



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

HELEN RAYANE LOPES MORAES

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PANCREATINA SUÍNA NO
ALIMENTO VIVO (*Artemia* sp.) NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E
ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE LARVAS DO PEIXE –
PALHAÇO *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)**

Florianópolis/SC

2020

Helen Rayane Lopes Moraes

Efeito da suplementação de pancreatina suína no alimento vivo (*Artemia* sp.) no desempenho zootécnico e atividade de enzimas digestivas de 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/SC

2020

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

Moraes, Helen Rayane Lopes

Efeitos da suplementação de pancreatina suína no alimento vivo (*Artemia* sp.) no desempenho zootécnico e atividade de enzimas digestivas de larvas do peixe - palhaço *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830) / Helen Rayane Lopes Moraes ; orientador, Monica Yumi Tsuzuki, 2020.

52 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Peixe marinho . 3. Larvicultura. 4. Ornamentais. 5. Digestibilidade. I. Tsuzuki, Monica Yumi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. III. Título.

Helen Rayane Lopes Moraes

Efeitos da suplementação de pancreatina suína no alimento vivo (*Artemia* sp.) no desempenho zootécnico e atividade de enzimas digestivas de 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:

Prof.^a Mônica Yumi Tsuzuki, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Vinícius Ronzani Cerqueira, 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.

Prof.^a Dr.^a Leila Hayashi
Coordenadora do Curso

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

Florianópolis, 31 de outubro de 2019.

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais,
irmãos, marido e amigas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças e me permitir chegar a qualquer lugar que eu precise chegar.

Agradeço aos meus pais, Elizabete e Jenilton, e meus irmãos Elen Diana e Wislan! Vocês são os meus maiores incentivadores, me apoiando e estando ao meu lado sempre que precisei. Devo tudo a vocês!

Gratidão a Prof.^a Dr^a Mônica Tsuzuki pela orientação, pela confiança e pela chance de participar do Laboratório de Peixes Ornamentais Marinho (LAPOM), me proporcionando novos conhecimentos e experiências.

Ao Laboratório de Peixes Marinho (LAPMAR), que foi fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa, com o fornecimento de rotíferos e equipamentos. Em especial quero agradecer a Vanessa Rocha e Cleize Sales por toda ajuda, apoio e carinho.

Ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) que nos disponibilizaram as microalgas, sendo sempre muito solícitos.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos, que foi importante para a realização das análises enzimáticas, principalmente ao professor Carlos Peres pela atenção, disponibilidade e pelas dicas que foram fundamentais para realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

Não podendo deixar de agradecer a Cristina Rios (Cris), a pessoa de coração mais generoso e paciente. Obrigada, sem você não teria conseguido chegar até aqui, sua ajuda e disponibilidade foram fundamentais. Serei eternamente grata.

À Ana Paula Lira (Paulinha), minha pseudo coorientadora, que me ajudou do início ao final deste trabalho. Sempre esteve disponível aos meus pedidos de socorro e minhas dúvidas. Obrigada por todos os ensinamentos, atenção e, principalmente, por todo carinho.

Renata Ozório, a técnica mais incrível, sempre muito solícita e disponível para ajudar. Obrigada por todo suporte quando eu precisei e pelas palavras de incentivo e conforto.

À família “LAPOM” que me ajudou direta e indiretamente. Ilson pela ajuda técnica e braçal, sempre disponível a ajudar. Ana Carol, Gabriel, Jeisa e Ksênia, que me socorreram quando precisei, obrigada amores. Ao Danilo, pessoa que chegou e conquistou minha amizade de um jeito inexplicável, obrigada por toda ajuda, apoio e abraços apertados. A Salete (Sassá) pelos cafés de toda manhã, e por deixar nosso amado laboratório sempre limpo e organizado.

À Tânia Lopes, meu muito obrigada! Pela ajuda aos finais de semana, e principalmente pela disponibilidade de estar comigo nas análises enzimáticas, não sabe como foi importante sua ajuda.

Ao Rafael Sales e Sérgio Araújo, amigos que fiz nesses anos de mestrado, obrigada por toda ajuda, apoio, disponibilidade, conversas, gargalhadas e cafés da manhã juntos. Vocês foram muito importantes para meu crescimento nessa caminhada.

A todos que passaram pelo LAPOM e deixaram um pouco de ensinamento, carinho e amizade.

À minha amiga e irmã Marcia Souza, que pela bondade de Deus, permitiu estarmos no mesmo laboratório, depois de cinco anos e meio de graduação podemos viver mais esses anos de mestrado juntas. Não sei nem como agradecer por tudo, mesmo diante das dificuldades conseguimos nos manter firmes e fortes nessa caminhada. Obrigada por todo apoio, ajuda e disponibilidade, por se aventurar em dormir comigo no laboratório, acordar cedo pra ajudar no experimento, por toda dedicação, carinho, amizade e, principalmente pelo amor! Te amo sempre e pra sempre.

Às minhas amigas e irmãs Marillyse Vieira e Fernanda do Socorro, amizade que vai além da vida. Não medem esforços para me ajudar quando precisei e quando preciso. Cada palavra de apoio, de estímulo, de conforto e de carinho fazem toda diferença quando vem de vocês. Só Deus pra recompensar tudo que fizerem e fazem por mim. Amo vocês sempre e para sempre, minhas vacas!

À minha amiga e irmã Sara Anjos que mesmo de longe me apoiou e torceu por essa conquista! Só faltou você vaquinha. Te amo sempre e pra sempre.

Ao meu amado esposo Jonhy Anderson que sempre me incentivou na realização dos meus sonhos, obrigada pelo companheirismo, compreensão, dedicação, cuidado, e principalmente pelo seu amor! Te amo sempre e pra sempre.

E por fim, agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa da Pós-graduação em Aquicultura, pela oportunidade ímpar de fazer parte deste programa. Ao Carlito, ao melhor secretário que existe, sempre pronto para ajudar. A Prof.^a Dr.^a Leila Hayashi, a nossa querida coordenadora, por toda compreensão e carinho. E a CAPES pela bolsa de estudo que me proporcionou.

Não viva dentro de um aquário,
se você tem um mar de possibilidades...

Igor Uehara

RESUMO

O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* é o peixe ornamental marinho mais cultivado e com maior demanda na exportação mundial. Pesquisas visando a melhoria da produtividade em cultivo ainda são necessárias. Na larvicultura desta espécie, que tem duração aproximada de 30 dias, são utilizados o rotífero *Brachionus* sp. e *Artemia* sp. como alimentos vivos. Reduzir esse período seria benéfico, pois diminuiriam gastos com a produção do alimento vivo, e mais rápido se introduziria o alimento inerte. Enzimas digestivas exógenas podem maximizar a digestibilidade dos alimentos vivos, melhorando o desempenho das larvas. O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da suplementação de um coquetel enzimático (Pancreatina Suína - PS) no desempenho zootécnico e na atividade de enzimas digestivas de larvas de *A. ocellaris*. Foram testadas cinco diferentes concentrações de PS suplementadas na *Artemia* sp., em triplicata: controle 0, 5, 25, 50 e 75 mg L⁻¹, ofertadas às larvas a partir de cinco dias após eclosão (DAE), até que as larvas atingissem a metamorfose. Os resultados mostraram que o uso da PS na concentração de 75 mg L⁻¹ melhorou o desempenho zootécnico das larvas de *A. ocellaris*, sobretudo o comprimento e o crescimento diário. No presente estudo, foi observado um início precoce da metamorfose, com 8° DAE e finalização da larvicultura com 26° DAE. Também foi verificado que a taxa de ingestão do alimento vivo diminuiu em função da idade larval e em relação ao aumento das concentrações de PS. Porém, a *Artemia* sp. suplementada com a pancreatina suína não afetou diretamente a atividade das enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, α -amilase, lipase e pepsina) das larvas do peixe-palhaço.

Palavras-chave: Aquicultura. Peixe marinho. Larvicultura. Ornamentais. Digestibilidade.

ABSTRACT

Amphiprion ocellaris clownfish is the world's most captive-bred and most exported marine ornamental fish. Research to improve its cultivation performance is still necessary. In the larviculture of this species, approximate duration of 30 days, *Brachionus* sp. and *Artemia* sp. are used as live foods. Reducing this period would be beneficial, as the cost to produce live food would be reduced and inert food would be introduced earlier. Exogenous digestive enzymes can maximize the digestibility of live foods, improving larval performance. The present work aimed to verify the effect of exogenous enzyme supplementation (Porcine Pancreatin- PP) on the zootechnical performance and digestive enzyme activity of *A. ocellaris* larvae. Five different levels of supplemented PP were tested in *Artemia* sp., in triplicates: control 0, 5, 25, 50 and 75 mg L⁻¹, provided to larvae from five days after hatching (DAE) until the larvae completed metamorphosis. The results obtained with the use of PP at a concentration of 75 mg L⁻¹ improved the zootechnical performance of *A. ocellaris* larvae, especially in length and daily growth. In the present study, an early onset of metamorphosis was observed with 8° DAE and completion of larviculture with 26° DAE. It was also verified that live food intake rates decreased as a function of larval age and increased concentrations of PP. However, *Artemia* sp. supplemented with swine pancreatin did not directly affect the activity of the digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin, α -amylase, lipase and pepsin) of clownfish larvae.

Keywords: Aquaculture. Marine fish. Larviculture. Ornamental. Digestibility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Vista lateral de um espécime de *Amphiprion ocellaris*..... 15
- Figura 2 – Crescimento diário em comprimento (mm.dia⁻¹) (média ± DP) de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. por 22 dias. C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 31
- Figura 3 – Ganho de peso (mg) (média ± DP) de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. por 22 dias C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 31
- Figura 4 – Porcentagem cumulativa de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. que fecharam a 1^o banda corporal. C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 32
- Figura 5 – Porcentagem cumulativa de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. que atingiram o final da metamorfose (surgimento das 3 bandas corporais). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 33
- Figura 6 - Atividade enzimática específica (média ± DP) da quimotripsina e da tripsina da *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 35
- Figura 7 - Atividade enzimática específica (média ± DP) da amilase da *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 35
- Figura 8 - Contribuição enzimática específica de tripsina (média ± desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5^o e 26^o DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 36
- Figura 9 - Contribuição enzimática específica de quimotripsina (média ± desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5^o e 26^o DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 37

- Figura 10 - Contribuição enzimática específica de α -amilase (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Control (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 37
- Figura 11 - Atividade enzimática específica de tripsina (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Control (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 38
- Figura 12 - Atividade enzimática específica de quimotripsina (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Control (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 39
- Figura 13 - Atividade enzimática específica de α -amilase (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Control (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS) 39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1.1	Comércio de peixes ornamentais	14
1.1.2	Peixes-palhaço <i>Amphiprion</i> sp.	14
1.1.3	Protocolo alimentar de larvas	16
1.1.4	Enzimas digestivas exógenas	18
1.2	OBJETIVOS.....	20
1.2.1	Objetivo Geral	20
1.2.2	Objetivos Específicos	20
2	ARTIGO CIENTÍFICO	21
2.1	INTRODUÇÃO.....	22
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.2.1	Origem e manejo dos reprodutores	23
2.2.2	Desenho experimental e condições gerais de manutenção	24
2.2.3	Cultivo de <i>Artemia</i> sp. e bioencapsulação com enzimas digestivas exógenas	25
2.2.4	Amostragem dos animais e análises laboratoriais	25
2.2.4.1	<i>Análise biométrica</i>	26
2.2.4.2	<i>Taxa de ingestão</i>	26
2.2.4.3	<i>Contribuição enzimática exógena</i>	27
2.2.4.4	<i>Análise enzimática</i>	27
2.2.4.4.1	Extrato enzimático.....	28
2.2.4.4.2	Atividade de quimotripsina e tripsina	28
2.2.4.4.3	Atividade amilásica	28
2.2.4.4.4	Atividade lipídica	29
2.2.4.4.5	Atividade de pepsina	29
2.3	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	29

2.4	RESULTADOS	30
2.4.1	Sobrevivência e desempenho zootécnico	30
2.4.2	Metamorfose	32
2.4.3	Taxa de ingestão (IR)	33
2.4.4	Atividade e contribuição enzimática exógena.....	34
2.4.5	Atividade enzimática larval.....	38
2.5	DISCUSSÃO.....	40
2.6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS	45
	REFERÊNCIA DA INTRODUÇÃO GERAL.....	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Comércio de peixes ornamentais

A aquariofilia ou aquarismo é a prática de manter peixes, plantas e outros organismos aquáticos em aquários ou em tanques com a finalidade científica ou ornamental (CARRACA, 2016) e faz parte de um mercado maior denominado “Mercado Pet”, uma indústria em plena expansão e altamente lucrativa (WOOD, 2001; TLUSTY, 2002).

No ano de 2016, o mercado mundial da aquariofilia movimentou cerca de US\$ 100,4 bilhões e neste ranking o Brasil ocupou o terceiro lugar participando com 6,3%, estando atrás apenas dos Estados Unidos (41,8%) e do Reino Unido (6,5%) (FARIA *et al.*, 2016).

Em virtude da popularidade do aquarismo em todo o mundo, estima-se que desde a década de 70 houve um crescimento de aproximadamente 14% ao ano, onde mais de 1 bilhão de peixes são comercializados internacionalmente a cada ano (MACEDA-VEIGA *et al.*, 2016). Esse comércio global de peixes de aquário envolve mais de 5.300 espécies de peixes de água doce e 1.802 de peixes marinhos (RAGHAVAN *et al.*, 2013).

A cada ano, é notado um aumento no interesse do mercado por animais saudáveis, originais, com cores vivas e formatos diferenciados. Como exemplo, temos a mais importante empresa de criação comercial ORA (Oceans Reefs Aquariums), que trabalha no melhoramento genético de seus planteis com o objetivo de oferecer ao mercado novos padrões de cores e variantes específicos, além de trabalhar com novas espécies de peixe palhaço há 10 anos (LIMA; GUERREIRO; PORTZ, 2010).

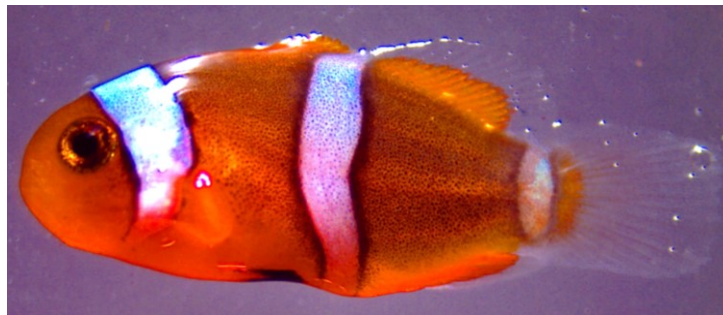
Além de poder suprir o mercado com peixes diferenciados, a produção em cativeiro de acordo com Faria (2018) vem ganhando cada vez mais espaço por ser uma atividade lucrativa, acompanhada por desenvolvimento social e conservação do ambiente natural contribuindo desta forma com a diminuição da captura das espécies de interesse comercial.

1.1.2 Peixes-palhaço *Amphiprion* sp.

Peixes-palhaço pertencem à Família Pomacentridae, composta por 30 espécies catalogadas, 29 do gênero *Amphiprion* e apenas uma do gênero *Premmas* (THORNHILL, 2012).

Os peixes pertencentes aos gêneros *Amphiprion* e *Premnas* são morfológicamente semelhantes, sendo pequenos com tamanhos variando de 5 a 16 cm de comprimento. O corpo é levemente robusto com um perfil ovalado, exibindo escamas ctenóides e boca protrátil, e dentes diminutos. Tem apenas uma nadadeira dorsal alongada, que se estende por toda a região dorsal do corpo. As nadadeiras peitorais, ventrais e caudal apresentam formato arredondado, sendo semitransparente ou contornadas por bordas escuras (Figura 1) (WILKERSON, 2003). Peixe-palhaço pode viver até 30 anos (THORNHILL, 2012).

Figura 1 – Vista lateral de um espécime de *Amphiprion ocellaris*.



São peixes onívoros, e em ambiente natural ingerem o que está disponível, como algas, zooplâncton, isópodes e restos de alimento da anêmona hospedeira. Em cultivo consomem alimentos vivos (rotíferos, *Artemia* sp.) e alimento artificial como rações secas e úmidas (ex: patês) (GUERREIRO, 2012).

Quanto ao processo reprodutivo, os peixes-palhaço são hermafroditas protândricos, formam unidades sociais compostas de um macho e uma fêmea e vários machos menores não reprodutivos. Nos grupos sociais há uma dominância em relação ao tamanho corporal, onde o maior peixe do grupo geralmente é uma fêmea e os restantes são machos, e quando ocorre a retirada ou morte desta fêmea, o maior macho faz inversão sexual para tomar a posição de dominante (BUSTON, 2003; WILKERSON, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2010; YE *et al.*, 2011).

Em cativeiro, reproduzem-se facilmente exibindo desovas contínuas e não precisam das anêmonas como indivíduo simbiote. O comportamento reprodutivo acontece com a construção do ninho, no meio natural perto da anêmona em substratos de rocha, já em cativeiro ocorre em jarros de cerâmica, telhas ou azulejos. Os ovos são aderentes, com coloração alaranjada no início, medindo cerca de 3 a 4 mm de comprimento e a quantidade varia de acordo com a idade da fêmea, podendo alcançar cerca de 100 a 1.000 ovos por desova. O tempo de incubação varia de 6 a 8 dias, seguido de estágio larval planctônico de até 30 dias, quando se transformam em juvenis (ALLEN, 1972; HOFF JR, 1983; WILKERSON, 2003; RODRIGUES, 2017). Os

machos são responsáveis por cuidar dos ovos durante a incubação, promovendo a oxigenação dos mesmos de forma vigorosa. As larvas recém-eclodidas apresentam comportamento voraz e já iniciam a alimentação exógena (WILKERSON, 2003).

Amphiprion ocellaris, popularmente conhecido como peixe-anêmona, falso percula (por possuir características semelhantes ao peixe-palhaço verdadeiro *Amphiprion percula*), ou “Nemo fish” é um dos peixes ornamentais marinhos mais importantes, tanto no aspecto extrativo como de criação, pois superam a procura de mercado de todos os peixes marinhos ornamentais do mundo (LIMA, 2010).

Este peixe ocorre exclusivamente em águas tropicais, nas regiões sul e central da parte oeste do Oceano Pacífico, todo Oceano Índico e no Mar Vermelho (WILKERSON, 2003). Inicialmente capturado em meio natural, adaptou-se ao ambiente de aquário, tornando-se uma das espécies mais populares no comércio mundial de peixes marinhos ornamentais. Suporta bem o estresse do manuseio em cativeiro, aceitando bem dietas artificiais além de conviver pacificamente com a maioria das espécies de peixes marinhos ornamentais (RODRIGUES, 2002; VARGHESE *et al.*, 2009). É uma excelente espécie para ser usada em experimentação científica, principalmente para estudos nutricionais e determinação da qualidade do ovo e larva (DELBARE *et al.*, 1995).

1.1.3 Protocolo alimentar de larvas

Na aquicultura, o alimento vivo é considerado como um grupo de organismos componentes do plâncton (fitoplâncton e zooplâncton), que constituem a base dos ecossistemas aquáticos (FERNANDO, 1994), sendo amplamente utilizado para a produção de larvas de peixes marinhos. Estes organismos são importantes, pois contém aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (WATANABE; KITAJIMA; FUJITA, 1983), e devido sua motilidade estimulam a predação das larvas, além de apresentar maior palatabilidade em comparação as rações comerciais, apresentam alto nível de umidade, o que torna melhor a aceitação do alimento pelas larvas (BENGTSON, 2003).

Kolkovski (2001) destaca que os organismos vivos também contribuem para os processos digestivos e de absorção dos nutrientes pelas larvas devido a ação direta das enzimas presentes no alimento vivo (enzimas exógenas), que são liberadas pela ação física das larvas durante a ingestão, desencadeando a hidrólise das moléculas complexas do próprio zooplâncton ingerido, bem como estimulando a secreção das enzimas endógenas do trato digestivo das larvas (KUBITZA, 1999).

Em protocolos alimentares normalmente utilizados na larvicultura de peixes marinhos, o rotífero *Brachionus* sp. é o primeiro alimento ofertado, seguido da *Artemia* sp. (NAZ, 2008). Alguns aspectos positivos do uso do rotífero na alimentação de larvas são: tamanho corporal (70 a 350 µm dependendo da espécie e estágio de desenvolvimento) ideal para larvas pequenas, crescimento populacional rápido, são organismos filtradores que ingerem vários tipos de alimentos como microalgas e leveduras, apresentam rusticidade (toleram bem o manejo), além disso, possuem valor nutricional razoável que pode ser melhorado com o uso de enriquecedores comerciais.

Assim que as larvas já são capazes de ingerir alimentos maiores, os rotíferos são substituídos pela *Artemia* sp. que, quando recém-eclodida, mede entre 400–500 µm. É um pequeno crustáceo filtrador da classe Branchiopoda, subordem Anostraca e família Artemiidae, pertencendo originalmente aos habitats aquáticos de elevada salinidade (SORGeloos; DHERT; CANDREVA, 2001).

Os cistos da *Artemia* sp. são a forma dormente dos embriões. Com salinidade, temperatura, luminosidade e aeração adequada, os embriões saem da cápsula e eclodem na forma de náuplios (LIM *et al.*, 2002). Os cistos dormentes podem ser guardados por um longo tempo sem perder a qualidade de eclosão, podendo ser utilizados como alimento com 24 horas após incubação. O uso da *Artemia* sp. é mais fácil e menos trabalhoso que outros tipos de alimento vivo disponíveis atualmente para a alimentação de larvas de peixes e crustáceos (LAVENS; SORGeloos, 1996), pois são de fácil manejo, apresentam tamanhos variados e simples adaptação nutricional, podendo também ser enriquecida (SZYPER, 2003; TIZOL, 1994). Seus cistos são vendidos no comércio, sendo facilmente eclodidos em laboratório. Após a eclosão, são normalmente fornecidas até que as larvas consigam capturar e digerir alimentos inertes industrializados (DHONT; VAN STAPPEN, 2003).

No entanto, os rotíferos e a *Artemia* sp., não são nutricionalmente completos para atender as necessidades nutricionais das larvas, logo, torna-se necessário o seu enriquecimento, principalmente com vitaminas e ácidos graxos altamente insaturados (HUFA), sendo os mais utilizados o ácido docosaexaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA) (OLIVOTTO *et al.*, 2011; LUBZENS; ZMORA, 2003; DHONT; VAN STAPPEN, 2003).

Os náuplios de *Artemia* sp. no início do seu desenvolvimento (Instar I) não se alimentam, pois possuem boca e ânus fechado e necessitam, exclusivamente, das suas reservas energéticas para sobreviver. Só com cinco a oito horas após a eclosão tornam-se o Instar II, possuindo trato digestivo já funcional para iniciar a alimentação exógena. Logo, passa a ser um consumidor não seletivo, filtrando partículas de 1 a 50 micras disponíveis em seu meio

(LAVENS; SORGELOOS, 1996). Portanto, devido a essas características alimentares primitivas, é possível manipular o valor nutricional e controlar a deficiência em n-3-HUFA (DHA, EPA) dos náuplios (SORGELOOS; DHERT; CANDREVA, 2001).

Desta maneira, nas últimas décadas, o desenvolvimento de produtos e protocolos de enriquecimento bastante variados, usando microalgas, compostos microencapsulados, leveduras, emulsões e concentrados auto-emulsificante, de forma isolada ou combinados, vem sendo cada vez mais comuns (SORGELOOS; DHERT; CANDREVA, 2001).

1.1.4 Enzimas digestivas exógenas

As enzimas são proteínas indispensáveis para a realização dos processos metabólicos nos seres vivos, visto que, as reações bioquímicas que incidem no organismo são catalisadas por elas (NELSON; COX, 2018).

Após a eclosão e a absorção do vitelo, as larvas de peixes estão prontas para a alimentação exógena, porém, o trato gastrointestinal é curto e pouco desenvolvido (GISBERT; MORAIS; MOYANO, 2013). Sendo assim, os organismos vivos tendem a contribuir para o aumento da atividade das enzimas exógenas que as larvas precisam para realização dos processos de digestão e absorção (KOLKOVSKI, 2001), justificando assim a utilização de alimento vivo (rotíferos, micro vermes, náuplios de *Artemia* sp.) na larvicultura dos peixes.

De acordo com Lazo, Darias e Gisbert (2011), as enzimas digestivas agem de acordo com a composição da dieta e com o hábito alimentar de cada espécie de peixe. No início, as enzimas que atuam na digestão da proteína luminal (tripsina, quimotripsina), lipídios (lipases) e carboidratos (amilases e maltases) já estão presentes nas larvas antes mesmo da primeira alimentação exógena. Logo, a identificação dessas enzimas digestórias e análise de suas atividades trazem informações importantes sobre o estado nutricional das larvas e pós-larvas de peixes (SILVEIRA *et al.*, 2013).

A larvicultura de peixes marinhos, considerada como um dos momentos mais críticos na vida de diversos organismos aquáticos, pode ser longa (30-60 dias). O uso de suplementos enzimáticos nas dietas pode proporcionar a redução deste período da larvicultura, através no aumento de digestibilidade dos nutrientes, maximizando o crescimento e assim, obtendo então juvenis mais cedo. Isto seria benéfico uma vez que, diminuindo o tempo de larvicultura haveria um menor gasto para a produção e o fornecimento de alimento vivo, e os juvenis seriam obtidos mais rapidamente para serem disponibilizados para o mercado (HOLT, 2003).

Existem vários tipos de enzimas digestivas exógenas, tendo funções importantes na digestão dos alimentos, como por exemplo, a amilase, que tem como função diminuir a viscosidade da digestão, permitindo maior ação das outras enzimas (STECH; CARNEIRO; PIZAURO JÚNIOR, 2009). Já as proteases e as lipases são as mais utilizadas na nutrição de espécies carnívoras (LECZNIESKI, 2006), com funções de disponibilizar energia necessária para o bom desempenho zootécnico dos animais.

A suplementação dessas enzimas digestivas exógenas na alimentação, tem por finalidade complementar as enzimas digestivas endógenas (tripsina, quimotripsina, amilase e lipase), também fornece as enzimas que não são sintetizadas no processo digestivo (xilanasas, β -glucanases, celulase e fitase), ajudando na digestibilidade e desempenho zootécnico do peixe (SILVA *et al.*, 2000; BEDFORD; PARTRIDGE, 2001; FISCHER *et al.*, 2002).

Pesquisas realizadas demonstraram bons resultados no crescimento e na sobrevivência com a suplementação de complexos enzimáticos na dieta (ração) de peixes. Kolkovski e Tandler (2000) verificaram uma melhora significativa no crescimento dos indivíduos de pargo europeu (*Sparus aurata*) utilizando microdieta suplementada com pancreatina suína na alimentação de larvas em comparação com microdietas sem adição de pancreatina. Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), larvas a partir de 7,0 mg de peso úmido podem passar pela transição alimentar sem detrimento da sobrevivência final, quando alimentadas com ração suplementada com a pancreatina suína (TESSER *et al.*, 2006).

Apesar de resultados positivos do uso destas enzimas na ração, esta prática é menos utilizada, por dificuldades tecnológicas, pois as enzimas possuem baixa estabilidade ao calor e os processos utilizados para produção de rações (peletização e extrusão) alcançam elevadas temperaturas (MASCARELL; RYAN, 1997).

Estudos com a introdução de enzimas digestivas exógenas no alimento vivo para alimentação de peixes ainda são escassos. Visto que, a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura realizam suplementação destas enzimas na ração, e não no alimento vivo. Somente a pesquisa pioneira de Lira (2018), desenvolvida no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM, UFSC), mostrou que o uso de coquetel enzimático (pancreatina suína) suplementado no alimento vivo (*Artemia* sp.) aumentou a atividade de enzimas digestivas endógenas, a taxa de sobrevivência e o crescimento das larvas e juvenis de cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*).

A pancreatina é um produto biotecnológico que contém um coquetel enzimático obtido do pâncreas suíno, constituído principalmente pela α -amilase, lipase, ribonuclease e proteases (O' KEEFE; CARIEM; LEVY, 2001).

Uma vez que, estudos avaliando o uso de enzimas digestivas exógenas na larvicultura de peixes marinhos são escassos, mais trabalhos devem ser realizados para testar esta tecnologia, considerada inovadora, na produção de peixes marinhos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Aprimorar técnicas de cultivo do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*, visando maximizar o crescimento e a sobrevivência, e diminuir o tempo de larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* através da suplementação de enzimas digestivas exógenas no alimento vivo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sobrevivência e parâmetros de crescimento de larvas do *Amphiprion ocellaris* alimentadas com diferentes concentrações de pancreatina suína suplementadas na *Artemia* sp.
- Avaliar a taxa de ingestão das larvas do peixe-palhaço alimentadas com *Artemia* sp. suplementadas com diferentes concentrações de pancreatina suína.
- Determinar a contribuição da atividade enzimática da *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína no trato digestivo de larvas do peixe-palhaço.
- Determinar a atividade enzimática endógena (tripsina, quimotripsina, lipase e α -amilase) de larvas do peixe-palhaço e do alimento vivo (*Artemia* sp.) através da suplementação de diferentes concentrações de pancreatina suína.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PANCREATINA SUÍNA NO ALIMENTO VIVO (*Artemia* sp.) NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE LARVAS DO PEIXE-PALHAÇO *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)

RESUMO

O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* é o peixe ornamental marinho mais cultivado e com maior demanda na exportação mundial, dessa forma, pesquisas visando a melhoria da produtividade em cultivo se fazem necessárias. Na larvicultura desta espécie, que tem duração aproximada de 30 dias, são utilizados o rotífero *Brachionus* sp. e *Artemia* sp. como alimentos vivos. Reduzir esse período seria benéfico, pois diminuiriam gastos com a produção do alimento vivo, e mais rápido se introduziria o alimento inerte. Enzimas digestivas exógenas podem maximizar a digestibilidade dos alimentos vivos, melhorando o desempenho das larvas. O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da suplementação de enzimas exógenas (Pancreatina Suína - PS) no desempenho zootécnico de larvas de *A. ocellaris*. Foram testadas cinco diferentes concentrações de PS suplementadas na *Artemia* sp., em triplicata: controle 0, 5, 25, 50 e 75 mg L⁻¹, ofertadas às larvas a partir de cinco dias após eclosão (DAE), até que as larvas atingissem a metamorfose. Os resultados mostraram que o uso da PS na concentração de 75 mg L⁻¹ melhorou o desempenho zootécnico das larvas de *A. ocellaris*, sobretudo no crescimento. No presente estudo, foi observado um início precoce da metamorfose, com 8° DAE e finalização da larvicultura com 26° DAE. Também foi verificado que a taxa de ingestão do alimento vivo diminuiu em função da idade larval e em relação ao aumento das concentrações de PS. Porém, a *Artemia* sp. suplementada com a pancreatina suína não afetou diretamente a atividade das enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, α -amilase, lipase e pepsina) das larvas do peixe-palhaço.

Palavras-chave: Peixe marinho. Larvicultura. Ornamentais. Enzimas. Digestibilidade.

2.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a piscicultura ornamental marinha é uma das atividades que mais vem crescendo dentro da aquicultura (KODAMA *et al.*, 2011). O comércio de organismos aquáticos ornamentais, juntamente aos equipamentos e acessórios a esse mercado, tornou essa indústria multibilionária (MOORHEAD; ZENG, 2010). Em 2015, o Brasil ocupou o terceiro lugar, estando 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).

Juntamente com este crescimento, o comércio vem buscando cada vez mais animais saudáveis e originais, com cores vivas e formatos inovadores. Sendo assim, a produção em cativeiro vem mostrando que tem espaço para receber essa atividade, propondo um cultivo lucrativo, diferenciado e mais sustentável, com desenvolvimento social e cuidado ao meio ambiente (FARIA, 2018).

Das mais de 84 espécies de peixes ornamentais cultivadas no mundo, 26 pertencem à família Pomacentridae (ARVEDLUND; LARSEN; WINSOR, 2000), a qual encontram-se os peixes-palhaço. Essa família é composta por 30 espécies catalogadas, 29 do gênero *Amphiprion* e apenas um do gênero *Premmas* (THORNHILL, 2012).

Em protocolos alimentares normalmente utilizados na larvicultura de peixes marinhos, o rotífero é o primeiro alimento ofertado, seguido da *Artemia* sp. (NAZ, 2008). Na larvicultura de *Amphiprion ocellaris*, geralmente o rotífero é dado após eclosão até o 5° DAE. Já a *Artemia* sp. é utilizada por um período que vai do 5° até 25° DAE, sendo que após esse período, uma dieta inerte (ração) é oferecida, e assim o período total de larvicultura para a espécie pode ser de até 30 dias (WILKERSON, 2003; KODAMA *et al.*, 2011; RODRIGUES, 2017). Uma redução deste período, através da obtenção de juvenis mais cedo seria benéfica uma vez que menor tempo seria dispendido com a produção e o fornecimento de alimento vivo, e juvenis seriam obtidos mais rapidamente para serem disponibilizados para o mercado (HOLT, 2003).

A suplementação de enzimas digestivas exógenas na dieta tem sido utilizada para melhorar o desenvolvimento larval, crescimento e sobrevivência de animais através da melhor digestibilidade dos nutrientes no alimento fornecido (KOLKOVSKI; KOVEN; TANDLER, 1997). Kolkovski e Tandler (2000) verificaram uma melhora significativa no crescimento dos indivíduos do pargo europeu (*Sparus aurata*) utilizando uma microdieta suplementada com pancreatina suína na alimentação de larvas em comparação com larvas alimentadas com microdietas sem adição de pancreatina. Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), larvas a partir de 7,0 mg de peso úmido podem passar pela transição alimentar sem detrimento da sobrevivência

final, quando alimentadas com dieta suplementada com a pancreatina suína (TESSER *et al.*, 2006). A pancreatina é um produto biotecnológico que contém um coquetel enzimático obtido do pâncreas suíno, constituído principalmente pela α -amilase, lipase, ribonuclease e proteases (O' KEEFE; CARIEM; LEVY, 2001).

Entretanto, a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura realizam a suplementação deste complexo enzimático na ração, sendo escassas pesquisas sobre sua suplementação no alimento vivo. Em uma pesquisa pioneira, Lira (2018), desenvolvida no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM, UFSC), mostrou que o uso da pancreatina suína suplementada no alimento vivo (*Artemia*) aumentou a atividade de enzimas digestivas endógenas, a taxa de sobrevivência e o crescimento das larvas e juvenis de *Hippocampus reidi*. Entretanto, trabalhos nesta linha são escassos embora possam ser aplicados para outras espécies de interesse comercial.

Uma vez que a tecnologia para a produção de juvenis de *Amphiprion ocellaris* ainda pode ser aprimorada, o presente estudo tem como objetivo avaliar se *Artemia* sp. suplementada com um coquetel enzimático (pancreatina suína) pode aumentar a digestibilidade dos nutrientes, e assim maximizar o crescimento larval e diminuir o tempo de larvicultura desta espécie.

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° 1644170919.

2.2.1 Origem e manejo dos reprodutores

As etapas de reprodução e experimentação foram realizadas no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) e a análise enzimática no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos, ambos pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina.

Os reprodutores de peixe-palhaço *A. ocellaris* foram mantidos em tanques-rede acomodados dentro de um tanque de concreto de 8.000 L, ligados a um sistema de recirculação de água salgada. A salinidade foi mantida entre 29 – 33 ‰ e a temperatura entre 25,5 – 27 °C. Peixes foram alimentados três vezes ao dia com uma dieta variada contendo ração comercial para peixes ornamentais marinhos (Tetra) e um patê composto de alimentos frescos (peixe, lula,

mexilhão, ova de peixe e camarão) preparado no próprio laboratório. O tanque-rede dos reprodutores continha um vaso de barro como substrato para a desova.

Os vasos dos reprodutores foram monitorados diariamente e quando verificada desova, foi esperado no máximo 7 dias para retirada do vaso com os ovos, sendo transferidos para um recipiente circular (taça) de fibra-de-vidro contendo 60 L de água nas mesmas condições dos reprodutores (salinidade 29 – 33 ‰ e temperatura 25,5 – 27 °C) e com aeração, até a eclosão.

2.2.2 Desenho experimental e condições gerais de manutenção

Larvas recém-eclodidas foram alimentadas três vezes ao dia por quatro dias com rotíferos *Brachionus* sp. a uma densidade de 5 rot mL⁻¹, em água verde, adicionando microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* (100.000 a 150.000 cel mL⁻¹)

Após este período (4° DAE), as larvas foram transferidas aleatoriamente com auxílio de béqueres de 100 mL para as unidades experimentais (aquários) contendo 12 L de água. A água estava na mesma salinidade e temperatura do recipiente inicial, afim de evitar choque osmótico e térmico. A densidade de larvas por unidade experimental foi de 20 indivíduos (1,6 larvas L⁻¹).

A partir do 5° DAE foram ofertados às larvas metanúplios de *Artemia* sp. suplementados com quatro diferentes concentrações de pancreatina suína (Pancreatin from porcine 8 x USP; Sigma – USA), em triplicata:

Dieta C0 (Controle): *Artemia* sp. (3 ind mL⁻¹);

Dieta T5: *Artemia* sp. (3 ind mL⁻¹) + 5 mg L⁻¹ de pancreatina suína;

Dieta T25: *Artemia* sp. (3 ind mL⁻¹) + 25 mg L⁻¹ de pancreatina suína;

Dieta T50: *Artemia* sp. (3 ind mL⁻¹) + 50 mg L⁻¹ de pancreatina suína;

Dieta T75: *Artemia* sp. (3 ind mL⁻¹) + 75 mg L⁻¹ de pancreatina suína

As concentrações de PS acima utilizadas foram determinadas por Lira (2018).

A pancreatina suína foi diluída, para sua ativação, em água doce, pH 7,5 e temperatura de 40 °C (pH e temperatura conforme indicadas pelo fabricante), até obter uma solução homogênea nas concentrações acima citadas. Posteriormente, cada solução foi distribuída nos potes de vidro contendo os metanúplios de *Artemia* sp., mantidos em banho-maria a 30°C, temperatura ideal para o cultivo deste microcrustáceo e a mínima para melhor conversão enzimática do produto utilizado. Ficando num período de 3 horas para melhor absorção da pancreatina, para depois ser ofertadas às larvas (Lira, 2018).

As larvas foram alimentadas com estas dietas até completarem 100% da metamorfose (fechamento da terceira banda corporal), em todos os tratamentos, totalizando 22 dias de

experimento. O alimento foi ofertado três vezes ao dia, sendo a primeira alimentação pela manhã (10:00 h) e as outras duas no período da tarde (13:00 e 16:00 h).

A água dos aquários não foi renovada (sistema estático) das 9:00 h às 00:00 h, a fim de manter o alimento vivo nos aquários, e entre 00:00 h às 9 h, a água foi renovada dos tanques (sistema de recirculação) para retirada total do alimento vivo residual e limpeza dos aquários.

O fotoperíodo foi mantido em 14 h claro e 10 h escuro. Os parâmetros físico-químicos da água do sistema de recirculação foram aferidos diariamente. A temperatura da água foi aferida com termômetro de mercúrio (precisão de 0,1 °C), a qual foi mantida em $25,6 \pm 0,81$ °C. O oxigênio e pH, medidos com multiparâmetro YSI PRO20 Professional series, mantiveram-se em $6,1 \pm 0,5$ mg L⁻¹ e 8, respectivamente, e a salinidade ficou em $33 \pm 0,67$ ‰, medida com refratômetro (Modelo SHR-10ATC). A amônia total e o nitrito foram mensurados semanalmente com teste colorimétrico (Alcon, Brasil), ambos ficando abaixo de 0,5 ppm.

Os aquários foram sifonados no início do dia, antes da reposição do alimento vivo, para remover resto de alimento mortos e fezes do fundo, momento em que foi verificada mortalidade. Os animais remanescentes ao término do experimento foram contabilizados para sobrevivência final.

2.2.3 Cultivo de *Artemia* sp. e bioencapsulação com enzimas digestivas exógenas

Os cistos de *Artemia* sp. (Bio Artemia®, RN - Brasil) foram eclodidos em galões de 5 L a 27 °C, e após 27 horas, os náuplios foram acondicionados em um tanque com 50 litros de água, contendo enriquecedor comercial Epiffed®-LHF por 12 horas (18h às 6h), conforme metodologia do fabricante. Após o período de absorção do enriquecedor, os metanáuplios foram lavados e distribuídos em potes de 2 L que permaneceram em banho-maria (30 °C) contendo as quatro concentrações de pancreatina suína e microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri*, ambas na densidade de 10⁶ cel mL⁻¹ por 3 horas. Posteriormente, os metanáuplios bioencapsulados foram fornecidos às larvas.

O tempo de 3 horas em banho-maria foi determinado através da mortalidade da *Artemia* sp. e máxima atividade das enzimas digestivas neste crustáceo, de acordo com Lira (2018).

2.2.4 Amostragem dos animais e análises laboratoriais

Para biometria e taxa de consumo alimentar, foram amostrados um total de 6 exemplares por tratamento no início (5° dia após eclosão), 6 exemplares por tratamento no meio do experimento (início da metamorfose- surgimento da primeira banda) e 6 exemplares por

tratamento no final do experimento (quando as larvas atingiram 100 % da metamorfose - surgimento das três bandas, em todos os tratamentos).

As amostras foram coletadas sempre pela manhã, antes da primeira alimentação do dia. No dia da amostragem os peixes foram capturados primeiramente para a realização da taxa de ingestão alimentar (duração de 3 horas) e depois eutanasiados com dose de anestésico a base de óleo de cravo (1,5 mL L⁻¹), para serem fotografados e medidos, e em seguida pesados em balança analítica. Por fim, armazenados em tubos Eppendorf e mantidos a -80° C.

2.2.4.1 Análise biométrica

Os indivíduos foram pesados (peso úmido) com uma balança analítica e o comprimento (em mm) foi estimado com a utilização de uma lupa conectada ao programa DinoCapture 2.0. A partir dos dados biométricos foram calculados:

- Taxa de Crescimento Específico em peso (TCE, %dia⁻¹): $TCE = 100 \times [\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}) / \text{tempo}]$.
- Crescimento diário em comprimento (mm dia⁻¹): $(\text{comprimento final} - \text{comprimento inicial}) / \text{dias (total em dias do experimento)}$.
- Fator de Condição (FC): $FC = \text{Peso} / \text{Comprimento}^3$.
- Coeficiente de Variação do peso: $CV_{\text{peso}} = 100 \times (\text{desvio padrão peso} / \text{média do peso})$.
- Ganho de Peso: $GP = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}$.
- Sobrevivência (S%): $100 \times [(\text{número de sobreviventes no dia}) / (\text{número de larvas inicial} - \text{número de juvenis amostrados no dia})]$.

2.2.4.2 Taxa de ingestão

Com o intuito de verificar se a pancreatina suína nas diferentes concentrações poderia afetar o consumo da *Artemia* sp. pelas larvas, realizou-se o teste de taxa de ingestão (3 *Artemia* mL⁻¹ 2 larvas⁻¹ 3 horas⁻¹) foi realizada no início (5° DAE), meio (12° DAE) e fim do experimento (26° DAE).

O teste foi realizado em triplicada em potes de vidros de 3 L, volume útil de 1 L de água, utilizando a mesma densidade de larvas (1,6 ind L⁻¹) e de *Artemia* sp. (3 ind mL⁻¹), e as mesmas concentrações da PS do item 2.2.1. A bateria de testes foi realizada com luz proveniente da própria sala do laboratório, e os potes de vidros foram revestidos com película de cor preta simulando a condição experimental.

Os testes foram realizados durante a primeira alimentação, ou seja, após o jejum de 12 horas (22h às 10h), tempo suficiente para o total esvaziamento do trato digestivo dos peixes (TANU *et al.*, 2012). Ao final de 3 horas de exposição ao alimento, as larvas utilizadas foram retiradas dos potes, e o alimento restante nos potes foi filtrado em rede de 120 μm e colocados em béqueres com volume de 100 mL para quantificação final.

A taxa de ingestão (IR) foi calculada através da fórmula $IR = (C_{inicial} - C_{final}) \times \text{volume de água (mL)} / \text{número de larvas} \times \text{tempo de exposição}$, onde: o $C_{inicial}$ é a concentração de alimento inicial ofertada e C_{final} é a concentração final de alimento nos aquários experimentais após 3 horas.

2.2.4.3 Contribuição enzimática exógena

Para determinar a contribuição da atividade enzimática da *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína no trato digestório de larvas do peixe-palhaço, seguiu-se o método descrito por Applebaum e Holt (2003).

Para determinar a contribuição enzimática foram utilizados os dados oriundos da atividade enzimática da *Artemia* sp. suplementada com as diferentes concentrações do composto enzimático (0; 5; 25; 50 e 75 mg L^{-1} de PS), bem como da atividade enzimática das larvas. A atividade enzimática da *Artemia* sp. consumida por uma larva foi determinada pela multiplicação da atividade absoluta de uma *Artemia* sp. pelo número total de *Artemia* sp. consumida por uma larva (estimado pela diferença entre o número de presas ofertadas e a de presas não consumidas - residual na água de cultivo), em um período de 3 horas (taxa de ingestão). Por fim, a contribuição enzimática exógena no trato digestório de uma larva foi expressa em porcentagem, calculando-se:

Contribuição da atividade da tripsina, quimotripsina, lipase e amilase da *Artemia* sp. em relação à atividade encontrada no trato digestivo das larvas (%) = $(a.100).b^{-1}$

Onde: (a) = atividade absoluta das enzimas do total de *Artemia* sp. consumidos por uma larva; (b) = atividade absoluta das enzimas de uma larva de peixe.

2.2.4.4 Análise enzimática

Para análises enzimáticas foram coletados 2 animais por réplica, totalizando 6 peixes por tratamentos e 6.000 *Artemia* sp. com diferentes concentrações de enzimas exógenas, em triplicata.

2.2.4.4.1 Extrato enzimático

As amostras foram manualmente processadas em homogeneizador Potter-Ekvehjem. Para obtenção do homogenato enzimático das larvas do 5° DAE (início) e do 12° DAE (meio) foi feito um pool de 6 larvas inteiras (réplica/tratamento/experimento) em tubos de Eppendorf com 1,5 mL de água Mili-Q e as larvas do final do experimento (26 DAE) foram colocadas individualmente nos tubos de Eppendorf com 2 mL de água Mili-Q. Durante todo o processo de homogeneização, o material foi mantido em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 6000 x g por 15 min a 4 °C. Sendo coletado os sobrenadantes, os quais foram armazenados em tubos de Eppendorf a -20 °C até a realização das análises enzimáticas.

2.2.4.4.2 Atividade de quimotripsina e tripsina

As atividades de quimotripsina e tripsina foram testadas com os substratos suc-AAPF-pNa (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida) e bz-R-pNa (N- α -Benzoyl-DL-arginine-4-*p*-nitroanilida), respectivamente. Os ensaios foram realizados de acordo com Erlanger *et al.* (1961) e DelMar *et al.* (1979). Para tanto, foram utilizados 0,05 mL do homogeneizado e 0,05 mL do substrato a 2 mM em tampão citrato/fosfato 50 mM, de pH 7,5. As reações das atividades de quimotripsina e tripsina foram interrompidas em quatro intervalos de tempo (30, 60, 90 e 120 min) e (120, 240, 360 e 480 min), respectivamente em temperatura de 30 °C. As alíquotas foram recolhidas para placa de 96 poços e as absorbâncias foram lidas a 410 nm no aparelho de leitura Tecan (Infinite pro., Califórnia, EUA). Uma unidade de atividade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μ mol de substrato^{-min}, determinadas a partir da curva padrão de *p*-nitroanilina.

2.2.4.4.3 Atividade amilásica

A atividade amilásica foi analisada através da detecção da presença de grupos redutores na reação com o ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS). O substrato foi preparado contendo 1 mL de 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 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 com as amostras foram cobertos com papel de alumínio e aquecidas a 100 °C por 5 min, às quais posteriormente adicionados 0,1 mL de água destilada e agitada em vórtex.

As leituras foram realizadas em microplaca em absorvância de 550 nm no equipamento TECAN (Infinite pro., Califórnia, EUA). A atividade da amilase foi calculada em mili unidades (mU), que equivale a 1 μ mol de glicose formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de glicose.

2.2.4.4.4 Atividade lipídica

Para a atividade de lipase total foi utilizado como substrato metil umbeliferil oleato em acetonitrila com uma concentração final de 200 μ M de substrato em tampão 0,1M Tris/HCl pH 7,5. Durante o ensaio, foram adicionados 0,05 mL do substrato e 0,05 mL do extrato enzimático, e as leituras de fluorescência (excitação 355 nm, emissão 460 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite M200, California, USA) a cada 2 min de incubação a 30 °C por 20 min. A atividade de lipase total foi determinada em unidades (U), que equivale a 1 μ mol de metil umbeliferona formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão.

2.2.4.4.5 Atividade de pepsina

A atividade de pepsina foi determinada pelo método proposto por Anson (1938), com modificações. Utilizou-se como substrato a hemoglobina bovina 1% (p/v) dissolvida em solução de HCl 0,06 N. Deste homogeneizado, foram coletados 50 μ L e adicionado a 50 μ L de solução substrato-tampão (tampão citrato-fosfato 100 mM) em pH 2,5. As amostras foram incubadas a 30 °C em quatro períodos: 30, 60, 90 e 120 min. A reação foi interrompida com adição de 50 μ L de TCA 10% (m/v) em cada período. As amostras permaneceram em gelo por 15 min e posteriormente foram centrifugadas (5 min, 13000 x g, 3 °C). Foi retirada alíquota de 50 μ L do sobrenadante de cada amostra. Para quantificação de peptídeos, foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951). A absorvância foi mensurada no comprimento de onda 750 nm, contra um branco (água Milli-Q). Uma unidade enzimática foi definida como quantidade de enzima responsável pela alteração na absorvância de 0,01 Unidade de Densidade Óptica ($DO \text{ min}^{-1}$).

2.3 ANÁLISE ESTÁTISTICA

A normalidade de distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de Levene. Os dados de peso, altura, comprimento, fator de condição, ganho de peso, sobrevivência foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do software STATISTICA

versão 7.0. A digestibilidade enzimática da *Artemia* sp. foi analisada com a utilização de regressão quadrática e linear com 5% de significância (ZAR, 1996).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Sobrevivência e desempenho zootécnico

A média de sobrevivência larval no experimento variou de 30 a 48,3 % (Tabela 1). Apesar da maior taxa de sobrevivência (48,3 %) ser observada nas dietas T25 e T75 de pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp., e a menor taxa (30 %) no T50, não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

No início do experimento, as larvas com 5° DAE apresentavam o comprimento total de $4,46 \pm 0,44$ mm (média \pm DP; $n = 6$ larvas). Já no início da metamorfose (fechamento da primeira banda corporal), com 12° DAE, larvas mediram $7,71 \pm 0,39$ mm, sem diferença significativa ($p > 0,05$) no tamanho das larvas de 5° e 12° DAE. No final do experimento (26° DAE), maiores valores de comprimento total foram observados no T75 ($12,59 \pm 0,48$) ($p < 0,05$) quando comparado aos outros tratamentos, que não apresentaram diferença entre si (Tabela 1).

O peso inicial das larvas (5° DAE) foi de $0,91 \pm 0,44$ mg (média \pm DP; $n = 6$ larvas) e nas de 12° DAE (meio do experimento) foi de $6,98 \pm 1,10$ mg. Não houve diferença estatística em relação ao peso nas larvas de 5° e 12° DAE. Já no final do experimento, o melhor resultado foi obtido no T75, sendo o valor do peso significativamente superior aos do T5 e T25 ($p < 0,05$), porém não diferiu do C0 e T50.

Maiores valores de K (fator de condição) foram observados no C0, somente quando comparados com T5, T50 e T75, não diferindo do T25 (Tabela 1).

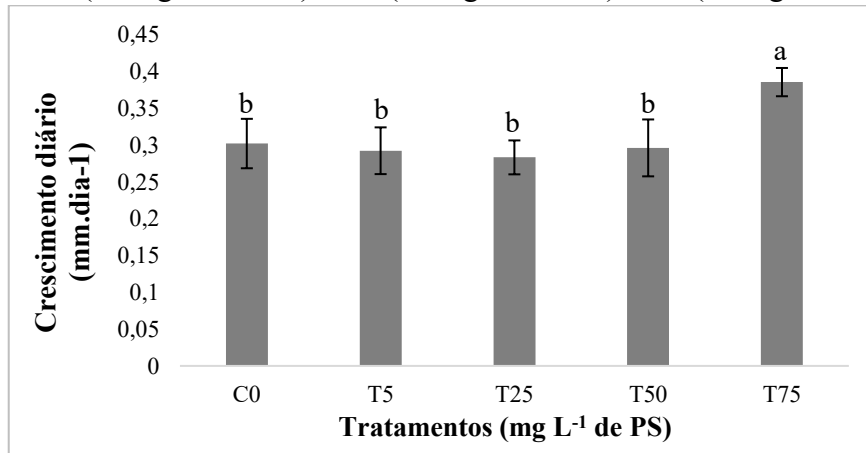
Tabela 1 – Parâmetros zootécnicos (média \pm DP) durante a larvicultura (22 dias) do peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* em diferentes dietas com *Artemia* sp. suplementada com pancreatina suína. C0 – Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).

Tratamentos (mg/L)	Sobrevivência (%)	Comprimento Final (mm)	Peso Final (mg)	Fator de condição
C0	$45,0 \pm 18,03$	$11,06 \pm 0,38$ b	$36,7 \pm 6,35$ ab	$2,73 \pm 0,30$ a
T5	$36,7 \pm 07,64$	$10,94 \pm 0,43$ b	$27,7 \pm 4,93$ b	$2,13 \pm 0,25$ b
T25	$48,3 \pm 15,28$	$10,78 \pm 0,48$ b	$29,3 \pm 1,03$ b	$2,38 \pm 0,40$ ab
T50	$30,0 \pm 13,23$	$11,26 \pm 0,86$ b	$31,0 \pm 2,37$ ab	$2,09 \pm 0,41$ b
T75	$48,3 \pm 12,58$	$12,59 \pm 0,48$ a	$42,7 \pm 4,93$ a	$2,15 \pm 0,24$ b

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

Em relação a taxa de crescimento diário (mm dia^{-1}) das larvas, maiores valores ($0,39 \pm 0,019 \text{ mm dia}^{-1}$) foram obtidos em T75, comparado aos demais tratamentos, que não mostraram diferenças entre si ($p > 0,05$) (Figura 2).

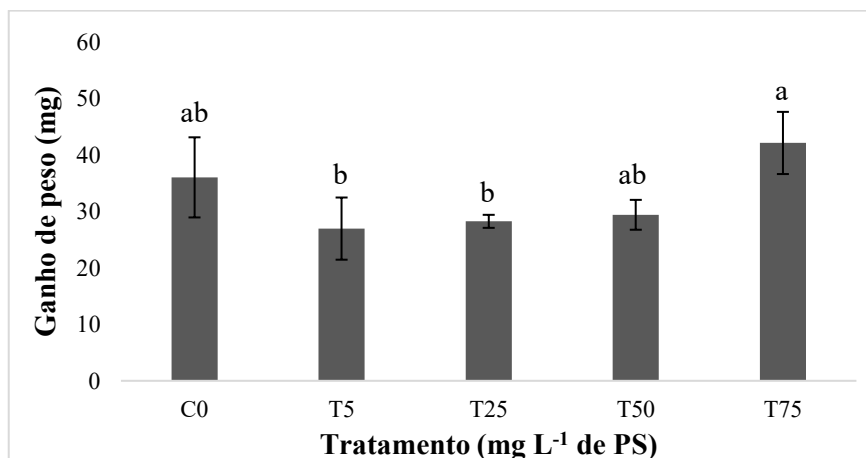
Figura 2 – Crescimento diário em comprimento (mm dia^{-1}) (média \pm DP) de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. por 22 dias. C0 – Controle (0 mg L^{-1} de PS); T5 (5 mg L^{-1} de PS); T25 (25 mg L^{-1} de PS); T50 (50 mg L^{-1} de PS); T75 (75 mg L^{-1} de PS).



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

Valores de ganho de peso no T75 ($42,1 \pm 5,51 \text{ mg}$) foram maiores quando comparados com os do T5 ($27,0 \pm 5,51 \text{ mg}$) e T25 ($28,2 \pm 1,15 \text{ mg}$), e similares ao C0 ($36,0 \pm 7,09 \text{ mg}$) e T50 ($39,4 \pm 2,65 \text{ mg}$) (Figura 3).

Figura 3 – Ganho de peso (mg) (média \pm DP) de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. por 22 dias. C0-Controle (0 mg L^{-1} de PS); T5 (5 mg L^{-1} de PS); T25 (25 mg L^{-1} de PS); T50 (50 mg L^{-1} de PS); T75 (75 mg L^{-1} de PS).

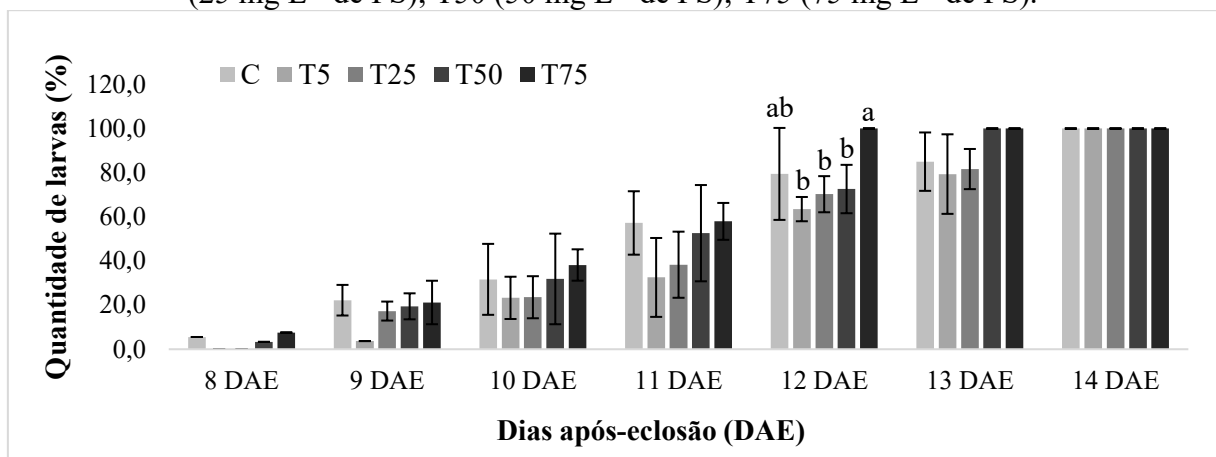


*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

2.4.2 Metamorfose

A figura 4 mostra a porcentagem cumulativa de larvas que iniciaram a metamorfose (fechamento da 1° banda corporal). As larvas iniciaram seu processo de metamorfose a partir do 8° DAE (4° dia de experimento) no C0, T50 e T75. Do 8° DAE até o 11° DAE, não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação as larvas que se encontravam no início da metamorfose. Somente no 12° DAE, o C0 e o T75 apresentaram uma porcentagem significativamente mais alta de animais que já haviam iniciado a metamorfose em relação aos demais tratamentos, sendo que no T75, todas as larvas já haviam completado o início da metamorfose (100%). A partir do 13° DAE, os tratamentos não apresentavam diferenças significativas com relação a porcentagem de larvas que atingiram o início da metamorfose.

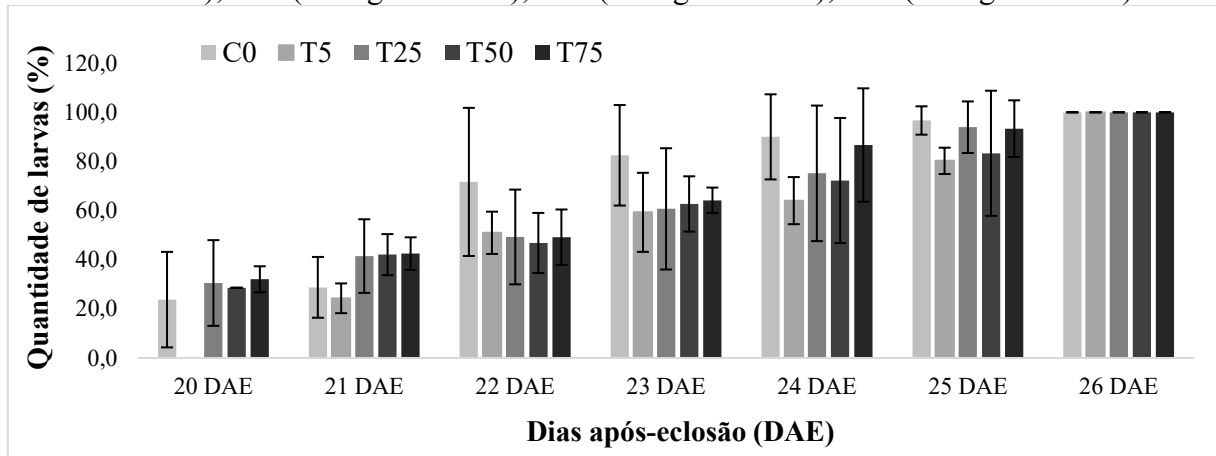
Figura 4 – Porcentagem cumulativa de larvas peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. que fecharam a 1° banda corporal. C0-Control (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



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

O experimento foi conduzido até que todas as larvas em cada tratamento completassem a metamorfose (fechamento da 3° banda corporal), portanto estendendo-se até o 26° DAE. Observou-se que, após o 20° DAE, não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação a este parâmetro até o final do experimento, como pode ser observado na figura 5.

Figura 5 – Porcentagem cumulativa de larvas de *Amphiprion ocellaris* submetidas a diferentes tratamentos com pancreatina suína (PS) suplementada na *Artemia* sp. que atingiram o final da metamorfose (fechamento das 3 bandas corporais). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



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

2.4.3 Taxa de ingestão (IR)

A taxa de ingestão foi realizada no início (5° DAE), meio (12° DAE) e fim do experimento (26° DAE) (Tabela 2). No início do experimento, os resultados mostraram que no C0 houve uma maior taxa de ingestão do alimento vivo, sendo consumido praticamente o dobro da quantidade de alimento quando comparado com os demais tratamentos ($p < 0,05$). No meio do experimento, o T5 mostrou valores quase que duas vezes mais alimento consumido quando comparado com T50 e T75, e sendo semelhante em relação ao C0 e T25 ($p > 0,05$).

Os dados ao final do experimento mostraram que no C0, houve maior taxa de consumo de alimento ($p < 0,05$), seguido do T25 e T75, e por último o T5 e T50.

De forma geral, a taxa de ingestão no mesmo tratamento em relação ao aumento da idade dos peixes mostrou uma redução significativa do alimento consumido ao longo do experimento ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Taxa de ingestão (IR) ($3 \text{ Artemia mL}^{-1}/(2 \text{ larvas} \times 3 \text{ horas})$) do alimento vivo (*Artemia* sp.) suplementado com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS) pelas larvas do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* no início (5° DAE), meio (12° DAE) e fim (26° DAE) do experimento. C0-Control (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).

Tratamentos (mg L ⁻¹)	IR do 5° DAE	IR do 12° DAE	IR do 26° DAE
C0	300,56 ± 10,84 aA	122,06 ± 29,27 abB	114,17 ± 9,82 aB
T5	149,72 ± 25,06 bcA	168,89 ± 38,88 aA	41,39 ± 6,14 cB
T25	106,94 ± 15,42 cAB	141,12 ± 18,36 abA	73,33 ± 7,12 bB
T50	154,17 ± 18,43 bA	94,73 ± 26,79 bB	49,17 ± 9,61 cB
T75	139,72 ± 10,88 bcA	60,56 ± 15,43 bB	77,78 ± 4,81 bB

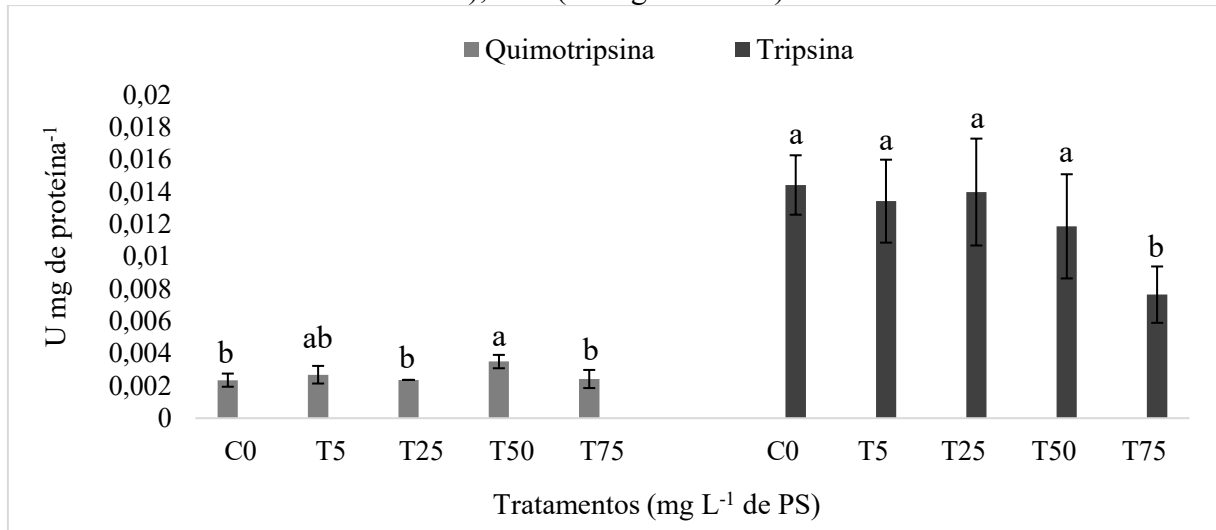
*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos na mesma idade ($p < 0,05$).

**Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

2.4.4 Atividade e contribuição enzimática exógena

A *Artemia* sp. suplementada com pancreatina suína mostrou maiores níveis de atividade de tripsina ($0,014 \pm 0,002 \text{ U mg de proteína}^{-1}$) em praticamente todas as concentrações, sendo estatisticamente menor somente em relação ao T75 ($0,008 \pm 0,002 \text{ U mg de proteína}^{-1}$), comparado com os demais tratamentos. Já os valores de quimotripsina foram mais baixos comparados com os da tripsina, sendo o valor do tratamento T50 ($0,0035 \pm 0,0004 \text{ U mg de proteína}^{-1}$) maior do que C0, T25 e T75 (Figura 6).

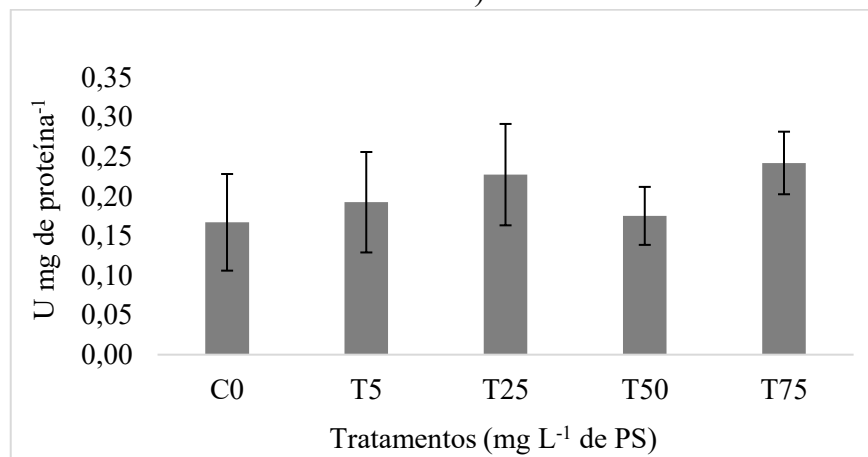
Figura 6 - Atividade enzimática específica (média \pm DP) da quimotripsina e da tripsina da *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0- Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



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

A atividade específica da amilase teve um pequeno aumento no T75 ($0,24 \pm 0,04$ U mg de proteína⁻¹), porém sem diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$). (Figura 7).

Figura 7 - Atividade enzimática específica (média \pm DP) da amilase da *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



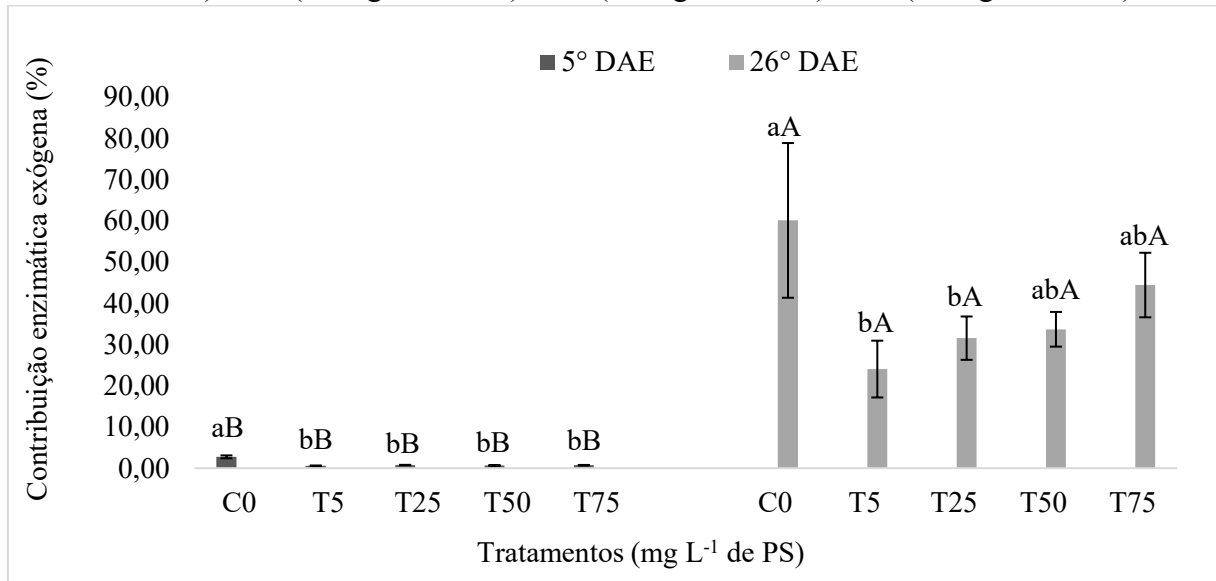
*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A contribuição exógena da pancreatina suína suplementada na *Artemia* sp. na atividade enzimática específica da tripsina, quimotripsina e amilase das larvas de *A. ocellaris* com 5° e 26° DAE encontra-se apresentada nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

Pode-se observar que a através do cálculo de contribuição enzimática o valor para a atividade de tripsina foi superior em animais com 26° DAE do que as larvas de menor idade

(5° DAE). Nas larvas de 26° DAE, o C0 apresentou 60% de contribuição enzimática de tripsina, sendo significativamente superior ao T5 (24%) e T25 (31%), e semelhante estatisticamente ao T50 (34%) e T75 (45%) ($p < 0,05$).

Figura 8 - Contribuição enzimática específica de tripsina (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).

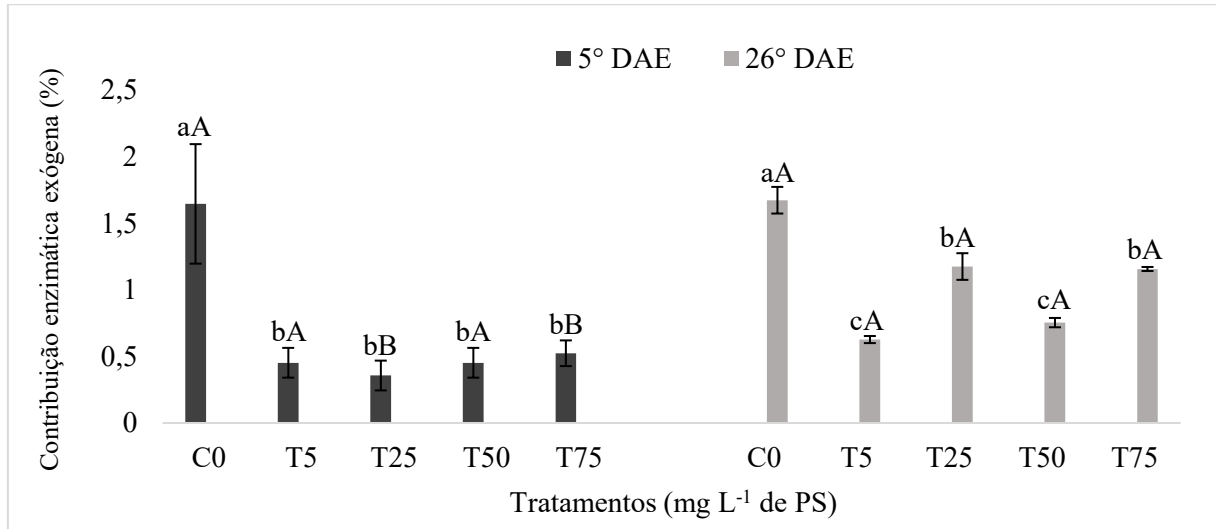


*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos na mesma idade ($p < 0,05$).

**Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Notou-se também que, valores da contribuição enzimática da quimotripsina e da amilase foram baixos (inferior a 3%) em relação aos valores da tripsina. O maior valor de contribuição ocorreu no controle (sem suplementação enzimática) para a quimotripsina em ambas as idades.

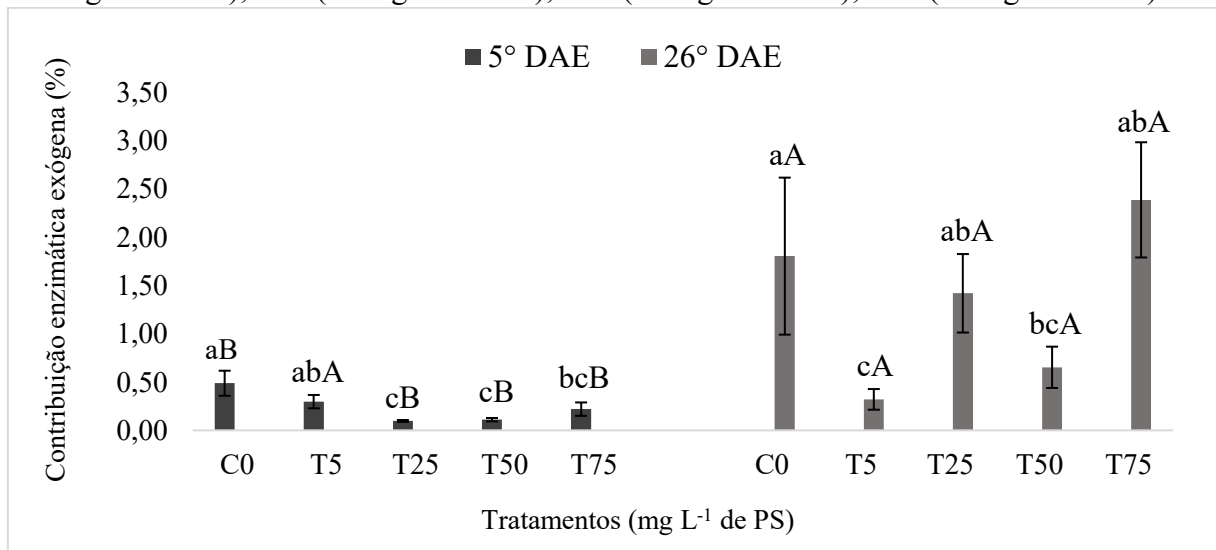
Figura 9 - Contribuição enzimática específica de quimotripsina (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos na mesma idade ($p < 0,05$).

**Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Figura 10 - Contribuição enzimática específica de α -amilase (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos na mesma idade ($p < 0,05$).

**Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

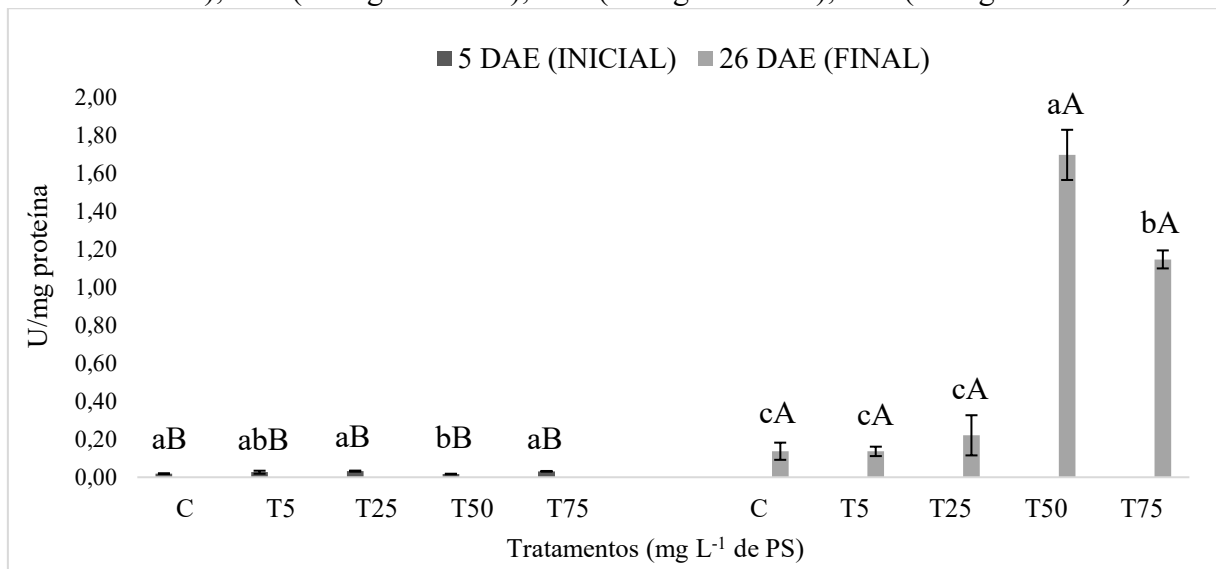
2.4.5 Atividade enzimática larval

A atividade enzimática da pepsina e lipase da larva mostrou um baixo nível de detecção, não sendo possível obter resultados significativos ($p > 0,05$).

A atividade enzimática específica da tripsina, quimotripsina, e amilase, Figuras 11, 12 e 13, respectivamente, das larvas do peixe-palhaço não mostrou um aumento com a adição das concentrações da PS na *Artemia* sp., somente na tripsina, em larvas de 26° DAE, pode-se observar uma maior atividade nas maiores concentrações (T50 e T75). No entanto, houve aumento significativo da atividade da tripsina, quimotripsina e amilase com o aumento da idade das larvas ($P < 0,05$).

No tratamento T50, na atividade específica da tripsina passou de $0,017 \pm 0,0015$ U mg de proteína⁻¹ em larvas de 5° DAE para $1,70 \pm 0,013$ U mg de proteína⁻¹ com 26 dias de vida, mostrando que neste tratamento a atividade apresentou um aumento de 100 vezes.

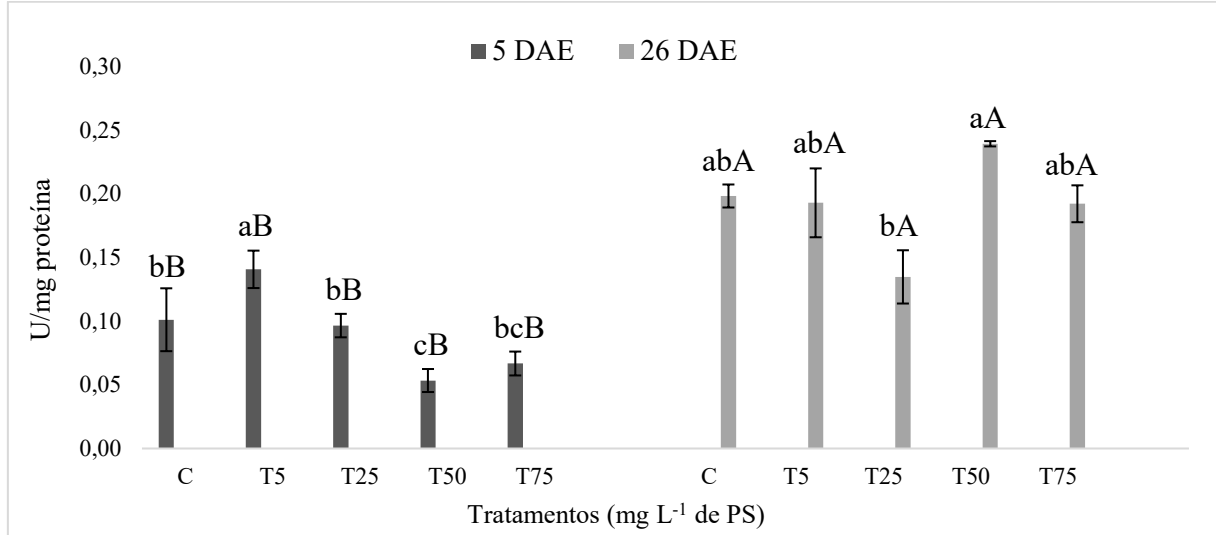
Figura 11 - Atividade enzimática específica de tripsina (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos na mesma idade ($p < 0,05$).

**Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

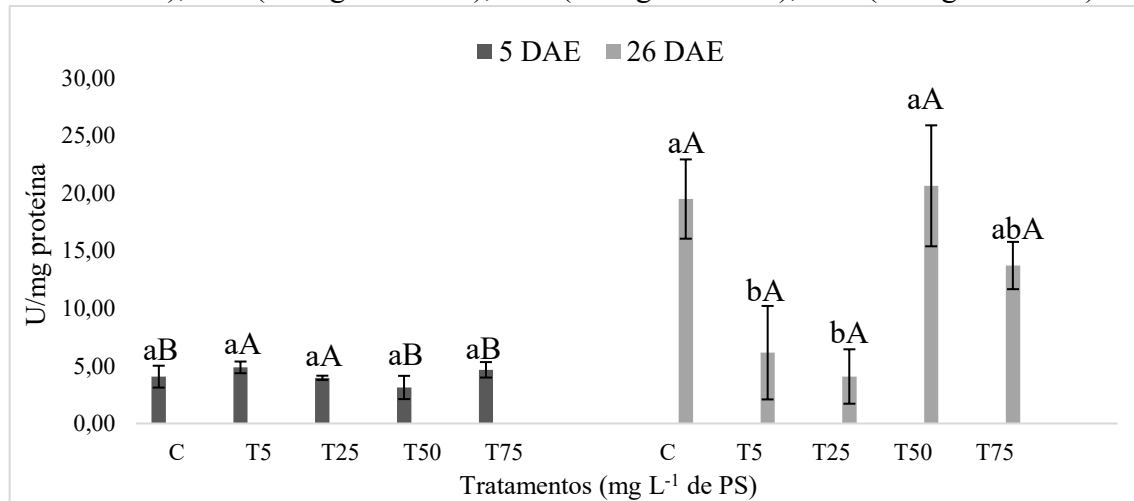
Figura 12 - Atividade enzimática específica de quimotripsina (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos na mesma idade ($p < 0,05$).

**Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Figura 13 - Atividade enzimática específica de α -amilase (média \pm desvio padrão) nas larvas de *Amphiprion ocellaris* com 5° e 26° DAE alimentados com *Artemia* sp. suplementada com diferentes concentrações de pancreatina suína (PS). C0-Controle (0 mg L⁻¹ de PS); T5 (5 mg L⁻¹ de PS); T25 (25 mg L⁻¹ de PS); T50 (50 mg L⁻¹ de PS); T75 (75 mg L⁻¹ de PS).



*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos na mesma idade ($p < 0,05$).

**Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

2.5 DISCUSSÃO

Valores de sobrevivência obtidos no presente estudo (30-48,3 %), estão dentro dos valores encontrados por outros autores para a espécie, exemplo de Oliveira (2015), que obteve sobrevivência entre 44 – 54%.

Em relação aos tratamentos, apesar do T25 e T75 (25 e 75 mg L⁻¹ de PS) mostrarem valores mais altos de sobrevivência, não foram detectadas diferenças estatísticas em relação aos demais tratamentos. Kolkovski *et al.* (1993) também observou que a suplementação de dois níveis de pancreatina suína na dieta inerte (ração) não resultou em diferença na sobrevivência de larvas do pargo europeu (*Sparus aurata*). Ao contrário, Tesser *et al.* (2006) obtiveram efeito positivo ($p < 0,05$) da suplementação enzimática (pancreatina suína) na dieta na sobrevivência de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Porém, nesses trabalhos, a inclusão das enzimas foi realizada durante a formulação das rações, sendo difícil uma comparação direta com o presente trabalho, que suplementou a enzima digestiva no alimento vivo.

Somente no estudo de Lira (2018), houve um aumento na taxa de sobrevivência (56%) de larvas do cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*) no tratamento com suplementação de 75 mg L⁻¹ da pancreatina suína (T75) na *Artemia* sp., ofertada do nascimento até o 30º dia de idade, em relação as outras concentrações.

Em relação ao crescimento, o tratamento com a suplementação de 75 mg L⁻¹ de PS na *Artemia* sp. apresentou maiores valores de comprimento total e taxa de crescimento diário das larvas de *Amphiprion ocellaris*. Este resultado está de acordo com o encontrado por Lira (2018) onde resultados positivos de comprimento e ganho de peso foram obtidos utilizando a *Artemia* sp. suplementada nesta mesma concentração, como fonte alimentar exclusiva para larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*. No entanto, no presente estudo, esse resultado não pode ser atribuído diretamente a adição da pancreatina suína no alimento vivo, visto que maiores valores enzimáticos tanto na *Artemia* sp. quanto na larva não ocorreram nesta concentração.

Resultado semelhante foi encontrado em outros trabalhos que mostram que a adição de enzimas digestivas exógenas na ração não influencia o crescimento dos peixes, como para larvas do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (KOLKOVSKI; KOVEN; TANDLER, 1997), para juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SIGNOR *et al.*, 2010), para carpa comum (*Cyprinus carpio*) (KAZERANI; SHAHSAVANI, 2011) e para kinguio (*Carassium auratus*) (SIGNOR *et al.*, 2013).

Contrariamente, Soares *et al.* (2008) verificaram que a inclusão de protease exógena na ração para tucunarés (*Cichla* sp.) melhorou o ganho de peso e a taxa de crescimento específico

da espécie. Ghosh *et al.* (2001) analisando os efeitos da α -amilase sobre o crescimento dos alevinos de rohu (*Labeo rohita*), observaram uma melhora na performance zootécnica nos animais que receberam a suplementação enzimática na dieta inerte. Adeoye *et al.* (2016) utilizando enzimas exógenas (fitase, protease e carbohidrase) adicionadas à ração para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) também obtiveram um aumento significativo no crescimento dos peixes em relação aos animais que não receberam a enzima suplementada na dieta.

As larvas de *Amphiprion ocellaris* iniciaram o processo de metamorfose a partir do 8° DAE nos tratamentos C0, T50 e T75. No entanto, do 8° DAE até o 11° DAE, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Somente a partir do 12° DAE, que os tratamentos C0 e o T75 apresentaram uma porcentagem significativamente mais alta de indivíduos que iniciaram metamorfose. Entretanto, no 14° DAE, todos os tratamentos alcançaram 100% do fechamento da 1ª banda corporal, apontando que a *Artemia* sp. enriquecida, apesar de ter aumentado o crescimento em alguns tratamentos, não influenciou no processo de metamorfose durante o período experimental.

Apesar disso, vale destacar que no presente estudo, o início da metamorfose ocorreu mais cedo quando comparado a outros trabalhos com a mesma espécie e outras espécies do gênero *Amphiprion*. Madhu *et al.* (2006) e Olivotto *et al.* (2011) observaram que as larvas de *A. ocellaris* iniciaram o processo de metamorfose entre 9-10° e 9-12° DAE, respectivamente. Já Ghosh *et al.* (2012) e Olivotto *et al.* (2008a), trabalhando com larvas de *Amphiprion clarkii*, obtiveram a primeira larva metamorfoseada no 15° e 12° DAE, respectivamente.

A avaliação da taxa de ingestão (IR) teve como finalidade conferir se a adição do composto enzimático (pancreatina suína) na *Artemia* sp. afetaria a palatabilidade do alimento e desta forma, a sua ingestão pelas larvas do peixe-palhaço *A. ocellaris*.

Para larvas da mesma idade, verificou-se maior taxa de ingestão da *Artemia* sp. não suplementada com PS, principalmente em relação a níveis mais elevados deste coquetel na *Artemia* sp. Este fato pode estar relacionado a uma alteração na palatabilidade deste crustáceo devido a presença da enzima, ou, a uma melhor digestão e aproveitamento dos nutrientes do próprio alimento vivo, deixando-as satisfeitas com uma menor quantidade de alimento ingerido. Este melhor aproveitamento dos nutrientes pode ter refletido, de forma geral, num maior crescimento como comprimento total e taxa de crescimento diário das larvas, como relatado anteriormente, porém sem a influência direta do coquetel enzimático.

Em relação a idade das larvas (5°, 12°, 26° DAE) também foi observada uma redução na taxa de ingestão do alimento vivo, onde as larvas de 5° e 12° DAE comeram mais que as de 26° DAE. Isto pode estar relacionado a um aumento da capacidade digestiva das larvas, como

resultado do crescimento e do desenvolvimento do trato digestório, juntamente com o aumento da atividade das enzimas digestivas endógenas e melhor digestão e absorção, ocorrendo, portanto, um melhor aproveitamento do alimento em menor quantidade. Complementarmente, é possível que a partir do desenvolvimento larval, a visão fica mais ativa e aumenta a estimulação química das larvas pela presa à medida que desenvolvem as habilidades de caça (FERNALD, 1993).

Assim, no presente estudo, a diminuição da taxa de consumo do alimento vivo com o aumento da idade larval pode também ser explicada ao fato de que as larvas se tornam mais seletivas quanto a sua alimentação conforme se desenvolvem, consumindo menos alimento de maior tamanho quando são juvenis (26° DAE) do que quando larvas (5° DAE). Segundo Kolkovski (2001), o efeito das enzimas digestivas na dieta depende de vários fatores como a idade, a espécie, os tipos de enzimas utilizadas na dieta e o hábito alimentar da espécie.

Em relação as análises enzimáticas, a atividade enzimática da pepsina e lipase das larvas mostraram baixos níveis de detecção, de acordo com o método de determinação utilizado, não sendo possível obter resultados significativos ($p > 0,05$).

O presente estudo mostrou que o uso do coquetel enzimático (pancreatina suína), bioencapsulado na *Artemia* sp. não proporcionou um aumento na atividade enzimática deste microcrustáceo, visto que as concentrações testadas não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (C0). O tratamento controle (C0) apresentou atividade de tripsina de $0,014 \pm 0,002$ U mg de proteína⁻¹, atividade de quimotripsina de $0,0024 \pm 0,0004$ U mg de proteína⁻¹ e atividade de amilase de $0,17 \pm 0,06$ U mg de proteína⁻¹ do alimento vivo (*Artemia* sp.), mostrando que há atividade enzimática nesse microcrustáceo sem adição do coquetel enzimático, logo possuindo suas próprias proteases. Na pesquisa de Souza (2012) foi verificado atividade específica das proteases alcalinas (tripsina e quimotripsina) da *Artemia* sp. de $0,00048$ U mg de proteína⁻¹.

Com relação ao percentual de contribuição enzimática da *Artemia* sp. para as larvas, o presente trabalho obteve uma contribuição de 60% da tripsina no tratamento controle, mostrando que a adição da pancreatina suína não contribuiu para o aumento dessa atividade enzimática nas larvas de peixe-palhaço.

No presente estudo, a contribuição específica da quimotripsina e da amilase proveniente da *Artemia* sp. nas larvas foram abaixo a 3%, independentemente da idade das larvas e das concentrações de pancreatina suína testadas, não havendo diferença significativa dos tratamentos com o controle. Resultado semelhante foi encontrado por Kurokawa, Shiraishi e Suzuki (1998) que obtiveram 1% de contribuição das proteases exógenas em larvas de sardinha

japonesa (*Sardinops melanoticus*) alimentadas com alimento vivo. Diferentemente, Lira (2018) relatou que a suplementação da *Artemia* sp. com a pancreatina suína na concentração de 75 mg L⁻¹ para cavalos-marinho com 10 dias de vida contribuiu efetivamente com 92,88 % de enzimas para tripsina e 59,65% para quimotripsina, e para a atividade exógena da amilase os níveis permaneceram quase semelhantes, em torno de 20%.

Em relação as enzimas digestivas das larvas, no presente estudo verificou-se que houve um aumento da atividade enzimática do 5° ao 26° DAE, em todos os tratamentos, corroborando com Frias-Quintana *et al.* (2019) que afirmam que larvas de peixes apresentam um nível baixo de atividade antes do início da alimentação exógena e aumentam com o desenvolvimento larval.

De acordo com Seixas-Filho (2013) a atividade de proteases alcalinas em nível intestinal está relacionada a vários fatores tais como: morfometria do tubo digestório e o arranjo das pregas intestinais. Dessa forma, observa-se que no presente estudo há maior atividade da tripsina em larvas com 26° DAE, em relação com a 5° DAE, sendo assim, o resultado do presente trabalho possivelmente está relacionado com o desenvolvimento do trato digestório da larva. Visto que, nas análises enzimáticas as atividades das enzimas nas larvas não foram proporcionais a contribuição enzimática da *Artemia* sp. com e sem suplementação de PS.

Lira (2018) verificou um aumento de 29 vezes na atividade específica da tripsina de cavalos-marinhos (*Hippocampus reidi*) durante o período de 0 a 20 dias de idade no tratamento com 75 mg L⁻¹ de PS. Novelli *et al.*, (2016) também observou em *H. reidi* alimentado com *Artemia* sp. enriquecida com ácidos graxos (DHA Protein Selco®) um aumento de 1,33 vezes na atividade específica de tripsina conforme o seu desenvolvimento no mesmo período de vida.

A atividade de quimotripsina mostrou um aumento significativo em relação a idade da larva, porém não em relação a suplementação com PS. Teles *et al.* (2018) analisando a atividade de enzimas digestivas em *Seriola rivoliana* observaram uma tendência de aumento da atividade de quimotripsina em decorrência do tempo de desenvolvimento. Tendência que pode ser observada também no presente estudo, onde se observa uma baixa atividade em 5° DAE e alta em 26° DAE. Souza (2012) observou para o neon gobi (*Elacatinus figaro*) diferenças significativas na atividade das proteases alcalinas, onde em adultos, a atividade foi 309 vezes maior (0,4 U/mg de proteína) quando comparada com os estágios larvais (0,0015 U/mg de proteína) para o neon gobi (*Elacatinus figaro*).

2.6 CONCLUSÃO

A partir deste estudo conclui-se que, apesar do uso da pancreatina suína suplementada no alimento vivo (*Artemia* sp.) não afetar a taxa de sobrevivência e o peso dos animais, a concentração de 75 mg L⁻¹ de PS aumentou significativamente o crescimento das larvas em comprimento, apesar de não ser verificado um aumento de atividade da enzimática através da suplementação de PS. Em relação ao tempo de larvicultura, foi notado um início precoce da metamorfose, com 8° DAE. Foi verificado ainda que, a taxa de ingestão do alimento vivo diminuiu com a elevação da concentração enzimática suplementada no alimento vivo em animais da mesma idade, e com o aumento da idade larval no mesmo tratamento, fatos possivelmente atribuídos a um melhor aproveitamento dos nutrientes em termos do incremento da digestibilidade da *Artemia* sp. no primeiro caso, e com o aumento da capacidade digestiva (desenvolvimento do trato digestório) e de predação da larva ao longo do desenvolvimento larval de *Amphiprion ocellaris*, no segundo caso.

De forma geral, pode-se concluir que, a *Artemia* sp. suplementada com a pancreatina suína não aumentou e não contribuiu para a atividade das enzimas digestivas (pepsina, lipase, tripsina, quimotripsina e amilase) das larvas do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*, sendo que possivelmente a atividade das enzimas digestivas das larvas estaria mais relacionada com o desenvolvimento do trato digestório das larvas do que ao fornecimento de enzimas digestivas exógenas. Novos estudos devem ser realizados para elucidar este fato.

REFERÊNCIAS

- ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobine. **The Journal of General Physiology**, [S. l], v. 22, p. 79-89, 1938.
- ADEOYE, A. A.; JARAMILLO-TORRES, A.; FOX, S. W.; MERRIFIELD, D. L.; DAVIES, S. J. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. **Animal Feed Science and Technology**, [S. l], v. 215, p. 133-143, 2016.
- 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 UK**, Reino Unido, v. 80, n. 6, p.1103-1109, 2000.
- APPLEBAUM, S. L.; HOLT, G. J. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Marine Biology**, [S. l], v. 142, p. 1159-1167, 2003.
- DELMAR, E. G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J. W.; GEOKAS, M. C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. **Analytical Biochemistry**, [S. l], v. 99, p. 316-320, 1979.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, E. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l], v. 95, p. 271-278, 1961.
- FARIA, P. M. C.; RIBEIRO, K.; ALMEIDA, C. F.; SANTOS, F. W. M.; SANTOS, R. F. B. Aquicultura Ornamental: Um mercado promissor. **Revista Panorama da Aquicultura**, [S. l], ed. 154. 2016. <https://panoramadaaquicultura.com.br/aquicultura-ornamental-um-mercado-promissor> Acesso em: 21 mar. 2019
- FARIA, C. F. A. de. **Caracterização do mercado de aquariofilia no Rio Grande do Norte e a aquicultura ornamental de baixo custo de implantação**. 2018. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.
- FERNALD, R. D. Vision. In: Evans, D. H., (Ed.), **The Physiology of Fishes**, CRC press, U.S.A, p. 161-190, ago., 1993.
- FRIAS-QUINTANA, C. A.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C. A.; GUERRERO-ZÁRATE, R.; VALVERDE-CHAVARRÍA, J. B.; ULLOA-ROJAS, J. B. Changes in digestive enzymes activities during the initial ontogeny of wolf cichlid, *Parachromis dovii* (Perciformes: Cichlidae). **Neotrop. ictiol.** Maringá, v. 17, n. 1, 2019.
- GHOSH, K.; CHADRABORTY, K.; SEM, S. K.; RAY, A. K. Effects of thermostable bacterial α -amylase on growth and feed utilization in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. **Israeli Journal Aquaculture - Bamidgeh**, [S. l], v. 53, p. 101-109, 2001.
- GHOSH, S.; KUMAR, T. T. A.; NANTHINIDEVI, K.; BALASUBBRANIAN, 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, n.1, p. 56-60, 2012.

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

KAZERANI, H. R.; SHAHSAVANI, D. The effect of supplementation of feed with exogenous enzymes on the growth of common carp (*Cyprinus carpio*). **Iranian Journal of Veterinary Research**, [S. l], v. 12, n. 2, p. 127-132, 2011.

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

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, G. W. N.; GERTLER, A. The effect of dietary exogenous enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, [S. l], v.12, p. 203-209, 1993.

KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, [S. l], v. 155, n. 4, p. 193-205, 1997.

KOLKOVSKI S.; TANDLER A. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture Nutrition**, [S. l], v. 6, n.1, p. 11-15, 2000.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, [S. l], v. 200, p. 181-201, 2001.

KUROWAKA, T.; SHIRAIISHI, M.; SUZUKI, T. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardinha *Sardinops melanoticus* larvae. **Aquaculture**, [S.l], v. 161, p. 491-499, 1998.

LIRA, A. P. S. **Caracterização do trato digestório e avaliação da sobrevivência e do crescimento na larvicultura do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* alimentado com copépode selvagem e *Artemia* suplementada com pancreatina suína**. 2018. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2018.

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.

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. 315-345, 2010.

NAZ, M. The changes in the biochemical compositions and enzymatic activities for rotifer (*Brachionus plicatilis*, Muller) and *Artemia* during the enrichment and starvation periods. **Fish Physiology and Biochemistry**, [S. l], v. 34, n. 4, p. 39-404, 2008.

NOVELLI, B.; OTERO-FERRER, F.; DIAZ, M.; SOCORRO, J. A.; CABALLERO, M. J.; DOMÍNGUEZ, L. M.; MOYANO, F. J. Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). **Aquaculture**, [S.l.], v. 464, p. 196-204, 2016.

O' KEEFE, S.J.; CARIEM, A. K.; LEVY, M. The exacerbation of pancreatic endocrine dysfunction by potent pancreatic exocrine supplements in patients with chronic pancreatitis. **Journal Clinical Gastroenterol**, [S. l], v. 32, n. 4, p. 319-23, 2001.

OLIVEIRA, R. M. **Incubação e larvicultura de peixes-palhaço em uma produção comercial no estado de São Paulo**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2015.

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

RODRIGUES, R. V. Produção do peixe palhaço *Amphiprion* sp. **Aquaculture Brasil**, Laguna, v. 5, p. 83-83, 2017.

SEIXAS-FILHO, J. T. Revisão sobre as enzimas digestivas nos peixes teleósteos e seus métodos de determinação. **Augustus**, Rio de Janeiro, v. 08, n. 17, p. 30-45, 2003.

SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l], v. 39, n. 5, p. 977-983, 2010.

SIGNOR, A. A.; JÚNIOR, D. L.; COSTA, J. M.; FRIES, E. M.; SIGNOR, A.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. Complexo enzimático na dieta de alevinos de kinguio (*Carassius auratus*), **SEMINÁRIO: CIÊNCIAS AGRÁRIAS**, [S. l], v. 34, n. 3, p. 1381-1388, 2013.

SOARES, E. C.; PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R.; SILVA, R. C. S. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla* sp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 6, p. 971-976, 2008.

SOUZA, M. F. da S. **Proteases alcalinas e manejo alimentar na larvicultura do neon gobi (*Elacatinus figaro*)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Pesqueiros) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2012.

TANU; DEOBAGKAR. D. D.; KHANDEPARKER, R.; SREEPADA, R. A.; SANAYE, V. S.; PAWAR, H. B. A study on bacteria associated with the intestinal tract of farmed yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852): characterization and extracellular enzymes. **Aquaculture Research**, [S. l], v. 43, p. 386-394, 2012.

TELES, A.; SALAS-LEIVA, J.; ALVAREZ-GONZÁLEZ, C. A.; TOVAR-RAMÍREZ, D. Changes in digestive enzyme activities during early ontogeny of *Seriola rivoliana*. **Fish Physiol Biochem**, [S.l], v. 45, p. 733, 2019.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J. PIZANO JUNIOR, J. M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

THORNHILL, D. J. Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade. **Defenders of Wildlife**, [S. l], v. 187, 2012.

WILKERSON, J. D. **Clownfishes**: a guide to their captive care, breeding & natural history. Charlotte: Microcosm, p. 260, 2003.

REFERÊNCIA DA INTRODUÇÃO GERAL

ALLEN, G. R. **The anemone fishes: Their classification and biology**. Neptune City: TFH Publications, 1972.

BEDFORD M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Cambridge: Ed. CABI Publishing, 2001.

BENGTSON, D. A. Status of marine aquaculture in relation to live prey: Past, Present, Future, In: STOTRUP, J. G.; MCEVOY, L. A. **Live Feeds in Marine Aquaculture**. Blackwell Science, Oxford-UK, p. 1-16, 2003.

BUSTON, P. Size and growth modification in clownfish. *Nature*, v. 424, n. 6945, p. 145-146, 2003.

CARRACA, S. I. S. **Estágio no Oceanário de Lisboa Técnicas de aquariofilia em aquários públicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos) – Universidade do Porto. Lisboa, 2016.

DELBARE, D., LAVENS, P., SORGELOOS, P. Clownfish as a reference model for nutritional experiments and determination of egg/larval quality. In: LAVENS, P., JASPERS, E., ROELANTS, I. (Ed.), **Fish and Shellfish Larviculture Symposium**. [S. l], v. 24, p. 22-25, 1995.

DHONT, J.; VAN STAPPEN, G. Biology, Tank Production and Nutritional Value of *Artemia*, In: STOTRUP, J. G.; MCEVOY, L. A. **Live Feeds in Marine Aquaculture**. Blackwell Science, Oxford-UK, p. 65-121, 2003.

FARIA, C. F. A. de. **Caracterização do mercado de aquariofilia no Rio Grande do Norte e a aquicultura ornamental de baixo custo de implantação**. 2018. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

FARIA, P. M. C.; RIBEIRO, K.; ALMEIDA, C. F.; SANTOS, F. W. M.; SANTOS, R. F. B. Aquicultura Ornamental: Um mercado promissor. *Revista Panorama da Aquicultura*, ed. 154. 2016. <https://panoramadaaquicultura.com.br/aquicultura-ornamental-um-mercado-promissor/> Acesso em: 21 mar. 2019.

FERNANDO, C. H. Zooplankton, fish and fisheries in tropical freshwaters. In: **Studies on the Ecology of Tropical Zooplankton**. Springer, Dordrecht, v. 92, p. 105-123, 1994.

FISCHER, G.; MAIER, J. C.; RUTZ, F.; BERMUDEZ, V. L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas a base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.31, n. 1, p. 402-410, 2002.

GISBERT, E., MORAIS, S., MOYANO, F. J. Feeding and digestion. In: **Larval fish aquaculture**. Nova Publishers, New York, p. 73-124, 2013.

GUERREIRO, J. A. **Reprodução de *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830) alimentados com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em diferentes concentrações**. Dissertação

(Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.

HOFF JR, F. H. Pairing Clownfish. FAMA 9/84.1983.

HOLT, G. J. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: CATO, J. C.; BROWN, C. L. **Marine Ornamental species: Collection, Culture and Conservation**. EUA: Iowa State Press, 2003. p. 251-254.

KOBAYASHI, Y.; HORIGUCHI, R.; MIURA, S.; NAKAMURA, M. Sex and tissue-specific expression of P450 aromatase in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [S.l.], vol. 155, p. 237-244, 2010.

KOLKOVSKI S.; TANDLER A. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture Nutrition**, [S.l.], v. 6, p. 11-15, 2000.

KOLKOVSKI, K. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implication and applications to formulated diet. **Aquaculture**, [S.l.], v. 200, p.181-201, 2001.

KUBITZA, F.; ONO, E. A.; LOVSHIN, L. L.; SAMPAIO, A. V. **Planejamento da Produção de Peixes**. 3ª ed. Jundiaí/SP: Acqua Supre Com. Suprim. Aquicultura Ltda, 1999.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the productions and use of live food for aquaculture**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1996.

LAZO, J. P.; DARIAS, M. J.; GISBERT, E. Ontogeny of the digestive tract. In: HOLT, I. **Larval Fish Nutrition**. Wiley Online Library, Oxford, 2011.

LECZNIESKI, J. L. Considerações práticas do uso de enzimas. In: V SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 5, 2006, Florianópolis, SC. **Anais [...]**. Florianópolis, SC: AVESUI, 2006, p.34-46.

LIMA, A. O. *Amphiprion ocellaris* (peixe-palhaço). **Revista Panorama da Aquicultura**, [S.l.], ago., 2010. Disponível em: <https://www.aquaa3.com.br/2012/06/amphiprion-ocellaris-peixe-palhaco.html#.XLUgEehKjIU>. Acesso em 15 abr. 2019.

LIMA, A. O.; GUERREIRO, J. A.; PORTZ, L. Peixes palhaço: antecedentes biológicos e introdução ao cultivo. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 20, n. 120. p.38-45, ago., 2010. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/peixes-palhaco-antecedentes-biologicos-e-introducao-ao-cultivo/>. Acesso em 15 abr. 2019.

LIM, L. C.; CHO, J. L.; DHERT, P.; WONG, C. C.; NELIS, H.; SORGELOOS, P. Use of decapsulated artêmia cysts in ornamental fish culture. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 575-589, 2002.

LIRA, A. P. S. **Caracterização do trato digestório e avaliação da sobrevivência e do crescimento na larvicultura do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* alimentado com copépode selvagem e *Artemia* suplementada com pancreatina suína**. 2018. Tese

(Doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2018.

LUBZENS, E.; ZMORA, O. Production and nutritional value of rotifers. In: STOTRUP, J. G.; MCEVOY, L. A. **Live Feeds in Marine Aquaculture**. Blackwell Science, Oxford-UK, p. 17-64, 2003.

MACEDA-VEIGA, A.; DOMÍNGUEZ- DOMÍNGUEZ, O.; ESCRIBANO-ALACID, J.; LYONS, J. The aquarium hobby: Can sinners become saints in freshwater fish conservation? **Fish and Fisheries**, v. 17, p. 860-874, 2016.

MASCARELL, J.; RYAN, M. Technical aspects of enzyme utilization: Dry vs liquid enzymes. In: MORAND-FEHR P. (Ed.). **Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges**. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, p.161-174, 1997.

NAZ, M. The changes in the biochemical compositions and enzymatic activities for rotifer (*Brachionus plicatilis*, Muller) and *Artemia* during the enrichment and starvation periods. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 391-404, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7ª ed. Porto Alegre Artmed Editora, p. 1304, 2018.

OLIVOTTO, I.; PLANAS, M.; SIMÕES, N.; HOLT, J. G.; AVELLA, M. A.; CALADO, R.; Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 135-166. 2011.

O' KEEFE, S.J.; CARIEM, A. K.; LEVY, M. The exacerbation of pancreatic endocrine dysfunction by potent pancreatic exocrine supplements in patients with chronic pancreatitis. **Journal Clinical Gastroenterol**, [S.l.], v. 32, n.4, p. 319-23, 2001.

RAGHAVAN, R.; DAHANUKAR, N.; TLUSTY, M. F.; RHYNE, A. L.; KUMAR, K. K.; MOLUR, S.; ROSSER, A. M. Uncovering an obscure trade: Threatened freshwater fishes and the aquarium pet markets. **Biological Conservation**, [S. l.], v. 164, p. 158-169, 2013.

RODRIGUES, R. Peixe Palhaço. 2002. Disponível em: <http://www.reefforum.net/f22/peixes-palhaco-100/>. Acesso em: 28 jan. 2019.

RODRIGUES, R. V. Produção do peixe-palhaço *Amphiprion* sp. **Aquaculture Brasil**. Laguna-SC, 2017. Disponível em: <http://www.aquaculturebrasil.com/2017/06/20/producao-do-peixe-palhaco/>. Acesso em: 25 jan. 2019.

SILVA, E. N.; TEIXEIRA, A. S.; FIALHO, E. T.; BERTECHINI, A. G.; SOUZA, P. R. I. Efeitos dos probióticos e antibióticos sobre as vilosidades e pH do trato gastrointestinal de Frangos de corte. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, p. 163-173. Edição especial, dez., 2000.

SILVEIRA, J.; SILVA, C. P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; ALEXANDRE, D.; ELIAS, M. A.; FRACALOSSO, D. M. Freshwater catfish jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae are prepared to digest inert feed at the exogenous feeding onset: physiological and histological assessments. **Fish Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 39, p. 1581-1590, dez., 2013.

STECH, M. R.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO JÚNIOR, J. M. Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes e o uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, [S. l.], v.8, n. 2, 2009.

SORGELOOS, P. A. P.; DHERT, A.; CANDREVA, P. Use of the brine shrimp, *Artemia* sp. in marine fish larviculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, p. 147-159, 2001.

SZYPER, J. P. Live feeds: Production of the brine shrimp *Artemia* without natural sea water or microalgae. **Aquaculture Extension Bulletin**, [S. l.], p.1-6, 2003.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J. PIZANO JUNIOR, J. M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

THORNHILL, D. J. Ecological Impacts and Practices of the Coral Reef Wildlife Trade. **Defenders of Wildlife**, [S. l.], v. 187, 2012.

TIZOL, C. R. Uso de la levedura torula (*Torulopsis utilis*) en la obtención de biomasa de *Artemia*. **Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín**, Santa Marta, v.23, p.165-171, 1994.

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.

VARGHESE, B.; PAULRAJ, R.; GOPAKUMAR, G.; CHAKRABORTY, K. Dietary influence on the egg production and larval viability in True Sebae Clownfish *Amphiprion sebae*, Bleeker 1853. **Asian Fisheries Society**, Philippines, v. 22, p. 7-20, 2009.

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

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

WOOD, E. **Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies**. Londres: Marine Conservation Society, 2001.

YE, L.; YANG, S-Y.; ZHUN, X-M.; LIU, 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, p.241-245, 2011.