; PAYAN, 2001). No entanto, caso esteja em um meio cuja salinidade seja similar ao do seu meio interno, essa energia não seria gasta para a osmorregulação, sendo alocada então para o crescimento.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo de avaliar o efeito de diferentes salinidades no desenvolvimento de peixe-palhaço *A. ocellaris* e verificar se a atividade das enzimas digestivas é afetada pela variação deste parâmetro. O presente trabalho contribuirá com informações para o aprimoramento da técnica de cultivo desta espécie, altamente valorizada pelo mercado da aquariofilia.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Aprimorar a tecnologia para o cultivo do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*, através da determinação da salinidade ideal para a larvicultura.

1.6.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sobrevivência e o desempenho zootécnico de larvas em diferentes salinidades;
- Verificar o efeito da salinidade na expressão de atividade das enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase) nas larvas.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM *Amphiprion ocellaris*

Este trabalho avaliou a sobrevivência, o crescimento e a expressão de enzimas digestivas na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* em diferentes condições salinas (14, 21, 28 e 35‰). Portanto, foram testadas quatro salinidades, em triplicata, com animais com 3 dias após a eclosão (DAE) até o 23º DAE (período em que completaram 100% da metamorfose, quando surge a terceira e última banda corporal). No início e ao final do experimento foram coletadas larvas em cada tratamento para medição dos parâmetros zootécnicos e análise de enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase). Os resultados mostraram melhor crescimento (peso, comprimento, comprimento diário, ganho em peso), especialmente quando comparado a 14‰, e maior atividade da amilase, na salinidade de 35‰. Apesar disto, nas salinidades de 14 a 28 ‰, peixes mostraram crescimento e boas taxas de sobrevivência, viabilizando assim o cultivo das larvas de *Amphiprion ocellaris* nestas condições. O cultivo de *A. ocellaris* em salinidades mais baixas pode contribuir consideravelmente com a redução dos custos de produção, uma vez que o processo de salinização da água apresenta alto custo para os produtores que não tem acesso à água do mar.

Palavras-chave: Peixes ornamentais marinhos. Fator abiótico. Cultivo.

2.1 INTRODUÇÃO

O mercado da aquariorfilia faz parte de um mercado maior denominado “Mercado Pet”, um segmento econômico que tem crescido em todo o mundo. O Brasil, em 2015, ocupou o terceiro lugar nesta atividade, só não conseguindo a segunda posição por causa da desvalorização do real frente ao dólar. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), o setor movimentou 16,7 bilhões em faturamento no ano de 2014. O Brasil está atrás apenas dos Estados Unidos (41,8%) e do Reino Unido (6,5%), com 6,3% do mercado mundial, que movimentou nada menos que U\$ 100,4 bilhões (FARIA *et al.*, 2016).

O comércio desses organismos, como um todo, incluindo os equipamentos e acessórios, tornou-se multibilionário e significativo no mercado internacional sendo que no mercado da aquariorfilia mundial, estima-se que os peixes ornamentais marinhos oriundos de cultivo representem apenas de 1 a 10% (MOORHEAD; ZENG, 2010). Entretanto segundo Kodama *et al.* (2011) a piscicultura ornamental marinha é uma atividade promissora que vem crescendo dentro da aquicultura, colaborando com a diminuição da captura dos estoques em ambiente natural.

Das mais de 84 espécies de peixes ornamentais cultivadas no mundo, 26 pertencem à família Pomacentridae (ARVEDLUND; LARSEN; WINSOR, 2000), na qual encontram-se os peixes-palhaço. Essa família é composta por 30 espécies catalogadas, 29 do gênero *Amphiprion* e apenas uma do gênero *Premnas* (THORNHILL, 2012). Os peixes-palhaço do gênero *Amphiprion* são bastante apreciados para a aquariofilia devido a sua coloração predominantemente laranja ou vermelha, apresentando diferenças em termos de tom de cor, brilho e saturação (HEKIMOGLU *et al.*, 2017).

Com aumento do interesse por peixes ornamentais marinhos, há uma crescente demanda pela produção de peixes-palhaço oriundos da aquicultura. Com isso, novas técnicas de cultivos vêm surgindo, ou vem sendo aprimoradas visando aperfeiçoar a produção. Sabe-se que a influência de fatores abióticos como salinidade, temperatura, fotoperíodo, cor do tanque, luminosidade, pH, oxigênio, entre outras, podem influenciar de diversas formas o desenvolvimento de peixes. Sendo assim, os estudos dos parâmetros ambientais são de extrema importância para o aprimoramento das técnicas de larvicultura de peixes, contribuindo com o crescimento e a sobrevivência larval, além da redução do período de cultivo e dos custos produtivos (BOEUF; PAYAN, 2001; HART; HUTCHINSON; PURSER, 1996).

A temperatura, o fotoperíodo e a salinidade são parâmetros variáveis e estão entre os mais importantes na ontogenia de peixes em laboratório e em sistemas de cultivo (HART; HUTCHINSON; PURSER, 1996; KAMLER, 2002). Esses parâmetros têm sido investigados para avaliar os impactos na sobrevivência, crescimento, nataçãõ e metamorfose na larvicultura das espécies do gênero *Amphiprion* sp. (ARVEDLUND; LARSEN; WINSOR, 2000; GREEN; FISHER, 2004; YE *et al.*, 2009).

A salinidade se destaca como um parâmetro abiótico de suma importância, pois influencia o desenvolvimento dos peixes em diferentes estágios da vida, desde o crescimento larval até a fase de juvenis e de adultos (BOEUF; PAYAN, 2001). A variação de salinidade em peixes marinhos e estuarinos pode afetar negativamente o crescimento e a sobrevivência das espécies (BOEUF; PAYAN, 2001; HORA *et al.*, 2016), quando o nível de salinidade não é o ideal para a realização das atividades metabólicas. Alguns trabalhos também têm apontado que, a exposição de peixes a diferentes salinidades pode influenciar a atividade das enzimas digestivas pelo efeito da salinidade sobre o conteúdo do intestino, e desta forma afetar a performance do crescimento (WANG *et al.*, 1997, TSUZUKI *et al.*, 2007). Isto ocorre em função de um maior gasto para a osmorregulação que pode variar de 10 a 50%, objetivando manter a concentração adequada de sais nos fluidos corpóreos (BOEUF; PAYAN, 2001). Neste

sentido, estudos sobre o efeito da salinidade na sobrevivência e crescimento de espécies aquáticas é necessário por fornecer informações básicas e essenciais para o sucesso do cultivo.

Desta forma, o presente trabalho tem o objetivo de verificar o efeito de diferentes níveis salinos sobre a sobrevivência, o desenvolvimento e a atividade de enzimas digestivas do peixe-palhaço *A. ocellaris*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob autorização do Comitê de Ética e Uso de Animais CEUA – UFSC N° 6177250219.

2.2.1 Manutenção dos reprodutores

Os reprodutores de peixe-palhaço *A. ocellaris* usados neste experimento foram mantidos em dois tanques-rede, acomodados dentro de um tanque de 8.000 L ligados a um sistema de recirculação fechada de água do mar. A água do sistema de recirculação vem por ponteira da praia de Moçambique, Florianópolis, SC. e passa por um tratamento com as seguintes etapas: filtro de areia, skimmer, mídias biológicas e filtro ultravioleta (UV) e aquecimento em trocador de calor. A água chega aos tanques de 8.000 L, com temperatura de 25,5 - 27°C e salinidade 29 - 33‰.

As matrizes foram alimentadas três vezes ao dia, até a saciedade aparente, com alimentação variada (ração comercial para peixes ornamentais marinhos e um patê composto de peixe, lula, mexilhão, ova de peixe e camarão preparado no próprio laboratório) visando otimizar a reprodução.

Dois vasos de barro serviram como substrato para as desovas dos reprodutores. Após a verificação das mesmas, que ocorreram no mesmo dia, esperou-se um período de 6 a 7 dias até que estivessem próximos a eclosão, então os vasos com os ovos foram retirados para serem incubados em aquário com aeração moderada constante, até a eclosão dos ovos. A temperatura de incubação foi mantida em $26 \pm 0,7^\circ\text{C}$ (média \pm desvio padrão), controlada com climatizador de ar na sala de cultivo, sendo aferida uma vez ao dia com termômetro de mercúrio (precisão de $0,1^\circ\text{C}$) e a salinidade mantida em $33 \pm 1\%$, medida uma vez ao dia utilizando refratômetro (Modelo RTS-101 ATC).

2.2.2 Manutenção das larvas e delineamento experimental

Após a eclosão, as larvas foram mantidas em um aquário de 20 L, alimentadas três vezes ao dia com rotíferos *Brachionus* sp. a uma densidade de 20 rot/mL. No 3^oDAE, as larvas foram transferidas com auxílio de beakers de 100mL, para as unidades experimentais (recipientes de 15 L, volume útil de 8 L) que continham água na mesma salinidade e temperatura do aquário inicial onde estavam as larvas, afim de evitar choque osmótico e térmico.

Foram testados quatro tratamentos com diferentes salinidades: 14, 21, 28 e 35‰, em triplicata. Para aclimação às diferentes salinidades, utilizou-se um sistema com a água previamente preparada em cada salinidade experimental, armazenada em uma vasilha acima das unidades experimentais, sendo gotejada a uma taxa de diminuição de salinidade de 1,5 a 2‰ por hora até que se atingisse a salinidade final. Para se chegar a salinidade de 35‰ adicionou-se água a 37‰, também por gotejamento, até alcançar a salinidade desejada. Assim, o tempo total necessário para todos os tratamentos atingirem a salinidade experimental desejada foi de aproximadamente 12 horas. O fotoperíodo foi mantido em 16L/8E. A densidade de estocagem utilizada foi de 50 larvas por unidade experimental (6,25 larvas L).

Para alimentação das larvas, do 3^o ao 5^o DAE foi ofertado o rotífero *Brachionus* sp. na densidade de 5 rot/mL, enriquecido com produto comercial Epiffed[®]-LHF, de acordo com a metodologia do fabricante. A partir do 6^o dia, iniciou-se a transição alimentar onde a densidade alimentar usada a partir do 6^o dia até o 18^o foi de 5 alimentos vivo/mL, ofertado na proporção de 75% de rotífero e 25% *Artemia* sp. no 7^o dia, 50% rotífero e 50% de *Artemia* sp.; no 8^o dia, 25% de rotífero e 75% de *Artemia* sp.; e a partir do 9^o dia, 100% de *Artemia* sp. A partir do 19^o dia, iniciou-se a ofertada da ração INVE Desmame S-Park com 7% da biomassa e a *Artemia* sp. na densidade de 3 ind/mL, três vezes ao dia.

Os rotíferos utilizados para alimentar as larvas do experimento foram cultivadas utilizando o produto comercial Epiffed[®]-LHF (Epicore Networks, USA) de acordo com a metodologia do fabricante a salinidade da água de cultivo ficou mantida em 26 e a temperatura em 26°C. As *Artemias* sp. foram obtidas a partir da eclosão de cistos (INVER Aquaculture, EUA) os quais foram incubados em recipientes com volume de 5 litros de água, sendo usado 1 grama de cisto para 1 litro de água, a salinidade da água foi mantida em 35 e a temperatura em 28°C.

Diariamente, antes da primeira alimentação, as unidades experimentais eram sifonadas uma vez ao dia, para remover restos de alimento e fezes do fundo, e a água era repostada com água previamente preparada um dia anterior, na salinidade ideal de cada tratamento. A taxa de

renovação de água nos primeiros dias foi de 30% para evitar manejo excessivo e estresse aos animais, sendo a mesma aumentada diariamente até chegar a 70%, com objetivo de retirar o máximo possível restos de alimento e manter a qualidade de água das unidades experimentais.

Quando finalizada a reposição de água de todas as unidades, uma amostra de aproximadamente 20 mL de água de cada unidade experimental era coletada para fazer a contagem de alimento vivo residual, com intuito de manter a densidade de rotíferos e *Artemia* sp. A alimentação foi ofertada três vezes ao dia, a primeira pela manhã (10:00h) e as outras duas no período da tarde (14:00 e 18:00h).

O experimento iniciou com larvas no 3º Dia Após a Eclosão (DAE) e foi encerrado no 23º DAE (período em que completaram 100% da metamorfose, quando surge a terceira e última banda corporal).

Para a biometria no início do experimento (3ºDAE) foram amostrados um total de 5 larvas e ao final (23ºDAE) foram amostrados o total de 48 animais (12 por tratamento). As larvas foram capturadas aleatoriamente e eutanasiadas com óleo de cravo (1,5mL/L). Em seguida foram fotografadas na lupa (Leica, LAS EZ4HD, GER) e medidos através de programa de computador (Leica, LAS EZ, GER) e pesadas em balança analítica. Após biometria, as larvas foram armazenadas em tubos Eppendorf com água destilada e mantidas a -18° C.

A partir dos dados biométricos foram calculadas:

- Taxa de Crescimento Específico em peso (TCE, %dia): $TCE=100x [(ln\text{peso final} - ln\text{peso inicial}) / \text{tempo}]$;
- Fator de Condição (FC): $FC=\text{Peso}/\text{Altura}^3$;
- Ganho de Peso: $GP= (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}$;
- Sobrevivência (S%): $100x [(\text{número de sobreviventes no dia}) / (\text{número de larvas inicial} - \text{número de juvenis amostrados no dia})]$.

2.2.3 Análise de enzimas digestivas

A análise de determinação enzimática foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos, UFSC.

2.2.3.1 Extrato enzimático

Para obtenção do extrato enzimático foram utilizadas 48 larvas inteiras (12 por tratamento) as quais foram manualmente maceradas inteiras em Eppendorf com auxílio de um pistilo em 1 mL de água de milli-Q. As larvas foram maceradas inteiras devido ao tamanho das mesmas. O homogeneizado foi centrifugado a 12000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante a ser usado para realização das análises enzimáticas foi coletado e armazenado a -20°C até posteriores análises.

A atividade de quimotripsina foi testada com o substrato N-succinil-alanil-alanil-proil-fenilalanil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNa) e a atividade de tripsina determinada a partir do substrato N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina (bz-R-pNa). Os ensaios foram realizados de acordo com Erlanger, Kokowsky e Cohen (1961) e Delmar *et al.* (1979). Para tanto, utilizou-se 0,05 mL do homogeneizado e 0,05 mL do substrato a uma concentração final em meio de reação de 1 mM em tampão fosfato de sódio dibásico 100 mM (pH 7,8). Alíquotas de 0,05mL do sobrenadante e substrato-tampão foram recolhidas para placa de 96 poços e as absorbâncias lidas a 410 nm no aparelho de leitura Tecan (Infinitepro, Califórnia, EUA). A unidade de atividade (U) de enzima definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μmol de substrato^{-min}, determinadas a partir da curva padrão de *p*-nitroanilina. As reações das atividades de quimotripsina e tripsina foram lidas em quatro intervalos de tempo (30, 60, 90 e 120min) e (120, 240, 360 e 480 min) respectivamente em temperatura de 30°C.

A atividade amilásica foi determinada de acordo com o protocolo adaptado de Noeltinge Bernfeld (1948), analisada através da detecção da presença de grupos redutores na reação com o ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS). O substrato preparado com solução de amido 1% em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,5). Para os ensaios foram utilizados 0,025 mL do substrato-tampão e 0,025 mL do homogeneizado. As amostras foram incubadas em banho-maria 30°C, e posteriormente testadas em quatro tempos (60, 120, 180 e 240 min.). A interrupção da reação foi realizada adicionando 0,1 mL de DNS. Após a última interrupção, todos os tubos que continham as amostras foram cobertos com papel de alumínio e aquecidos a 100°C por 5 min, e posteriormente adicionados 0,1 mL de água destilada e agitada em vórtex. As leituras foram realizadas em microplaca em absorbância de 550 nm no equipamento TECAN (Infinitepro, Califórnia, EUA). A atividade da amilase foi calculada em mili unidades (mU), que equivale a 1 μmol de glicose formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de glicose.

2.2.4 Análise estatística

Após verificada a homocedasticidade (teste de Lavene) e a homogeneidade dos dados, estes foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com nível de significância de 5%. Quando detectada diferença, foi utilizado o teste de Tukey para comparação entre médias. Aos dados em percentual (taxa de sobrevivência e metamorfose) foi aplicado a transformação angular, antes de serem analisados. A análise estatística foi realizada através do software Statistic 2007 e os resultados foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão (DP).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Qualidade de água

As salinidades nos sistemas de 14, 21, 28 e 35‰, mantiveram-se respectivamente (14,15 \pm 0,67‰; 21,16 \pm 1,24; 28‰, 27,76 \pm 0,62; 35‰, 34,96 \pm 0,56). Em relação a qualidade de água a temperatura foi mantida em 26,19 \pm 0,03°C, o oxigênio em 5,96 \pm 0,27mg, e A amônia total ficou entre 0 e 0,25 em todos os tratamentos, o pH ficou entre 7,3 e 8, e o nitrito entre 0 e 0,25 em todos os tratamentos.

2.3.2 Sobrevivência e crescimento larval

A média de sobrevivência das larvas dos peixes-palhaço ao longo do experimento variou de 70,2 a 96,5% (tabela 1). A maior taxa de sobrevivência foi observada na salinidade de 14 e a mais baixa na salinidade de 21‰ (P<0,05), enquanto que nas salinidades de 28 e 35‰ a sobrevivência foi similar e não diferiu entre as demais salinidades.

Ao iniciar o experimento, as larvas com 3 DAE apresentavam o comprimento total de 4,47 \pm 0,33mm. No final dos 21 dias de experimento, os peixes que foram submetidos a salinidade de 35‰ obtiveram um crescimento como comprimento total superior quando comparado somente a 14‰ (P<0,05). As larvas mantidas nas faixas intermediárias de salinidade (21 e 28‰) não apresentaram comprimento diferente quando comparados as demais salinidades (p>0,05).

Tabela 1 - Parâmetros zootécnicos (média \pm DP) durante a larvicultura (21 dias) do peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* em diferentes salinidades.

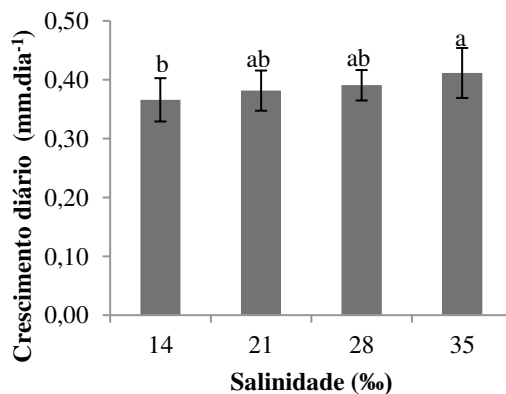
Salinidade (‰)	Sobrevivência (%)	Comprimento (mm)	Fator de condição
14	96,49 \pm 4,01 ^a	12,04 \pm 0,63 ^b	1,74 \pm 0,08 ^{ab}
21	70,18 \pm 7,6 ^b	12,49 \pm 0,72 ^{ab}	1,84 \pm 0,13 ^a
28	77,19 \pm 5,48 ^{ab}	12,67 \pm 0,54 ^{ab}	1,72 \pm 0,09 ^b
35	77,19 \pm 17,12 ^{ab}	13,11 \pm 0,89 ^a	1,85 \pm 0,19 ^a

*Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Com relação ao fator de condição, não houve diferença estatística entre as larvas submetidas nas salinidades de 21 e 35‰, apenas quando comparada às larvas submetidas à salinidade de 28‰ (Tabela 1).

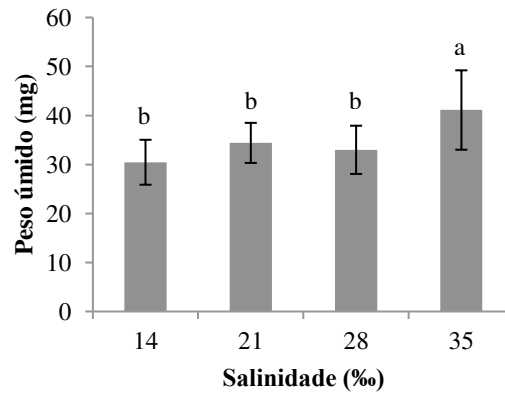
Os dados da taxa de crescimento diário ($\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$) das larvas mostraram diferença significativa entre a menor e a maior salinidade testada, com o melhor crescimento a 35‰ (Figura 2).

Figura 2 - Crescimento diário em comprimento ($\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$) (média \pm DP) de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes salinidades por 21 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos.



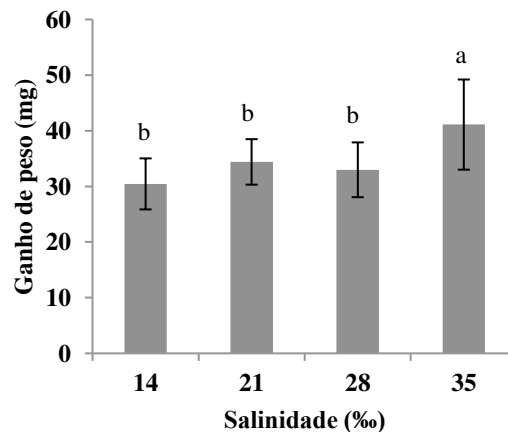
O peso úmido médio inicial foi de 0,7mg e ao final do experimento, este teve um incremento de quase 60 vezes, sendo significativamente maior nas larvas cultivadas na salinidade 35‰, em relação aos demais tratamentos (Figura 3). Este mesmo padrão foi observado para a taxa de crescimento específico em peso, cujas as larvas submetidas a salinidade de 35‰ foi significativamente maior ($17,6 \pm 0,94^a$) em comparação aos demais tratamentos (14‰: $16,35 \pm 0,86^b$; 21‰: $16,81 \pm 0,56^b$; 28‰: $16,76 \pm 0,58^b$).

Figura 3 – Peso úmido (média± DP) por larva de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes salinidades por 21 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos



Em relação ao ganho de peso, foi observado nas larvas maior incremento com diferença significativa para o tratamento de salinidade 35‰, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 4).

Figura 4 – Ganho de peso (média ± DP) por larva de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes salinidades por 21 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos.



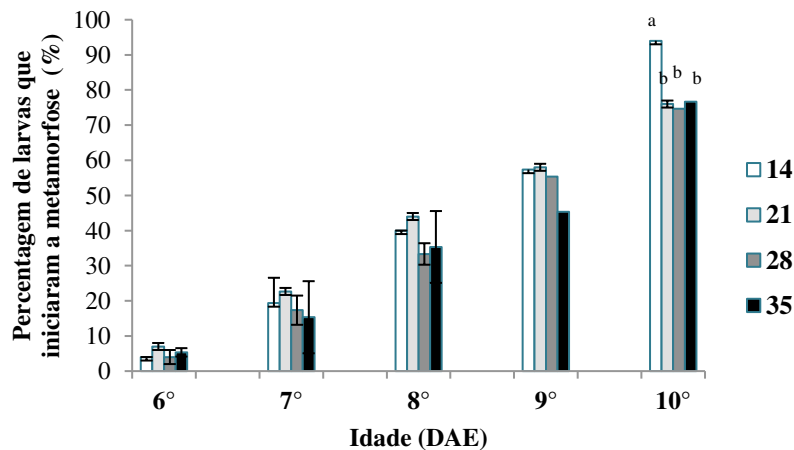
2.3.3 Metamorfose

As larvas de *Amphiprion ocellaris* iniciaram o processo de metamorfose no 6° DAE, em todos os tratamentos, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Com base na figura 5, pode-se observar que no 10° DAE, mais de 70% dos animais já haviam iniciado o processo de metamorfose, e que na salinidade de 14‰, haviam mais animais que haviam sofrido a metamorfose em relação aos demais tratamentos. A partir do 11° DAE tornou-se inviável a contagem das larvas que estavam iniciando o processo de metamorfose, em função do

comportamento de cardume e intensa movimentação das larvas. Todavia, as que faltavam metamorfosear eram de fácil reconhecimento pela falta de coloração nas bandas corporais.

No 14^oDAE foram observadas as primeiras larvas com metamorfose completa nos tratamentos (surgimento da terceira e última banda), sem diferença estatística entre os mesmos. O experimento foi conduzido até que todas as larvas em cada tratamento apresentassem a metamorfose completa, estendendo-se até o 23^o DAE.

Figura 5 - Porcentagem (média \pm DP) de larvas de *Amphiprion ocellaris* iniciando a metamorfose (surgimento da primeira banda) do 6^o ao 10^oDAE (Dias Após a Eclosão) quando submetidas a diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos.

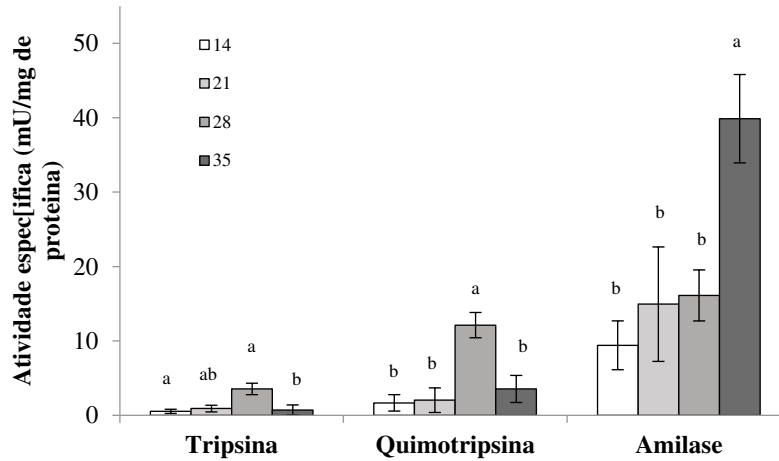


2.3.4 Atividade da Tripsina, Quimotripsina e Amilase

A atividade específica de tripsina, de quimotripsina e de amilase estão representadas na figura 6.

A atividade da tripsina e quimotripsina foi mais alta nas larvas submetidas à salinidade 28‰, sendo que a atividade de tripsina somente não diferiu das larvas submetidas à salinidade 21‰ ($P < 0,05$). Os valores da atividade específica de amilase foram superiores nas larvas submetidas à salinidade de 35‰ em relação às demais salinidades, mostrando um incremento de atividade de até 4 vezes nesta condição em relação a 14‰.

Figura 6 - Atividade específica (média± DP) de tripsina, quimotripsina e amilase de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos.



2.4 DISCUSSÃO

A sobrevivência das larvas encontrada neste trabalho variou de 70,2 a 96,5% entre as salinidades de 14 a 35‰. Pesquisas têm mostrado sobrevivência entre 45 a 95% na larvicultura de peixes-palhaço *Amphiprion* sp. (ARVEDLUND; LARSEN; WINSOR, 2000; MADHU, *et al.*, 2006; OLIVOTTO *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2011; DHANEESH *et al.*, 2012; GHOSH *et al.*, 2012; MEDEIROS, 2013; NASS, 2013). Essa variação na taxa de sobrevivência pode ser atribuída a diversos fatores como diferentes espécies utilizadas, protocolos de manejo, e densidades distintas. A ótima sobrevivência das larvas em todos os tratamentos testados da presente pesquisa pode ser conferida a densidade larval utilizada. Em estudo com outra espécie do gênero *Amphiprion*, Medeiros (2013) utilizou uma densidade de estocagem superior (16,8 peixes.L⁻¹) ao deste estudo (6,25 peixes.L⁻¹), o que pode ter aumentado a competição por alimento e espaço, causando estresse larval, e assim reduzindo a sobrevivência e o crescimento em densidades mais altas.

Além da competição por espaço e alimento, outros fatores podem influenciar o crescimento de peixes teleósteos como o fotoperíodo, a temperatura e a salinidade (BOEUF; PAYAN, 2001). Alguns autores têm estudado o efeito da salinidade sobre crescimento dos peixes (PARTRIDGE; JEKINS 2002; EROLDÖĞAN; KUMLU; AKTAS, 2004; MARTINEZ-PALÁCIOS *et al.*, 2004; WADA; ARITAK; TANAKA, 2004).

Nas condições do presente estudo, de forma geral, os melhores resultados de desempenho zootécnico (comprimento, crescimento diário, peso úmido e ganho de peso) foram

observados nas larvas submetidas a salinidade mais alta (35‰). Alguns peixes marinhos toleram a variação de salinidade, entretanto parte da energia metabólica que poderia ser investida no desempenho zootécnico, passa a ser usada no processo osmorregulatório (MARAIS, 1978; MOSER; MILLER, 1994), o que pode justificar menor desempenho zootécnico nas larvas que foram submetidas à salinidades mais baixas, em especial a 14‰.

Os resultados do presente estudo indicam que, nas condições testadas, a salinidade mais indicada para a larvicultura de *A. ocellaris* seria 35‰, salinidade em que este peixe é naturalmente encontrado.

A salinidade não teve influência na porcentagem de larvas que iniciaram a metamorfose nos diferentes tratamentos no 6ºDAE, sendo que a partir do 10ºDAE, mais de 70% já tinham dado início a este processo. De forma geral, o início da metamorfose das larvas neste experimento ocorreu mais cedo quando comparado a outros estudos como Madhu *et al.* (2006) e Olivotto *et al.* (2011), que observaram que as larvas de *A. ocellaris* iniciaram este processo entre os dias 9-10 e 9-12, respectivamente, três dias mais tarde do que neste estudo. Apesar desta diferença, no presente estudo, as larvas finalizaram o processo de metamorfose ao mesmo tempo, independente da salinidade testada.

A salinidade parece não ter afetado de forma clara a atividade da quimotripsina e da tripsina, entretanto, maior atividade da amilase ocorreu em 35 ‰. Este aumento da atividade da amilase foi acompanhado pelo maior desempenho zootécnico nesta salinidade. De acordo com Moutou, Panagiotaki e Mamuris (2004), a salinidade pode influenciar a atividade de enzimas digestivas, afetando o desempenho dos animais.

A baixa atividade de proteases e alta atividade da amilase encontrada na presente pesquisa podem estar relacionadas ao hábito alimentar da espécie em estudo, considerada onívora (Khoo *et al.* 2018) pois em ambiente natural consome grande variedade de presas entre crustáceos, copépodes, larvas de tunicados e algas (FAUTIN; ALLEN 1992). Espécies onívoras e herbívoras possuem baixa atividade de proteases e alta de amilase em comparação aos carnívoros (HIDALGO; UREA; SANZ, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo os resultados mostraram melhor peso e ganho de peso, e maior atividade da amilase nas larvas submetidas a salinidade de 35‰. Entretanto as larvas submetidas as salinidades de 14 a 28 ‰ os peixes mostraram bom crescimento e boas taxas de sobrevivência,

viabilizando assim o cultivo das larvas de *Amphiprion ocellaris* nestas condições. Contudo deve-se levar em consideração que para as larvas submetidas a salinidade de 14‰ tem uma perda em crescimento de 8.16% o equivalente a 1.07mm.

O cultivo de *A. ocellaris* em salinidades mais baixas pode contribuir consideravelmente com a redução dos custos de produção, uma vez que o processo de salinização da água pode ter um custo alto para os produtores que não tem acesso à água do mar.

Neste sentido mais estudos são necessários para avaliar a influência da salinidade sobre a espécie *A. ocellaris*, em outras fases de cultivo (juvenil até adulto).

O prosseguimento desta pesquisa se faz necessário devido ao grande potencial de cultivo que a espécie apresenta, a fim de desenvolver um pacote tecnológico para aumentar sua produção em cativeiro.

REFERÊNCIAS DO ARTIGO

- ARVEDLUND, M.; LARSEN, K.; WINSOR, H. The embryonic development of the olfactory system in *Amphiprion melanopus* (Perciformes: Pomacentridae) related to the host imprinting hypothesis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, Cambridge, v. 80, n. 6, p. 1103-1109, 2000.
- BOEUF, G; PAYAN, P. How should salinity influence fish growth?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [S. l.], v. 130, n. 4, p. 411-423, 2001.
- DELMAR, E. G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J. W.; GEOKAS, M. C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, California, v. 99, n.1, p. 316-320, 1979.
- DHANEESH, K. V.; KUMAR, T. T. A.; SWAGAT, G.; BALASUBRAMANIAN, T. Breeding and mass scale rearing of clownfish *Amphiprion percula*: feeding and rearing in brackishwater. *Chinese journal of oceanology and limnology*, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 528-534, 2012.
- ERLANGER, B. F.; KOKAWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substances of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.
- EROLDOGAN, O. T.; KUMLU, M.; AKTAS, M. Optimum feeding rates for European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. reared in seawater and freshwater. *Aquaculture*, [S. l.] v. 231, p. 501–515, 2004.
- FARIA, P. M. C.; RIBEIRO, K.; ALMEIDA, C. F.; SANTOS, R. F. B.; SANTOS, F. W. M. Produtores de ornamentais: O perfil dos aquicultores que abastecem o mercado. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, n. 158, 2016.
- FAUTIN, D. G.; ALLEN, G. R. **Field guide to anemone fishes and their host sea anemones**. Australia: Waestern Australian Museum. p.65, 1992.
- KHOO, M. L.; DAS, S. K.; GHAFFAR, Mazlan Abd. Gastric Emptying and the Enzymatic Activity in the Stomach of *Amphiprion Ocellaris* Fed on Artificial Diet. **Sains Malaysiana**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 1-6, 2018.
- GREEN, B. S.; FISHER, R. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 299, n.1, p.115–132, 2004.
- GHOSH, S.; KUMAR, T. T. A.; NANTHINIDEVI, K.; BALASUBRAMANIAN, T. 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**, [S. l.], v.3, p. 56-60, 2012.
- 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*, Günther, 1862). **Aquaculture**, [S. l.], v. 144, n.4, p. 303-311, 1996.

HEKIMOĞLU, M. A.; FIRAT, K.; SAKA, Ş.; SÜZER, C.; KOP, A.; DURMAZ, Y. Effect of Supplemented Algal Carotenoid Diets on Skin Color of Tomato Clownfish, *Amphiprion frenatus*. **Pakistan Journal of Zoology**, [S. l.], v. 49, n. 2, p. 663-668, 2017.

HIDALGO, M. C.; UREA, E; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, [S. l.], v. 170, n. 3-4, p. 267-283, 1999.

HORA, M. D. S. C. D.; JOYEUX, J. C.; DE SOUSA-SANTOS, L. P.; GOMES, L. C.; RODRIGUES, R. V. Tolerance and growth of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* at different salinities. **Aquaculture**, [S. l.], v. 463, p. 1-6, 2016.

KAMLER, E. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Nova York, v.12, p.79–103, 2002.

KODAMA, G.; ANNUNCIACÃO, W. F.; SANCHES, E. G.; GOMES, C. H. D. A. M.; TSUZUKI, M. Y. Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 61-72, 2011.

MADHU, K.; MADHU, R.; KRISHNAN, L.; SASIDHARAN, C. S.; VENUGOPAL, K. M. Spawning and larval rearing of *Amphiprion ocellaris* under captive condition. **Marine Fisheries Information Service, Technical and Extension Series**, Cochin, v. 188, p. 1-5, 2006.

MARAIS, J. F. K. Routine oxygen consumption of *Mugil cephalus*, *Liza dumerili* and *L. richardsoni* at different temperatures and salinities. **Marine Biology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 9-16, 1978.

MARTINEZ-PALÁCIOS, C. A.; MORTE, J.C.; TELLO-BALLINAS, J.A.; TOLEDO-CUEVAS, M.; ROSS, L.G. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). **Aquaculture**, [S. l.], v. 258, p. 509-522, 2004.

MEDEIROS, A. F. **Desenvolvimento de larvas do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*: efeito da salinidade e da temperatura**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MOORHEAD, J. A.; ZENG, C. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. **Reviews in Fisheries Science**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 315-343, 2010.

MOSER, M. L.; MILLER, J. M. Effects of salinity fluctuation on routine metabolism of juvenile spot, *Leiostomus xanthurus*. **Journal of Fish Biology**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 335-340, 1994.

MOUTOU, K. A.; PANAGIOTAKI, P.; MAMURIS, Z. Effects of salinity on digestive protease activity in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.: a preliminary study. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 912-914, 2004.

NASS, D. H. **Efeito da antecipação da oferta de *Artemia* na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii***. 2013. 41 f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

- NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, [S. l], v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.
- OLIVOTTO, I.; BUTTINO, I.; BORRONI, M.; PICCINETTI, C. C.; MALZONE, M. G.; CARNEVALI, O. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. **Aquaculture**, [S. l], v. 284, n. 1-4, p. 211-216, 2008.
- OLIVOTTO, I.; DI STEFANO, M.; ROSETTI, S.; COSSIGNANI, L.; PUGNALONI, A.; GIANTOMASSI, F.; CARNEVALI, O. 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 Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S. l], v. 159, n. 3, p. 207-218, 2011.
- PARTRIDGE, G. J.; JENKINS, G. I. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri*. **Aquaculture**. [S. l], v. 210, n. 219–230, 2002.
- THORNHILL, D. J. **Ecological Impacts and Pratices of the Coral Reef Wildlife Trade**. Defenders Of Wildlife, 2012.
- TSUZUKI, M. Y.; SUGAI, J. K.; MACIEL, J. C.; FRANCISCO, C. J.; CERQUEIRA, V. R. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. **Aquaculture**, [S. l.], v. 271, n. 1-4, p. 319-325, 2007.
- WADA, T.; ARITAKI, M.; TANAKA, M. Effects of low-salinity on the growth and development of spotted halibut *Verasper variegatus* in the larva-juvenile transformation period with reference to pituitary prolactin and gill chloride cells responses. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l], v. 308, n. 1, p. 113-126, 2004.
- WANG, J. Q.; LUI, H.; PO, H.; FAN, L. Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. **Aquaculture**, [S. l.], v. 148, n. 2-3, p. 115-124, 1997.
- YE, L.; YANG, S. Y.; ZHU, X. M.; LIU, M.; LIN, J. Y.; WU, K. C. Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). **Acta Ecologica Sinica**, [S. l], v. 31, n. 5, p. 241-245, 2011.

REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

- ARVEDLUND, M.; LARSEN, K.; WINSOR, H. The embryonic development of the olfactory system in *Amphiprion melanopus* (Perciformes: Pomacentridae) related to the host imprinting hypothesis. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 80, n. 6, p. 1103-1109, 2000.
- AVELLA, M. A.; OLIVOTTO, I.; GIOACCHINI, G.; MARADONNA, F.; CARNEVALI, O. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 273, n. 1, p. 87-95, 2007.
- BOEUF, G.; PAYAN, P. How should salinity influence fish growth?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S. l.], v. 130, n. 4, p. 411-423, 2001.
- BUSTON, P. M. Social hierarchies: size and growth modification in clownfish. **Nature**, Londres, v. 424, n. 6945, p. 145, 2003.
- DEY, V. K. The global trade in ornamental fish. **Infofish International**, Kuala Lumpur, v. 2016, p. 52-5, 2016.
- DHANEESH, K. V.; KUMAR, T. T. A.; SWAGAT, G.; BALASUBRAMANIAN, T. Breeding and mass scale rearing of clownfish *Amphiprion percula*: feeding and rearing in brackishwater. **Chinese journal of oceanology and limnology**, v. 30, n. 4, p. 528-534, 2012.
- FARIA, P. M. C.; RIBEIRO, K.; ALMEIDA, C. F.; SANTOS, R. F. B.; SANTOS, F. W. M. Produtores de ornamentais: O perfil dos aquicultores que abastecem o mercado. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, n. 158, 2016.
- FARIA, C. F. A. de. **Caracterização do mercado de aquariorfilia no Rio Grande do Norte e a aquicultura ornamental de baixo custo de implantação**. 2018. 52 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.
- FAUTIN, D. G.; ALLEN, G. R. **Field guide to anemone fishes and their host sea anemones**. Australia: Waestern Australian Museum. p.65, 1992.
- GREEN, B. S.; FISHER, R. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 299, n.1, p.115–132, 2004.
- GRIFFIN, F. J.; PILLAI, M. C.; VINES, C. A.; KÄÄRIÄ, J.; HIBBARD-ROBBINS, T.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G. N. Effects of salinity on sperm motility, fertilization, and development in the Pacific herring, *Clupea pallasii*. **The Biological Bulletin**, Chicago, v. 194, n. 1, p. 25-35, 1998.
- 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*, Günther, 1862). **Aquaculture**, [S. l.], v. 144, n.4, p. 303-311, 1996.
- HORA, M. D. S. C. D.; JOYEUX, J. C.; DE SOUSA-SANTOS, L. P.; GOMES, L. C.; RODRIGUES, R. V. Tolerance and growth of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* at different salinities. **Aquaculture**, [S. l.], v. 463, p. 1-6, 2016.

- IMSLAND, A. K.; FOSS, A.; GUNNARSSON, S.; BERNTSSEN, M. H.; FITZGERALD, R.; BONGA, S. W.; STEFANSSON, S. O. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**. [S. l.], v. 198, p. 353-367, 2001.
- KAMLER, E. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Nova York, v.12, p.79–103, 2002.
- KODAMA, G.; ANNUNCIACÃO, W. F.; SANCHES, E. G.; GOMES, C. H. D. A. M.; TSUZUKI, M. Y. Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 61-72, 2011.
- LIMA, A. O.; BERNARDINO, G.; PROENÇA, C. E. M de. Agronegócio de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 65, p. 14-24, 2001.
- LIN, Q.; ZHANG, D.; LIN, J. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. **Aquaculture**, [S. l.], v. 292, n. 1-2, p. 111-116, 2009.
- MADDUPPA, H. H.; VON JUTERZENKA, K.; SYAKIR, M.; KOCHZIUS, M. Socio-economy of marine ornamental fishery and its impact on the population structure of the clown anemonefish *Amphiprion ocellaris* and its host anemones in Spermonde Archipelago, Indonesia. **Ocean & Coastal Management**, [S. l.], v. 100, p. 41-50, 2014.
- MADHU, K.; MADHU, R.; KRISHNAN, L.; SASIDHARAN, C. S.; VENUGOPAL, K. M. Spawning and larval rearing of *Amphiprion ocellaris* under captive condition. **Marine Fisheries Information Service, Technical and Extension Series**, Cochin, v. 188, p. 1-5, 2006.
- MEDEIROS, A. F. **Desenvolvimento de larvas do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*: efeito da salinidade e da temperatura**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- MOUTOU, K. A.; PANAGIOTAKI, P.; MAMURIS, Z. Effects of salinity on digestive protease activity in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.: a preliminary study. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 912-914, 2004.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 1304, 2018.
- PALMA, J.; STOCKDALE, J.; CORREIA, M.; ANDRADE, J. P. Growth and survival of adult long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) using frozen diets. **Aquaculture**, [S. l.], v. 278, n. 1-4, p. 55-59, 2008.
- PETERSON-CURTIS, T. L. Effects of salinity on survival, growth, metabolism, and behavior in juvenile hogchokers, *Trinectes maculatus fasciatus* (Achiridae). **Environmental Biology of Fishes**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 323-331, 1997.
- RESLEY, M. J.; WEBB, J. R. K. A.; HOLT, G. J. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, [S. l.], v. 253, n. 1-4, p. 398-407, 2006.

- RIBEIRO, F. D. A. S.; CARVALHO JUNIOR, J. R.; FERNANDES, J. B. K.; NAKAYAMA, L. Comércio brasileiro de peixes ornamentais. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 110, p. 54-59, 2008.
- SAILA, S. B.; KOCIC, V. L.; MCMANUS, J. Modelling the effects of destructive fishing practices on tropical coral reefs. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 51-60, 1993.
- SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v. 406, n.13, p. 151-157, 2000.
- THORNHILL, D. J. **Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade**. Defenders of Wildlife: Washington, v. 187, p.179, 2012.
- TLUSTY, M. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. **Aquaculture**, [S. l.], v. 205, n. 3-4, p. 203-219, 2002.
- TSUZUKI, M. Y.; AIKAWA, H.; STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F. Comparative survival and growth of embryos, larvae, and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. **Journal of Applied Ichthyology**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 126-130, 2000.
- TSUZUKI, M. Y.; SUGAI, J. K.; MACIEL, J. C.; FRANCISCO, C. J.; CERQUEIRA, V. R. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. **Aquaculture**, [S. l.], v. 271, n. 1-4, p. 319-325, 2007.
- TSUZUKI, M. Y.; STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F. Effect of salinity on the oxygen consumption of larvae of the silversides *Odontesthes hatcheri* and *O. bonariensis* (Osteichthyes, Atherinopsidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 3, p. 563-567, 2008.
- VAZZOLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, p. 169, 1996.
- WABNITZ, C.; TAYLOR, M. L.; RAZAK, T. **From ocean to aquarium: The global trade in marine ornamental species**. Cambridge: UNEP/WCMC, 66 p. (17), 2003.
- WANG, J. Q.; LUI, H.; PO, H.; FAN, L. Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. **Aquaculture**, [S. l.], v. 148, n. 2-3, p. 115-124, 1997.
- WOOD, E. **Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies**. Londres: Marine Conservation Society, p. 80, 2001.
- YE, L.; YANG, S. Y.; WANG, Y.; WU, K. C. Effects of salinity on the survival activity and larvicultura of anemonefish (*Amphiprion clarkii*). **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, Hefei, v. 37, p. 162-164, 2009.
- ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 165-174, 2011.