



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

Jonathas Rodrigo dos Santos Pinto

**Inclusão da farinha de barata cinérea *Nauphoeta cinerea* (OLIVER 1789), na dieta de peixe-palhaço juvenil *Amphiprion ocellaris* (CUVIER 1830): desempenho zootécnico, histologia e atividade de enzimas digestivas**

Florianópolis

2021

JONATHAS RODRIGO DOS SANTOS PINTO

**Inclusão da farinha de barata cinérea *Nauphoeta cinerea* (OLIVER 1789), na dieta de peixe-palhaço juvenil *Amphiprion ocellaris* (CUVIER 1830): desempenho zootécnico, histologia e atividade de enzimas digestivas**

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Yumi Tsuzuki

Florianópolis

2021

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

Pinto, Jonathas Rodrigo dos Santos

Inclusão da farinha de barata cinérea *Nauphoeta cinerea* (OLIVER 1789), na dieta de peixe-palhaço juvenil *Amphiprion ocellaris* (CUVIER 1830): desempenho zootécnico, histologia e atividade de enzimas digestivas / Jonathas Rodrigo dos Santos Pinto ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki, 2021.

48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Peixes Ornamentais Marinhos. 3. Nutrição de Peixes. 4. Farinha de Barata Cinérea. I. Tsuzuki, Mônica Yumi . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

JONATHAS RODRIGO DOS SANTOS PINTO

**Inclusão da farinha de barata cinérea *Nauphoeta cinerea* (OLIVER 1789), na dieta de peixe-palhaço juvenil *Amphiprion ocellaris* (CUVIER 1830): desempenho zootécnico, histologia e atividade de enzimas digestivas**

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

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

Prof<sup>a</sup>. Débora Machado Fracalossi, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>. Mônica Yumi Tsuzuki, Dr<sup>a</sup>.  
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.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup>. Mônica Yumi Tsuzuki, Dr<sup>a</sup>.  
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Mirabel F. Pinto e Adelma  
Neta dos Santos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela minha saúde e por ser o meu guia e a minha fortaleza durante essa jornada, a ele toda honra e toda a glória.

Aos meus pais, Mirabel e Adelma, por toda a confiança depositada em mim, por não medirem esforços para que eu alcance todos os meus objetivos. Vocês são a minha base, obrigado por tudo, amo vocês.

À minha irmã Millena Gabriela, por todo o carinho, por compreender a minha ausência e pelos risos que me proporcionou através das vídeo chamadas. Amo você, pequena.

À minha noiva, amiga, companheira e parceira de debates acadêmicos, Fernanda Carolina, por todo carinho, apoio e compreensão durante esse período do mestrado, pelas incontáveis horas que se colocou à disposição para ouvir os meus desabafos, e com maestria me acalmar. Obrigado por tudo. Te amo.

Aos meus tios Antonino e Miriam, pelo carinho, confiança e por todo o apoio que vocês me deram. Muito obrigado.

Aos companheiros do complexo Sônia's house, Thiago, Julianna, Ana Paula, João, Paulo, Greice e Ramires, pelas conversas, churrascos, risadas e vários momentos de alegria que jamais esquecerei. Muito obrigado. À Vanessa, Thayná, Marisa e Ailton por toda a parceria durante o período em que moramos juntos, pela amizade e companhia. Vocês são muito especiais. Muito obrigado!

À minha orientadora Mônica Y. Tsuzuki, por toda a confiança e pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de peixes e ornamentais marinhos (LAPOM). Muito obrigado pela orientação, contribuição acadêmica e profissional durante esse período. Gratidão!

Aos companheiros de LAPOM, Ksênia, Giovanni, Ellen Monique, Tânia, Renata, Rafael, Márcia, Helen Rayane, Ana Carolina, João e Gabriel, pela parceria, conversas, e momentos de descontração. Á Sérgio, Danillo e Ilson, por todos os ensinamentos, ajuda diária e paciência. Obrigado por tudo.

As equipes técnicas do laboratório de peixes marinhos (LAPMAR) e laboratório de moluscos marinhos (LMM), especialmente a Elenice Caio, Everton, Jaque e Juan por toda a ajuda, ensinamentos e materiais disponibilizados. Muito obrigado!

Á equipe técnica do laboratório de nutrição de espécies aquícolas (LABNUTRI), em especial a Professora Débora Fracalossi, pela parceria, pelo incentivo, e por toda a contribuição na minha formação acadêmica. À Maria Fernanda, pela ajuda com a formulação, elaboração e

fabricação das dietas experimentais, pelos ensinamentos e pela pronta disponibilidade. Gratidão.

Ao professor Carlos Peres e à Cristina Rios pela parceria, ensinamentos e ajuda com as análises enzimáticas realizadas no laboratório de bioquímica de insetos. Muito obrigado!

À professora Maria Lúcia e ao professor Marcelo Fulgêncio pela parceria na realização das análises histológicas, à equipe técnica do laboratório de cordados/ictiologia da Universidade Federal de Sergipe, em especial aos técnicos Débora, Jô e Gileno. Muito obrigado!

As empresas Opta alimentos LTDA e Agroforte: indústria, comércio e transporte LTDA, pela parceria e doação de parte dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais do trabalho, especialmente à Humberto Souza e Vicente. Muito obrigado!

Aos servidores da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial aos colaboradores do centro de ciências agrárias. Obrigado!

Aos professores, servidores e colaboradores do Programa de pós graduação em aquicultura da UFSC. Vocês são essenciais. Muito Obrigado!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Com a expansão da aquicultura e a redução da disponibilidade da farinha de peixe para a formulação de rações, esse produto tem se tornado cada vez mais caro e insustentável. Assim, a busca por ingredientes mais rentáveis e sustentáveis para a indústria aquícola vem crescendo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da substituição parcial, em níveis crescentes de inclusão (0, 25, 50 e 75%), da proteína da farinha de peixe pela proteína da farinha da barata cinérea *Nauphoeta cinerea*, na dieta de juvenis (3,03±0,36cm; 0,63±0,19g), do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*. Os parâmetros de desempenho zootécnico (sobrevivência, ganho de peso, taxa de crescimento específico em peso, crescimento diário em comprimento, consumo de ração, taxa de conversão alimentar e fator de condição) foram avaliados após 45 dias de experimento. Análise de enzimas digestivas (tripsina e amilase) e histologia do intestino e fígado dos peixes também foram realizadas. A substituição da farinha de peixe por farinha de *N. cinerea* não mostrou efeitos deletérios no crescimento de juvenis de *A. ocellaris*, mostrando que este é um ingrediente promissor para a espécie. Entretanto, houve uma tendência na diminuição do ganho de peso com o aumento da percentagem de inclusão da farinha de barata cinérea nas dietas, e uma pior conversão alimentar (2,13) para os peixes alimentados com o maior nível de inclusão (T75), apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos (P>0,05). Já o consumo de ração (CR) foi claramente menor em T75 comparado aos demais níveis de inclusão da farinha de barata cinérea (P<0,05). O menor consumo de ração, juntamente com uma pior conversão alimentar e ganho de peso no tratamento com a substituição de 75% de farinha de peixe pela de barata cinérea podem estar relacionados à presença da quitina em níveis mais elevados neste tratamento. Após 45 dias de experimento, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na atividade específica das enzimas digestivas nos diferentes tratamentos. A histologia não revelou sinais de lesões no trato intestinal de nenhum dos tratamentos, no entanto foi verificado uma redução significativa no comprimento das vilosidades intestinais em amostras do T75 em relação ao T0. O acúmulo de lipídios nos hepatócitos foi proporcional ao aumento dos níveis de inclusão da farinha de *N. cinérea* nas dietas experimentais e o IHS indicou que o acúmulo de glicogênio foi menor nos tratamentos com a inclusão da farinha de barata cinérea. A partir do acima exposto, recomenda-se, nas condições do presente estudo, a substituição de até 50% da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea nas dietas para juvenis de peixes palhaços.

**Palavras-chave:** Aquicultura; Peixes Ornamentais Marinhos; Nutrição de Peixes; Farinha de Barata Cinérea.

## ABSTRACT

With the expansion of aquaculture and the reduction in the availability of fishmeal for feed formulation, this product has become increasingly expensive and unsustainable. Thus, the search for more profitable and sustainable ingredients for the aquaculture industry has been growing. The objective of this work was to evaluate the effect of partial replacement, at increasing levels of inclusion (0, 25, 50 and 75%), of fish meal protein by the cinerea cockroach meal protein *Nauphoeta cinerea*, in the diet of juveniles ( $3.03 \pm 0.36$ cm;  $0.63 \pm 0.19$ g) of the clownfish *Amphiprion ocellaris*. The zootechnical performance parameters (survival, weight gain, specific growth rate in weight, daily growth in length, feed intake, feed conversion rate and condition factor) were evaluated after 45 days of the experiment. Analysis of digestive enzymes (trypsin and amylase) and histology of intestine and liver were also performed. The replacement of fish meal by *N. cinerea* meal did not show deleterious effects on the growth of *A. ocellaris* juveniles, showing that this is a promising ingredient for the species. However, there was a trend towards a decrease in weight gain with an increase in the percentage of inclusion of cinerea cockroach meal in the diets, and the worst feed conversion (2.13) for fish fed the highest level of inclusion (T75), although there were no significant differences between treatments ( $P > 0.05$ ). The feed intake (CR) was clearly lower at T75 compared to other levels of inclusion of cinerea cockroach meal ( $P < 0.05$ ). The lower feed intake, along with the worst feed conversion and weight gain in the treatment with the substitution of 75% of fish meal for the cinerea cockroach meal may be related to the presence of chitin at higher levels in this treatment. After 45 days of experiment, the results showed that there were no significant differences in the specific activity of digestive enzymes in the different treatments. Histology did not reveal signs of lesions in the intestinal tract of any of the treatments, however there was a significant reduction in the length of the intestinal villi in samples from T75 compared to T0. The accumulation of lipids in hepatocytes was proportional to the increase in the levels of inclusion of *N. cinerea* meal in the experimental diets and the IHS indicated that the accumulation of glycogen was lower in treatments with the inclusion of cinerea cockroach meal. Based on the above, it is recommended, under the conditions of the present study, the replacement of up to 50% of fish meal by cinerea cockroach meal in diets for juvenile clown fish.

**Keywords:** Aquaculture; Marine Ornamental Fish; Fish Nutrition; Cinérea Cockroach Flour.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Microfotografia do intestino de *Amphiprion ocellaris* juvenil. Letra A indica medida do comprimento da vilosidade.....25
- Figura 2 - Microfotografia do intestino de *Amphiprion ocellaris* juvenil alimentado com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. (T0- A) e T25, T50, T75 (B, C e D respectivamente) .....29
- Figura 3 - Microfotografia do fígado de *Amphiprion ocellaris* juvenil alimentado com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. (T0- A) e T25, T50, T75 (B, C e D respectivamente) .....31

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas para alimentar o peixe – palhaço *Amphiprion ocellaris* contendo diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha de adultos da barata cinerea *Nauphoeta cinérea*..... 22
- Tabela 2 - Composição aproximada dos ingredientes proteicos.....23
- Tabela 3 - Parâmetros de desempenho de *Amphiprion ocellaris* alimentados com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.....28
- Tabela 4 - Atividade enzimática específica de amilase e tripsina (U mg de proteína<sup>-1</sup>) nos *Amphiprion ocellaris* alimentados com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão .....28

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>12</b>
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
1.1.1	<b>Aquicultura ornamental.....</b>	<b>12</b>
1.1.2	<b>O peixe-palhaço <i>Amphiprion ocellaris</i> .....</b>	<b>13</b>
1.1.3	<b>Substituição de ingredientes proteicos em dietas para aquicultura.....</b>	<b>14</b>
1.1.4	<b>Uso dos insetos como ingrediente alternativo em dietas .....</b>	<b>15</b>
1.1.5	<b>A barata cinérea <i>Nauphoeta cinerea</i> .....</b>	<b>16</b>
1.2	OBJETIVOS.....	17
1.2.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>17</b>
1.2.2	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>18</b>
2.1	INTRODUÇÃO .....	19
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1	<b>Origem dos animais e manutenção experimental .....</b>	<b>21</b>
2.2.2	<b>Delineamento experimental .....</b>	<b>22</b>
2.2.3	<b>Formulação e preparo das dietas experimentais .....</b>	<b>23</b>
2.2.4	<b>Análise biométrica .....</b>	<b>24</b>
2.2.5	<b>Análise histológica.....</b>	<b>24</b>
2.2.6	<b>Análise enzimática .....</b>	<b>25</b>
2.2.7	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>27</b>
2.3	RESULTADOS .....	27
2.3.1	<b>Parâmetros físico-químicos da água .....</b>	<b>27</b>
2.3.2	<b>Desempenho zootécnico .....</b>	<b>27</b>
2.3.3	<b>Atividade enzimática .....</b>	<b>28</b>
2.3.4	<b>Análise histológica.....</b>	<b>29</b>
2.4	DISCUSSÃO.....	30
2.5	CONCLUSÃO .....	35
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>43</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Aquicultura ornamental

O foco da aquicultura mundial está voltado principalmente para a produção de camarões e peixes de corte por efeito do crescente aumento populacional e demanda por proteína animal de qualidade (FAO, 2020). Apesar desta realidade, o cultivo de peixes ornamentais tem causado um impacto econômico positivo em diversos países em virtude do alto valor econômico dos indivíduos, tornando-se uma importante atividade no setor aquícola mundial (RHYNE *et al.* 2017; EVERS *et al.* 2019). Em meados da década de 50, com o aumento do comércio global através do frete aéreo, a indústria ornamental passou a ter uma importância comercial significativa (REYNOSO *et al.*, 2012; OLIVOTTO *et al.*, 2017). Atualmente, os peixes ornamentais também vêm se inserindo na indústria pet, uma vez que, com as crescentes restrições para a manutenção de animais domésticos como cães e gatos em apartamentos, os aquários se tornaram importantes pois ocupam menor espaço nas residências (NOVÁK *et al.* 2020).

O mercado de peixes ornamentais conta com a participação de mais de 50 países entre importadores e exportadores, movimentando 4,2 bilhões de dólares na economia mundial, com alta perspectiva de crescimento até 2024. Possuindo uma CAGR (taxa de crescimento anual composta) de mais de 7,85%, em termos de valor, a previsão é que alcance cerca de US\$ 6,2 bilhões até 2024 (BIONDO e BURKI, 2020). O Brasil já foi um dos cinco maiores países exportadores de peixes ornamentais tropicais e, ao final da década de 90, observou-se um aumento considerável no interesse em organismos ornamentais marinhos (GASPARINI *et al.*, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2015).

Diferente dos peixes ornamentais de água doce, onde cerca de 90% da produção é proveniente do cultivo (CALADO *et al.* 2017), a grande maioria dos ornamentais marinhos são capturados diretamente da natureza. Devido à escassez de dados e de um programa de monitoramento, pouco se sabe sobre o número de indivíduos e de espécies que são comercializados, pois normalmente a fonte de origem e os métodos de coleta não são revelados, sendo difícil classificar essa prática como sustentável (MONTICINI, 2010; OATA, 2014).

A aquicultura é considerada como uma importante ferramenta utilizada para minimizar a pressão de coleta dos estoques naturais, que vem atendendo à crescente demanda do mercado

mundial da aquariofilia. O cultivo desses organismos, em especial os ornamentais, é uma solução sustentável e vantajosa, uma vez que utiliza pequenas áreas e resulta em um produto de altíssimo valor comercial (KODAMA *et al.*, 2011). Tendo como foco principal a conservação da biodiversidade marinha, a aquicultura ornamental preza pelo desenvolvimento de tecnologias ambientalmente corretas (ZUANON *et al.*, 2011; LEAL *et al.*, 2016). Com a expansão deste mercado, é crescente a demanda pelo desenvolvimento de pacotes tecnológicos que atendam às necessidades das espécies com potencial para cultivo (OLIVOTTO *et al.*, 2017).

Apesar disso, um dos principais gargalos na produção em grande escala é o conhecimento acerca das exigências nutricionais das espécies com potencial ornamental (NRC, 2011; VARGAS-ABÚNDEZ *et al.*, 2019).

### 1.1.2 O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*

Os peixes-palhaço pertencem à Família Pomacentridae, subfamília Amphiprioninae, são animais de pequeno porte, com dimensões entre 5 a 16 cm de comprimento, que apresentam características sexuais hermafroditas protândricas. Também são conhecidos pela sua estreita relação de simbiose com as anêmonas do mar, sendo denominados “Anemonefishes” (peixes de anêmonas) (FAUTIN & ALLEN, 1992). Existem cerca de 29 espécies de peixes-palhaços, sendo 28 pertencentes ao gênero *Amphiprion* (THORNIHIL, 2012). O *Amphiprion ocellaris* é o peixe ornamental com maior demanda, representando mais de 15% do valor total de exportação mundial (WABNITZ *et al.*, 2003; KODAMA *et al.*, 2011; RHYNE *et al.* 2012).

As exigências nutricionais em relação aos aminoácidos essenciais e perfil de ácidos graxos ainda não foi descrita na literatura para a espécie. No entanto, a exigência em lipídios e proteína bruta para peixes-palhaço juvenil *A. ocellaris* foi estimada em 100 e 430 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente (DÍAZ *et al.*, 2019). O estudo de Khoo *et al.* (2018) revelou, após a análise do conteúdo estomacal de *A. ocellaris* em ambiente natural, a preferência pelos seguintes itens alimentares: larvas de craca, larvas de tunicados, copépodes, e diversos crustáceos em suas fases iniciais, o que indica uma tendência ao hábito alimentar carnívoro.

As dietas utilizadas para a produção de peixes marinhos ornamentais são dispendiosas e pouco sustentáveis, uma vez que o principal ingrediente utilizado ainda é a farinha de peixe, surgindo a demanda e necessidade de estudos referentes à substituição parcial ou completa de ingredientes proteicos ecologicamente corretos que colabore para a diminuição dos custos de produção.

### 1.1.3 Substituição de ingredientes proteicos em dietas para aquicultura

A farinha de peixe é o principal ingrediente utilizado na formulação de rações para a aquicultura (GATLIN, 2010). Devido à estagnação da produção pesqueira, constante aumento da captura de peixes selvagens (FAO, 2018; FAO, 2020) e a expansão da aquicultura, esse produto tem se tornado cada vez mais caro e não sustentável tendo em vista sua reduzida disponibilidade (SANCHÉZ- MUROS *et al.*, 2015; ZARANTONIELLO *et al.* 2019). Dessa forma, existe a necessidade da busca por ingredientes mais rentáveis e sustentáveis para o setor aquícola (HENRY *et al.*, 2015; GASCO *et al.*, 2018).

Os principais candidatos a substitutos da farinha de peixe são *commodities*, como sementes de oleaginosas (principalmente soja) (ESPE *et al.*, 2006; GATLIN *et al.*, 2007; FRACALOSI e CYRINO, 2013) e subprodutos de origem animal (farinha de carne e farinha de carne e ossos) (TIBALDI *et al.*, 2015; GASCO *et al.*, 2018). Entretanto, esses ingredientes não possuem os requisitos necessários para a substituição completa da farinha de peixe no processo de formulação das dietas de peixes marinhos e dulcícolas (TIBALDI *et al.*, 2015; GASCO *et al.*, 2016). Especialmente para peixes carnívoros e onívoros exigentes, as proteínas vegetais apresentam níveis insuficientes de aminoácidos, baixa digestibilidade e antinutrientes (CHONG *et al.*, 2003; OGUNJI, 2004; GAI *et al.*, 2012; COLLINS, 2014), podendo causar problemas como inflamação do trato digestório e deficiência nos parâmetros zootécnicos dos animais (MERRIFIELD *et al.*, 2011). Em relação à inclusão de subprodutos de origem animal, estes nem sempre atendem aos requisitos ecológicos, nutricionais e econômicos esperados (TULLI *et al.*, 2012; TIBALDI *et al.*, 2015).

Ingredientes alternativos devem garantir padrões de saúde e bem-estar aos peixes, fornecendo estimulantes alimentares adequados (XUE e CUI, 2001), aminoácidos e níveis aceitáveis de ácidos graxos essenciais (PUFAs) (BARROSO *et al.*, 2017), alta biodisponibilidade de nutrientes e energia (GASCO *et al.*, 2018), além da redução de fatores antinutricionais (GAI *et al.*, 2012).

Os insetos compõem parte da dieta natural dos peixes de água doce e marinhos (HOWE *et al.*, 2014). Tendo em vista o fácil manejo e o pequeno espaço utilizado durante seu cultivo, eles causam um impacto ambiental mínimo quando comparado a produção de outros ingredientes (VAN HUIS, 2016; VARGAS-ABÚNDEZ *et al.*, 2019). Devido a suas características particulares, como o alto teor proteico, excelente perfil de ácidos graxos poliinsaturados e riqueza em vitaminas e minerais, insetos surgem como possíveis substitutos da farinha de peixe (PANINI *et al.*, 2017).

#### 1.1.4 Uso dos insetos como ingrediente alternativo em dietas

Os insetos pertencem à classe Insecta, filo Arthropoda, que conta com mais de um milhão de espécies (ERWIN, 2004), e também fazem parte da cadeia alimentar de vários animais, denominados insetívoros (FINKE e OONINCX, 2014; FINKE, 2015). De acordo com Van Huis (2016), existem cerca de 2000 espécies de insetos comestíveis no mundo, sendo que 30% pertencem ao grupo dos besouros, seguido pelo dos lepidópteros (19 %), vespas, abelhas e formigas (15 %), grilos e gafanhotos (13 %), cupins, libélulas, moscas (12 %) e outros. No Brasil, cerca de 135 espécies de insetos são comestíveis e pertencem às ordens Coleoptera (besouros), Diptera (moscas), Heteroptera (percevejos), Auchenorrhynca (cigarras, cigarrinhas), Himenóptera (vespas, abelhas, formigas), Isoptera (cupins), Lepidoptera (borboletas e mariposas), Ortóptera (gafanhotos e grilos), Sternorrhyncha (cochonilhas, pulgões) entre outras (COSTA NETO, 2013).

Esses animais podem ser altamente nutritivos, uma vez que são uma grande fonte de proteínas, lipídeos, minerais, vitaminas e energia, variando de acordo com a dieta empregada no seu crescimento, espécie e do estágio em desenvolvimento (larva, pupa, ninfa e/ou adulto) (BARROSO *et al.*, 2014). Outro fator importante sobre os insetos é a capacidade de apresentar elevados índices de conversão alimentar (SHELOMI, 2015).

O cultivo de insetos é uma atividade sustentável (OONINCX e DE BOER, 2012; VAN HUIS, 2013), uma vez que a produção requer menos uso de espaço, terra e água, emitindo menos gases e amônia quando comparado a outros cultivos, como por exemplo a bovinocultura de corte (OONINCX *et al.*, 2010). Além disso, os insetos podem ser alimentados com resíduos orgânicos, contribuindo para o reaproveitamento desses materiais (VELDKAMP *et al.*, 2012). No mundo, algumas espécies como *Hermetia illucens* (mosca soldado-negro), *Musca domestica* (mosca doméstica comum), *Tenebrio molitor* (besouro), *Bombyx mori* (bicho-da-seda), além de diversas espécies de gafanhotos e baratas (FAO, 2013) já são utilizadas como ingredientes em dietas para peixes (HENRY *et al.*, 2015; NOGALES MÉRIDA *et al.*, 2017).

Vargas-Abúndez *et al.* (2019), a fim de verificar as respostas biológicas em jovens de peixe-palhaço *A. ocellaris* alimentados com fonte proteica alternativa, formularam dietas com a mosca soldado-negro até 75% de inclusão, substituindo a farinha de peixe. Os resultados desse trabalho foram satisfatórios, uma vez que não foram detectados efeitos deletérios no crescimento, na resposta ao estresse e na sobrevivência dos animais. Sealey *et al.* (2011) avaliaram o desempenho zootécnico e realizaram análise sensorial em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) para verificar os efeitos da substituição da farinha de peixe na dieta com farinha de

prepupa de *H. illucens* criado em esterco de gado enriquecido com vísceras. A substituição de até 50 % da farinha de peixe pela pré-pupa do inseto, não afetou significativamente o desempenho dos peixes, nem a qualidade sensorial da carne.

No entanto, a produção de insetos em grande escala ainda enfrenta alguns desafios como bases sólidas para a sua regulamentação e o alto valor dos seus produtos. O aumento da produção de insetos, a mecanização, a automação, o processamento e a logística para reduzir os custos a um nível comparado a outras fontes de alimentos são chaves para tornar esse ingrediente cada vez mais viável em dietas para organismos aquáticos (FAO, 2013). Tendo em vista a abundância de espécies que podem ser cultivadas, o aumento da produção desses animais não apresenta grandes riscos em relação a escassez. Na Europa, o uso da farinha de insetos na dieta de organismos aquáticos já é praticado desde 2013 (VAN HUIS, 2016). Em novembro de 2020, foi regulamentado o uso de insetos para consumo humano e animal na União Europeia nos termos do Regulamento (EU) 2015/2283 (EFSA, 2021). O Brasil ainda é carente de uma legislação específica sobre o uso desses animais para consumo, sendo que a única legislação sobre o assunto dispõe sobre os níveis de tolerância de insetos nos alimentos (BRASIL, 2014).

### 1.1.5 A barata cinérea *Nauphoeta cinerea*

*Nauphoeta cinerea* (Oliver, 1789), é um inseto pertencente à ordem Blattodea, conhecido vulgarmente como barata cinérea. É um animal de fácil manutenção e reprodução, apresentando elevada quantidade de proteínas ( $\pm 60\%$ ) de alto valor biológico, rápido ciclo de desenvolvimento, conversão alimentar eficiente, além de não requerer espaços amplos para grandes produções (FINKE, 2015).

Essas características fazem sua produção viável, podendo tornar-se um possível constituinte para a fabricação de rações e para alimentação humana, competindo com outras fontes de proteínas tradicionalmente usadas, como a farinha de peixe e outras farinhas de origem animal. Entretanto, o uso de farinha de insetos na alimentação animal enfrenta alguns questionamentos, como a presença de quitina no exoesqueleto do animal (KROECKEL *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2018).

Fontes *et al.* (2019) verificaram que a dieta a base de farinha da barata cinérea possuía percentual de quitina maior em comparação com os tratamentos onde utilizou-se as farinhas de grilo *Gromphadorhina portentosa* e *Gryllus assimilis* na fase adulta, *Zophobas morio* e *Tenebrio molitor* na fase larval, ocasionando redução no coeficiente de digestibilidade aparente.

Contudo, Lindsay (1983) comprova que a inclusão da quitina pode ser benéfica para algumas espécies de peixes, devido à atividade quitinolítica de enzimas como a quitinase no estômago e a quitobiase no intestino, presentes no trato digestório de muitas espécies de peixes que se alimentam de camarões, caranguejos, lagostins e insetos (LINDSAY e GOODAY 1985; GUTOWSKA *et al.* 2004). Por exemplo, a inclusão de até 2 g kg<sup>-1</sup> de quitina na dieta melhorou o desempenho do crescimento do robalo-europeu *Dicentrarchus labrax*, aumentou a sua eficiência alimentar, assim como o comprimento das vilosidades e microvilosidades do intestino (ZAKI *et al.*, 2015).

Tendo em vista a necessidade de testar outros tipos de insetos na formulação de dietas para peixes marinhos, visando selecionar aqueles que melhor atendem as necessidades dos indivíduos, a utilização da farinha de barata cinérea como ingrediente alternativo contribuirá para o desenvolvimento de dietas mais eficientes para peixes ornamentais marinhos, tendo em vista o seu potencial sustentável.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inclusão em níveis crescentes (0, 25, 50 e 75%) da farinha de barata cinérea *N. cinerea*, em substituição à farinha de peixe, na dieta de peixe-palhaço juvenil *A. ocellaris*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros zootécnicos (sobrevivência, ganho de peso, fator de condição, comprimento, taxa de crescimento específico em peso, coeficiente de variação da altura e do peso e conversão alimentar) em juvenis do peixe-palhaço *A. ocellaris* alimentados com diferentes níveis de inclusão da farinha de *N. cinerea*.
- Verificar a atividade de enzimas digestivas (tripsina e amilase) em juvenis do peixe-palhaço *A. ocellaris* alimentados com diferentes níveis de inclusão da farinha de *N. cinerea*.
- Verificar os efeitos das dietas ofertadas na morfologia intestinal e no fígado de jovens de *A. ocellaris*.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### FARINHA DE BARATA CINÉREA *Nauphoeta cinerea* EM DIETAS PARA O PEIXE-PALHAÇO *Amphiprion ocellaris*: DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, MORFOLOGIA INTESTINAL E DO FÍGADO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS

#### RESUMO

Com a expansão da aquicultura e a redução da disponibilidade da farinha de peixe para a formulação de rações, esse produto tem se tornado cada vez mais caro e insustentável. Assim, a busca por ingredientes mais rentáveis e sustentáveis para a indústria aquícola vem crescendo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da substituição parcial, em níveis crescentes de inclusão (0, 25, 50 e 75%), da proteína da farinha de peixe pela proteína da farinha de barata cinérea *Nauphoeta cinerea*, na dieta de juvenis (3,03±0,36cm; 0,63±0,19g), do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*. Os parâmetros de desempenho zootécnico (sobrevivência, ganho de peso, taxa de crescimento específico em peso, crescimento diário em comprimento, consumo de ração, taxa de conversão alimentar e fator de condição) foram avaliados após 45 dias de experimento. Análise de enzimas digestivas (tripsina e amilase) e histologia do intestino e fígado dos peixes também foram realizadas. A substituição da farinha de peixe por farinha de *N. cinerea* não mostrou efeitos deletérios no crescimento de juvenis de *A. ocellaris*, mostrando que este é um ingrediente promissor para a espécie. Entretanto, houve uma tendência na diminuição do ganho de peso com o aumento da percentagem de inclusão da farinha de barata cinérea nas dietas, e uma pior conversão alimentar (2,13) para os peixes alimentados com o maior nível de inclusão (T75), apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos (P>0,05). Já o consumo de ração (CR) foi claramente menor em T75 comparado aos demais níveis de inclusão da farinha de barata cinérea (P<0,05). O menor consumo de ração, juntamente com uma pior conversão alimentar e ganho de peso no tratamento com a substituição de 75% de farinha de peixe pela de barata cinérea podem estar relacionados à presença da quitina em níveis mais elevados neste tratamento. Após 45 dias de experimento, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na atividade específica das enzimas digestivas nos diferentes tratamentos. A histologia não revelou sinais de lesões no trato intestinal de nenhum dos tratamentos, no entanto foi verificado uma redução significativa no comprimento das vilosidades intestinais em amostras do T75 em relação ao T0. O acúmulo de lipídios nos hepatócitos foi proporcional ao aumento dos níveis de inclusão da farinha de *N. cinerea* nas dietas experimentais e o IHS indicou que o acúmulo de glicogênio foi menor nos tratamentos com a inclusão da farinha de barata cinérea. A partir do acima exposto, recomenda-se, nas condições do presente estudo, a substituição de até 50% da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea nas dietas para juvenis de peixes palhaços.

Palavras-chave: Nutrição de peixes; Aquicultura ornamental; Ração de insetos

## ABSTRACT

With the expansion of aquaculture and the reduction in the availability of fishmeal for feed formulation, this product has become increasingly expensive and unsustainable. Thus, the search for more profitable and sustainable ingredients for the aquaculture industry has been growing. The objective of this work was to evaluate the effect of partial replacement, at increasing levels of inclusion (0, 25, 50 and 75%), of fish meal protein by the cinerea cockroach meal protein *Nauphoeta cinerea*, in the diet of juveniles ( $3.03 \pm 0.36$ cm;  $0.63 \pm 0.19$ g) of the clownfish *Amphiprion ocellaris*. The zootechnical performance parameters (survival, weight gain, specific growth rate in weight, daily growth in length, feed intake, feed conversion rate and condition factor) were evaluated after 45 days of the experiment. Analysis of digestive enzymes (trypsin and amylase) and histology of fish intestine and liver were also performed. The replacement of fish meal by *N. cinerea* meal did not show deleterious effects on the growth of *A. ocellaris* juveniles, showing that this is a promising ingredient for the species. However, there was a trend towards a decrease in weight gain with an increase in the percentage of inclusion of cinerea cockroach meal in the diets, and a worse feed conversion (2.13) for fish fed with the highest level of inclusion (T75), although there were no significant differences between treatments ( $P > 0.05$ ). The feed intake (CR) was clearly lower at T75 compared to other levels of inclusion of cinerea cockroach meal ( $P < 0.05$ ). The lower feed intake, together with a worse feed conversion and weight gain in the treatment with the substitution of 75% of fish meal for the cinerea cockroach meal may be related to the presence of chitin at higher levels in this treatment. After 45 days of experiment, the results showed that there were no significant differences in the specific activity of digestive enzymes in the different treatments. Histology did not reveal signs of lesions in the intestinal tract of any of the treatments, however there was a significant reduction in the length of the intestinal villi in samples from T75 compared to T0. The accumulation of lipids in hepatocytes was proportional to the increase in the levels of inclusion of *N. cinerea* meal in the experimental diets and the IHS indicated that the accumulation of glycogen was lower in treatments with the inclusion of cinerea cockroach meal. Based on the above, it is recommended, under the conditions of the present study, the replacement of up to 50% of fish meal by cinerea cockroach meal in diets for juvenile clown fish.

Keywords: Fish nutrition; Ornamental aquaculture; Insect feed

## 2.1 INTRODUÇÃO

A aquicultura ornamental preza pelo desenvolvimento de tecnologias ambientalmente corretas (ZUANON *et al.*, 2011; LEAL *et al.*, 2016) e tem como foco principal a conservação da biodiversidade marinha ornamental (OLIVOTTO *et al.*, 2017; VARGAS-ABÚNDEZ *et al.*, 2018). Devido à expansão da aquariofilia, é crescente a demanda pelo desenvolvimento de pacotes tecnológicos que atendam às necessidades das espécies com potencial para criação intensiva (OLIVOTTO *et al.*, 2017). O conhecimento acerca das exigências nutricionais das

espécies com potencial ornamental é um dos principais entraves na produção em grande escala desses animais (VARGAS-ABÚNDEZ *et al.*, 2019).

Devido à pressão pela produção de alimentos, as pesquisas em aquicultura ornamental são escassas, quando comparadas às desenvolvidas na aquicultura de corte (VARGAS-ABÚNDEZ *et al.*, 2019; ZARANTONIELO *et al.* 2019). Esse desequilíbrio reflete no custo final das dietas comerciais disponíveis para peixes ornamentais, inviabilizando os cultivos em grande escala (CALADO *et al.*, 2017). Dessa forma, é evidente a necessidade de fomentar pesquisas relacionadas à nutrição das espécies ornamentais, visando reduzir a falta de informações sobre a formulação de dietas (CALADO *et al.*, 2017; ZARANTONIELO *et al.*, 2019), bem como minimizar custos produtivos.

A farinha de peixe é o principal ingrediente proteico utilizado na formulação de rações para a aquicultura, principalmente em espécies carnívoras (GATLIN, 2010). Devido à estagnação da produção pesqueira, constante aumento na captura de peixes selvagens (FAO, 2020) e a expansão da aquicultura, esse produto tem se tornado cada vez mais caro e insustentável, tendo em vista sua reduzida disponibilidade (HENRY *et al.*, 2015). Dessa forma, existe a necessidade de se buscar ingredientes mais rentáveis e sustentáveis para o setor aquícola (HENRY *et al.*, 2015; GASCO *et al.*, 2018).

Os insetos compõem parte da dieta natural dos peixes de água doce e marinhos (HOWE *et al.*, 2014). Levando em conta o fácil manejo e o pequeno espaço utilizado durante seu cultivo, eles causam um impacto ambiental mínimo quando comparado a outros ingredientes (VAN HUIS, 2016; VARGAS-ABÚNDEZ *et al.*, 2019). Devido a suas características particulares surgem como possíveis substitutos da farinha de peixe (HENRY *et al.*, 2015). Insetos são bastante nutritivos e possuem alto teor de proteínas, lipídios, minerais, vitaminas e energia (VAN HUIS, 2013; VAN HUIS, *et al.* 2013; HENRY *et al.*, 2015; RONCARATI *et al.*, 2015; BARROSO *et al.*, 2017), além de uma composição de aminoácidos semelhante à da farinha de peixe (VAN HUIS, 2016; DEVIC *et al.*, 2017; IACONISI *et al.*, 2017; NOGALES-MÉRIDA *et al.*, 2017; BELGHIT *et al.*, 2018).

O conteúdo nutricional dos insetos pode variar dependendo da espécie, fase de desenvolvimento (larva, pupa, ninfa e/ou adulto) e da alimentação utilizada na sua criação (BARROSO *et al.*, 2014; NOGALES-MÉRIDA *et al.*, 2017). Um dos insetos que apresenta grande potencial para inclusão em dietas de organismos aquáticos é a barata cinérea *Nauphoeta cinérea* (FINKE, 2015). Devido ao seu alto valor proteico (> 60%), algumas empresas nacionais já a produzem em escala comercial.

O uso da farinha de insetos como substituto à farinha de peixe em dietas para espécies marinhas ornamentais ainda é pouco compreendido (VARGAS-ABÚNDEZ et al., 2019). O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*, é um peixe ornamental muito popular, bastante produzido e comercializado em todo o mundo (KODAMA et al., 2011; RHYNE et al. 2012). Esta espécie possui um protocolo de manutenção de reprodutores para a obtenção de desova e larvicultura bem desenvolvido (WITTENRICH, 2007). Esse fator o torna ideal para a aquariofilia, além de ser um excelente modelo experimental para estudos relacionados à nutrição de peixes ornamentais marinhos (AVELLA et al., 2009; OLIVOTTO et al., 2010, 2011; MARCIONETTI et al., 2018).

Sua exigência nutricional em relação aos aminoácidos essenciais e perfil de ácidos graxos não é descrita na literatura. No entanto, a exigência em lipídios e proteína bruta para juvenis de peixes-palhaço *A. ocellaris* foi estimada em 100 e 430 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente (DÍAZ et al. 2019). O estudo de Khoo et al. (2018) revelou após a análise do conteúdo estomacal de *A. ocellaris* selvagem, a preferência pelos seguintes itens alimentares: larvas de craca, larvas de tunicados, copépodes, e crustáceos diversos em suas fases iniciais, o que indica uma tendência ao hábito alimentar carnívoro para essa espécie.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão em níveis crescentes (0, 25, 50 e 75%) da farinha de barata cinérea *N. cinérea*, em substituição à farinha de peixe, na dieta de jovens de peixe-palhaço *A. ocellaris*. O estudo pretende contribuir com conhecimentos acerca da produção de peixe-palhaço, utilizando um ingrediente alternativo, altamente sustentável e ecologicamente correto.

## 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° 8038220221.

### 2.2.1 Origem dos animais e manutenção experimental

Os exemplares foram obtidos através da reprodução de casais do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* pertencentes ao plantel de reprodutores do Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM).

## 2.2.2 Delineamento experimental

Um total de 156 peixes com idade de 90 Dias Após a Eclosão (DAE) foram utilizados, apresentando comprimento inicial de  $3,03 \pm 0,36$  cm (média  $\pm$  desvio padrão) e peso inicial de  $0,63 \pm 0,19$  gramas. O experimento foi elaborado com um grupo controle (0%), com dieta base com farinha de peixe, e três tratamentos com níveis crescentes de inclusão da farinha de barata cinérea *Nauphoeta cinerea*, 25%, 50% e 75%, em substituição à farinha de peixe (Tabela 1). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. O experimento teve duração de 45 dias.

Os indivíduos foram mantidos em aquários com volume útil de 18 L, conectados a um sistema de recirculação de água. A densidade de estocagem utilizada foi de  $0,72$  peixe  $L^{-1}$ . O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, três vezes ao dia (9 h, 13 h e 17 h). Após uma hora da primeira e da última alimentação, os aquários eram sifonados.

Tabela 1: Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas para alimentar o peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* contendo diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha de adultos da barata cinérea *Nauphoeta cinerea*.

Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> )	Níveis de substituição (%)			
	0	25	50	75
Farinha de Peixe <sup>1</sup>	400,00	300,00	200,00	100,00
Farinha de <i>N. cinerea</i> <sup>2</sup>	0	100,00	200,00	300,00
CPS <sup>3</sup>	250,00	270,00	280,00	290,00
Milho <sup>4</sup>	140,00	130,00	170,00	100,00
Farinha de Trigo <sup>5</sup>	150,00	160,00	140,00	200,00
Óleo de Peixe <sup>6</sup>	50,00	30,00	0	0
Premix <sup>7</sup>	10,00	10,00	10,00	10,00
BHT <sup>8</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00
<b>Composição Aproximada (g kg<sup>-1</sup>)</b>				
Matéria Seca	948,10	893,10	883,40	883,40
Energia Bruta (cal/g)	4313,24	4428,17	4440,30	4442,62
Proteína Bruta	444,00	446,80	445,00	441,40
Gordura Bruta	110,00	111,20	107,00	118,20
Cinzas	109,8	89,80	71,70	55,60

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021. <sup>1</sup>Farinha de resíduo de Atum – Empresa (Penha, SC, Brasil), <sup>2</sup>Insetos Brasil LTDA (Recife, PE, Brasil), <sup>3</sup>Opta Nutrição Animal (Florianópolis, SC, Brasil), <sup>4,5</sup>Nordeste Com. de Alimentos LTDA (Antônio Prado, RS, Brasil), <sup>6</sup>CRODA health care (Brasil), <sup>7</sup>InVivo mix (Paulínia, SP, Brasil), <sup>8</sup>Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A temperatura da água nas unidades experimentais foi mantida em  $27,27 \pm 0,54$ °C com auxílio de aquecedores acoplados a termostatos (Modelo MT 511Ri Full Gauge precisão de  $0,01$  °C) e a salinidade medida com um refratômetro óptico (INSTRUTHERM, precisão de  $0,1$

g L<sup>-1</sup>). O pH, a amônia não ionizada, nitrito, e o oxigênio dissolvido foram aferidos diariamente com testes colorimétricos (LabconTest). O fotoperíodo foi mantido em 12h luz:12h escuro.

### 2.2.3 Formulação e preparo das dietas experimentais

A formulação e elaboração das dietas experimentais (Tabela 1), assim como a análise dos ingredientes farinha de peixe e farinha de barata cinérea (Tabela 2) foram realizadas em parceria com o Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), Departamento de Aquicultura, UFSC.

Tabela 2: Composição aproximada dos ingredientes proteicos.

Ingredientes	Composição Aproximada				
	Matéria Seca (%)	Proteína Bruta (%)	Gordura (%)	Energia (cal/g)	Cinzas (%)
Farinha de Peixe	92,75	65,08	10,66	4389,03	20,17
Farinha de <i>N. cinerea</i>	95,62	56,45	33,39	6408,32	2,57

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Adultos de *N. cinerea*, adquiridos da empresa Insetos Brasil LTDA (Recife, PE, Brasil), foram moídos em um moedor de grãos de café e peneirados para obtenção de partículas de 600 µm. O produto obtido foi armazenado em sacos de polietileno a – 20°C para posterior utilização.

A formulação das dietas foi feita através do software Optimal Fórmula 2000, com base nas recomendações e exigências nutricionais do peixe-palhaço *A. ocellaris* e de espécies com hábito alimentar semelhante (*Salmo salar* fase juvenil). Os ingredientes de cada dieta foram misturados em um misturador (modelo BP-20C G, Paniz, Caxias do Sul, RS, Brasil). Em uma extrusora (modelo MX-40, Imbramaq, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a “massa” foi extrusada a uma temperatura de 100 °C, pressão de 4 atm, velocidade de produção de 800 g min<sup>-1</sup>. Para granulação, foi utilizada uma peneira de 1 mm. Após a granulação, as dietas foram secas em uma estufa com fluxo de ar forçado (Modelo MA-035/3, Marconi Equipment Laboratory Ltda, Piracicaba, SP, Brasil), 55 °C, até atingir um teor de umidade em torno de 10 % e acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas a – 20 ± 2 °C até a utilização.

### 2.2.4 Análise biométrica

Durante o experimento foram realizadas 2 biometrias, onde todos os peixes das unidades experimentais foram medidos e pesados (dia 0 e dia 45 do experimento). Os indivíduos foram pesados (peso úmido) com uma balança analítica (0,01 mg) e medidos em seu comprimento total com o auxílio de paquímetro manual (0,01 mm). Para a biometria, os peixes permaneceram em jejum por 16 horas e foram anestesiados através de imersão em água com 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  de eugenol (PEDRAZZANI; OSTRENSKY NETO, 2016). Após a biometria, os peixes foram transferidos para recipientes com água limpa e aerada, onde permaneceram até a total recuperação, sendo então devolvidos aos aquários de origem. A partir dos dados biométricos foram calculados:

- (1) Sobrevivência (S%) =  $100 \times [(população\ inicial) - (número\ de\ indivíduos\ mortos) / (população\ inicial)]$ .
- (2) Ganho de Peso: GP = peso final (g) - peso inicial (g)
- (3) Taxa de Crescimento Específico em peso (TCE, % dia<sup>-1</sup>):  $TCE = 100 \times [\ln^* (\text{peso final}) - \ln (\text{peso inicial}) / \text{tempo de experimento}]$ . \*ln= logaritmo natural
- (4) Crescimento diário em comprimento (mm dia<sup>-1</sup>):  $(\text{comprimento final} - \text{comprimento inicial}) / \text{período experimental em dias}$ .
- (5) Consumo de ração (CR) = total do alimento consumido (mg) / período experimental (dias).
- (6) Taxa de conversão alimentar = ração ofertada (g) / ganho de peso (g).
- (7) Coeficiente de Variação do peso =  $100 \times (\text{desvio padrão peso} / \text{média do peso})$ .
- (8) Fator de Condição (FC):  $FC = 100 \times (\text{Peso (g)} / \text{Comprimento}^3 \text{ (cm)})$ .
- (9) Índice hepatossomático:  $IHS = (\text{Peso do fígado} / \text{Peso do Peixe}) \times 100$

### 2.2.5 Análise histológica

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Ictiologia/Cordados da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Para a análise foram utilizados 2 peixes por unidade experimental, selecionados ao final do experimento. Os peixes foram eutanasiados com eugenol (1ml/L<sup>-1</sup>). Fragmentos do intestino e do fígado foram fixados em formalina tamponada 10% por 48 h e posteriormente transferidos para álcool 70% até o processamento histológico.

As amostras foram desidratadas serialmente com banhos em álcool etílico (80%, 95%, 100%). Posteriormente houve a diafanização, em xilol parafina. Cada banho durou 30 minutos tendo em vista o pequeno tamanho das amostras. Após esse tempo, as amostras foram

emblocadas em parafina, descansaram por 24 h e os blocos foram cortados com o auxílio de um micrótomo manual na espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Em seguida, os cortes foram colocados em banho maria, coletados com lâmina e corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). Posteriormente à coloração, as lâminas foram montadas em meio Entellan® e analisadas em microscópio binocular LEICA DM500 com capacidade fluorescente (Leica Microsystems®).

A avaliação histomorfométrica do intestino foi conduzida através de cortes de 5  $\mu\text{m}$  seriados, obtidos em intervalos de 200  $\mu\text{m}$ , e corados com HE. As imagens do intestino obtidas de cada corte foram analisadas através do programa Image J. Da primeira seção histológica de cada amostra onde o intestino estava bem representado, foi escolhida três vilosidades intestinais de forma aleatória, e as medidas dos comprimentos das vilosidades ( $\mu\text{m}$ ) (medida entre a base da vilosidade e o ápice da vilosidade) foram realizadas (Figura 1). Os resultados de cada tratamento foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Figura 1 - Microfotografia do intestino de *Amphiprion ocellaris* juvenil. Letra A indica medida do comprimento da vilosidade. Coloração HE. 50 $\mu\text{m}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

### 2.2.6 Análise enzimática

As análises enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Insetos (LBI/BQA) da UFSC. Após o fim do experimento foram coletados nove intestinos de juvenis de peixe-palhaço (idade 135 DAE) por tratamento (3 por unidade experimental). Todos os animais foram anestesiados e eutanasiados com 1 mL L<sup>-1</sup> de eugenol e imediatamente congelados para posterior análise.

Para obtenção do extrato enzimático, o intestino de cada animal foi colocado individualmente em tubos de Eppendorf com 1 mL de água Mili-Q e homogeneizados em homogeneizador Potter-Ekvehjem. Durante o processo, o material foi mantido sob refrigeração em banho de gelo, posteriormente centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para microtubos.

Na determinação da quantidade proteína foi utilizado o método de Bradford (1976). A atividade de tripsina foi determinada de acordo com Erlanger *et al.* (1961) utilizando o substrato nbenzoil-dl-argininil p-nitroanilida (bz-R-pNA). O substrato foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2 mM e diluídos 1:1 (v/v) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5 (concentração final 1 mM).

Para análise da atividade enzimática da tripsina foram misturados 50 µL de extrato enzimático e 50 µL de substrato tampão (1:1, v/v) em microplacas de 96 poços (fundo chato). As leituras de absorbância (410 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., California, USA) a cada 15 minutos de incubação a 30 °C por 1 h. A unidade de atividade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 µmol de substrato-min, determinadas a partir da curva padrão de p-nitroanilina. No controle negativo, o extrato enzimático foi substituído por água bidestilada.

A atividade amilásica foi determinada usando um reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico preparado de acordo com Noelting e Bernfeld (1948). As amostras (25 µL) foram incubadas com 25 µL de solução de substrato tamponado (1% solúvel em amido com tampão de acetato 100 mM, pH 5,5, contendo 4 mM CaCl<sub>2</sub> e NaCl 40 mM). Os ensaios foram encerrados com adição de 200 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico. A solução resultante foi aquecida em um banho de água fervente por 5 min, resfriado, e após a adição de 200 µL de água destilada, a absorbância foi lida a 550 nm em um TECAN leitor de microplacas. Todos os ensaios foram realizados a 30 °C.

As incubações foram realizadas em pelo menos quatro diferentes períodos e as taxas iniciais de hidrólise foram calculadas. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de equivalente de maltose por minuto. Uma curva padrão com maltose foi usada como referência para medições de atividade. As atividades de amilase foram expressas como atividades específicas (mU / mg de proteína).

### 2.2.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para avaliação da normalidade e homoscedasticidade, respectivamente. Quando considerados paramétricos, os dados foram submetidos a análise de variância unifatorial (ANOVA one way) para determinar a existência de diferença ( $P < 0,05$ ). Apresentando diferença significativa, os dados foram submetidos ao teste de Tukey. Os dados foram tratados ao nível de significância de 5% utilizando o software STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Quando considerados não-paramétricos, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Parâmetros físico-químicos da água

A temperatura da água na bateria experimental foi de  $27,27 \pm 0,54^\circ\text{C}$  e a salinidade  $32,33 \pm 0,64$ . A amônia não ionizada ficou em  $0,011 \pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$ , o nitrito em  $0,28 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ , e o oxigênio dissolvido em  $4,44 \pm 0,66 \text{ ppm}$ . O pH da água se manteve em  $8,23 \pm 0,08$ .

### 2.3.2 Desempenho zootécnico

Os resultados das variáveis de desempenho zootécnico estão apresentados na Tabela 3. A maior taxa de sobrevivência foi observada no nível 25% (87,18%), seguido do 0% (82,05%), 50% (82,05%) e 75% (79,49%).

Os resultados das variáveis: comprimento final, fator de condição, coeficiente de variação em peso, taxa de crescimento diário em comprimento não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Numericamente, o ganho de peso diminuiu com o aumento da farinha de barata cinérea nas dietas, apesar de não apresentar diferença estatística ( $p > 0,05$ ). O índice hepatossomático apresentou redução significativa nos tratamentos com inclusão da farinha de barata cinérea quando comparados ao grupo controle.

Da mesma forma, apesar de não apresentar diferença significativa, a conversão alimentar foi pior para os peixes alimentados com a maior taxa de inclusão da barata cinérea (75%). O consumo de ração (CR), foi claramente menor em 75% em relação aos demais níveis de inclusão da farinha de inseto ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3: Parâmetros de desempenho de juvenis de *Amphiprion ocellaris* alimentados com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Parâmetros	Níveis de substituição (%)				p
	0	25	50	75	
Peso inicial (g)	0,610 $\pm$ 0,046	0,610 $\pm$ 0,017	0,647 $\pm$ 0,050	0,640 $\pm$ 0,085	0,78
Peso final (g)	1,060 $\pm$ 0,060	1,067 $\pm$ 0,068	1,090 $\pm$ 0,056	1,007 $\pm$ 0,180	0,80
Ganho de peso (mg)	450,00 $\pm$ 62,45	456,67 $\pm$ 80,83	443,33 $\pm$ 83,86	366,67 $\pm$ 95,04	0,52
Comprimento inicial (cm)	2,963 $\pm$ 0,132	3,000 $\pm$ 0,078	3,092 $\pm$ 0,363	3,050 $\pm$ 0,144	0,56
Comprimento final (cm)	3,847 $\pm$ 0,186	3,917 $\pm$ 0,090	3,950 $\pm$ 0,106	3,907 $\pm$ 0,153	0,83
K	1,878 $\pm$ 0,279	1,774 $\pm$ 0,044	1,769 $\pm$ 0,056	1,675 $\pm$ 0,115	0,50
TCE (% dia)	1,23 $\pm$ 0,18	1,24 $\pm$ 0,19	1,16 $\pm$ 0,23	1,00 $\pm$ 0,11	0,38
CDC	0,20 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,00	0,82
CR (mg/dia) *	270,21 $\pm$ 7,79 <sup>a</sup>	254,54 $\pm$ 2,95 <sup>b</sup>	263,03 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	248,35 $\pm$ 1,47 <sup>c</sup>	0,01
CA	1,83 $\pm$ 0,27	1,71 $\pm$ 0,32	1,82 $\pm$ 0,31	2,13 $\pm$ 0,58	0,61
CVp (%)	36,36 $\pm$ 4,92	36,53 $\pm$ 3,44	29,16 $\pm$ 4,42	36,38 $\pm$ 2,50	0,12
IHS	2,276 $\pm$ 0,518 <sup>a</sup>	1,698 $\pm$ 0,298 <sup>b</sup>	1,899 $\pm$ 0,368 <sup>b</sup>	1,631 $\pm$ 0,310 <sup>b</sup>	0,01

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021. Consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico em peso (TCE), crescimento diário em comprimento (CDC), fator de condição (K), coeficiente de variação em peso (CVp), Índice hepatossomático (IHS). \*Letras diferentes na mesma linha representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

### 2.3.3 Atividade enzimática

Os resultados da atividade enzimática específica da amilase e da tripsina estão apresentados na Tabela 4.

A atividade amilásica não apresentou diferença significativa ( $p = 0,55$ ) entre os tratamentos. Entretanto, numericamente, a atividade em 50% foi a menor. Em relação a enzima tripsina, numericamente houve maior atividade no nível 50%, mas sem diferença à nível estatístico entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4 - Atividade enzimática específica de amilase e tripsina (U mg de proteína<sup>-1</sup>) nos juvenis de *Amphiprion ocellaris* alimentados com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

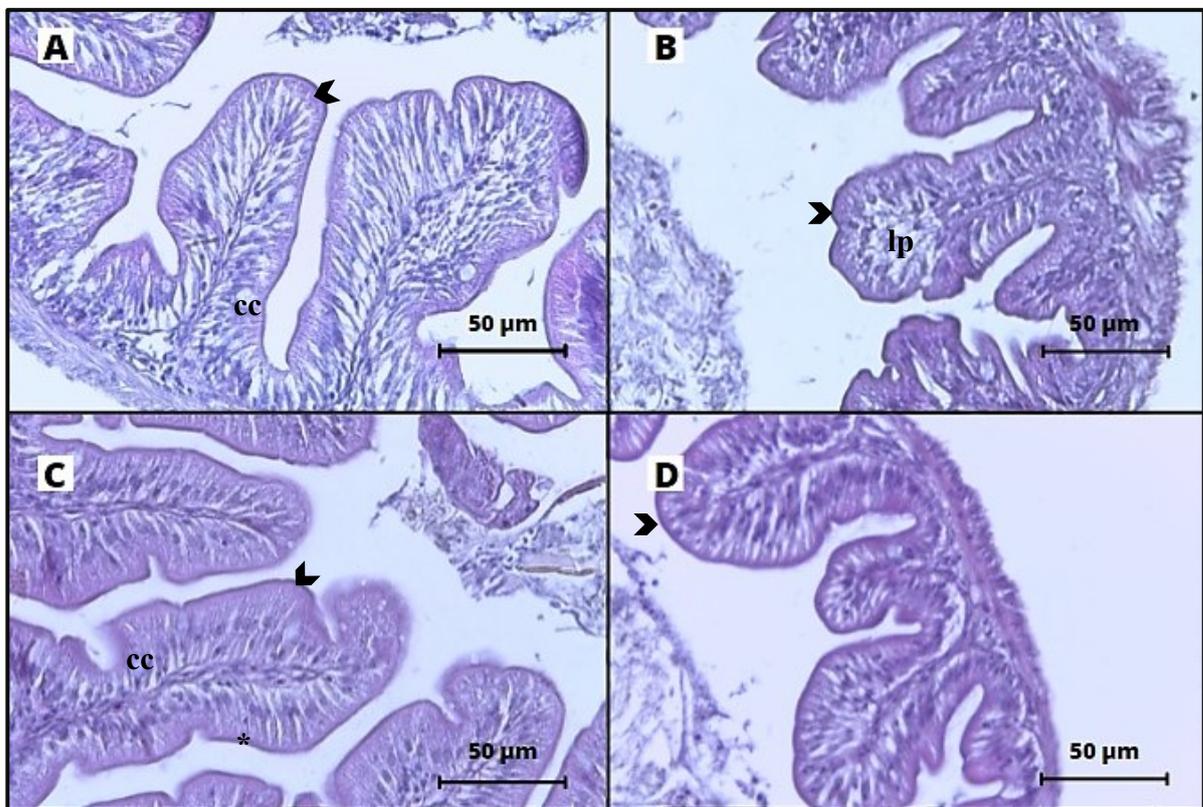
Enzimas	Níveis de substituição (%)			
	0	25	50	75
Amilase	135,54 $\pm$ 63,86	159,07 $\pm$ 72,79	94,57 $\pm$ 60,62	178,86 $\pm$ 170,88
Tripsina	35,53 $\pm$ 16,47	42,24 $\pm$ 16,12	81,42 $\pm$ 51,10	61,87 $\pm$ 52,40

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

### 2.3.4 Análise histológica

A mucosa do intestino delgado, apresentou-se constituída por vilosidades formadas pelo epitélio simples colunar com enterócitos, com presença de células caliciformes na porção média e posterior, e lâmina própria. Alguns linfócitos intraepiteliais foram visíveis, mas não foi observada a presença de infiltrado inflamatório na mucosa intestinal dos peixes de nenhum dos tratamentos (Figura 1).

Figura 2 - Microfotografia do intestino de *Amphiprion ocellaris* juvenil alimentado com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. (0%- A) e 25%, 50%, 75% (B, C e D respectivamente). A cabeça de seta indica o enterócito, cc - célula caliciforme, lp - lâmina própria, asterisco - linfócito intraepitelial. Coloração HE.

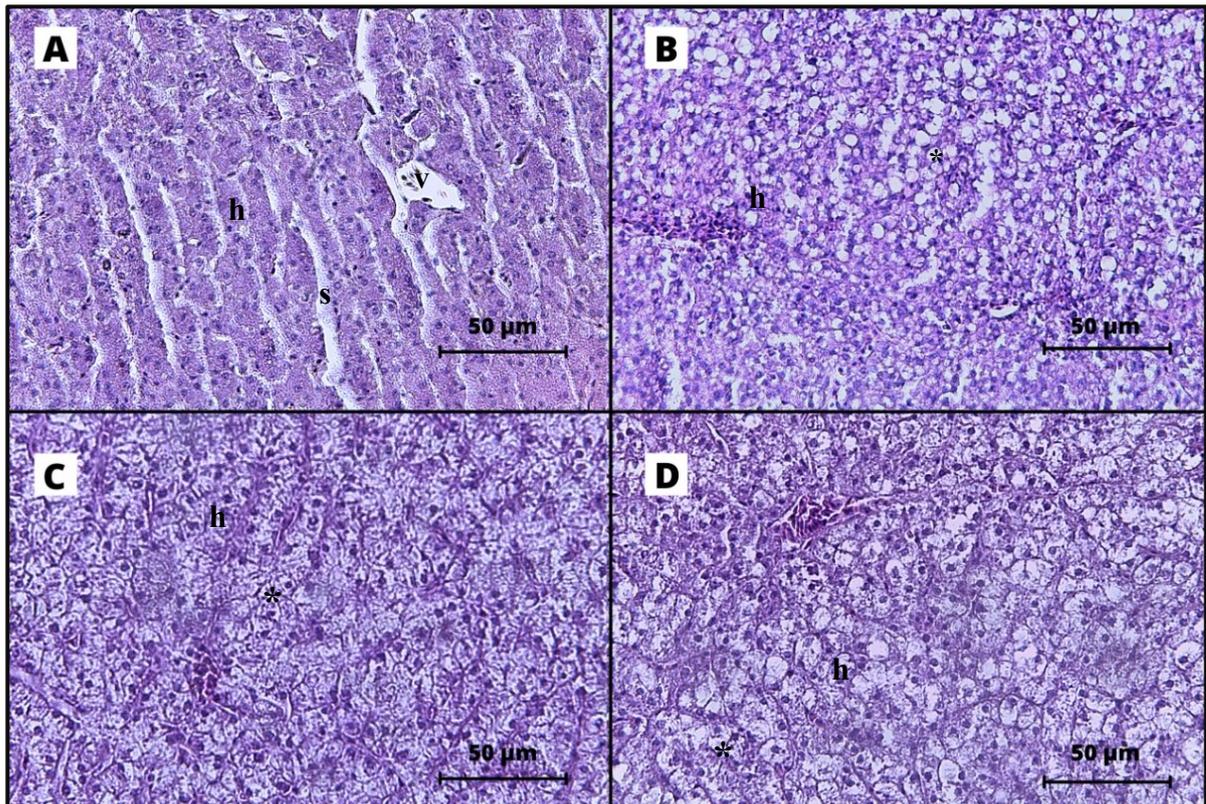


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

A análise morfométrica do intestino de *A. ocellaris* alimentados com níveis crescentes de inclusão da farinha de barata cinérea revelou que em amostras do tratamento 75%, houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do comprimento ( $125,57 \pm 22,86 \mu\text{m}$ ), quando comparado com o grupo controle ( $222,44 \pm 56,53 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Nos demais tratamentos, não foram detectadas diferenças significativas para este parâmetro (25%:  $159,26 \pm 48,96 \mu\text{m}$ ; 50%:  $219,04 \pm 67,25 \mu\text{m}$ ).

Na porção do fígado, observa-se cordões de hepatócitos ao lado de vasos sanguíneos do tipo sinusóides (Figura 2A). A comparação histológica do fígado dos jovens de *A. ocellaris* mostra que houve um aumento no acúmulo de lipídio no citoplasma dos hepatócitos dos indivíduos nos tratamentos 25%, 50% e 75%, em relação ao grupo controle (Figura 2).

Figura 3 - Microfotografia do fígado de *Amphiprion ocellaris* juvenil alimentado com dietas em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea. (0%- A) e 25%, 50%, 75% (B, C e D respectivamente). Onde: h – hepatócito, v - veia, s - capilar sinusóide, asterisco – lipídio. Coloração: HE.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

## 2.4 DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro dos padrões para o cultivo de peixes-palhaços do gênero *Amphiprion* (MOORHEAD, 2010; OLIVOTTO *et al.*, 2011).

Em relação a sobrevivência, não houve diferença entre as taxas de sobrevivência nos diferentes tratamentos, sendo superiores a 79,5%. As mortalidades observadas ocorreram somente a partir do 19º dia de experimento, sendo atribuídas ao comportamento agressivo por parte dos peixes de maior tamanho em relação aos menores (BUSTON, 2003).

No presente estudo, as dietas experimentais com a inclusão da farinha de barata cinérea, de forma geral, não mostraram efeitos deletérios no crescimento de juvenis de *A.*

*ocellaris* uma vez que não foram observadas diferenças significativas no comprimento final, no fator de condição, no coeficiente de variação em peso, na taxa de crescimento diário em comprimento entre os tratamentos controle e os tratamentos com diferentes níveis de inclusão da farinha de barata cinérea após 45 dias de cultivo. Entretanto, houve uma tendência na diminuição do ganho de peso com o aumento da percentagem de inclusão da farinha de barata cinérea nas dietas, e uma pior conversão alimentar (2,13) para os peixes alimentados com a maior taxa de inclusão da barata cinérea (75%), apesar de não serem detectadas diferenças significativas. Já o consumo de ração (CR) foi claramente menor no nível 75% em relação aos demais níveis de inclusão da farinha de barata cinérea.

Trabalhos com diferentes espécies de peixes como o salmão-do-Atlântico *Salmo salar* (LOCK *et al.*, 2016), robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (MAGALHÃES *et al.*, 2017), truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (RENNA *et al.*, 2017), bagre amarelo *Pelteobagrus fulvidraco* (XIAO *et al.*, 2018), zebrafish *Danio rerio* (VARGAS *et al.*, 2018; ZARANTONIELO *et al.*, 2019) e peixe-palhaço *A. ocellaris* (VARGAS-ABÚNDEZ *et al.*, 2019) não apontaram efeito nos parâmetros de crescimento com a inclusão parcial (<60%) da farinha de diferentes tipos de insetos na dieta.

Por outro lado, efeitos positivos, bem como os deletérios, têm sido observados com o uso de insetos na alimentação de peixes. O estudo de Sankian *et al.* (2018) indicou que a inclusão de até 20% da farinha de tenebrio melhorou o desempenho de juvenis de mandarin *Siniperca scherzeri* em comparação com os peixes alimentados com a dieta controle. Em bagres africanos *Clarias gariepinus* foi observado que com uma substituição de 25% da farinha de peixe pela farinha de gafanhoto *Zonocerus variegatus*, houve melhora no crescimento deste peixe. Por outro lado, quando a inclusão deste gafanhoto foi acima de 50%, o crescimento do bagre africano foi influenciado negativamente (ALEGBELEYE *et al.*, 2012). A substituição de 25% e 50% da farinha de peixe pela farinha de larva de *T. molitor* não resultou em efeitos adversos no ganho de peso em *S. aurata*, mas os peixes alimentados com dieta no nível 50% de substituição, mostraram uma redução no crescimento e menor taxa de conversão alimentar em comparação com a dieta controle (PICOLLO *et al.*, 2017). No turbot *Psetta maxima* e na dourada *Sparus aurata*, a inclusão de altos níveis (> 50%) de farinha de insetos nas dietas, ocasionou um menor crescimento dos indivíduos (KROECKEL *et al.*, 2012; GASCO *et al.*, 2016; PICCOLO *et al.*, 2017).

Baseado no acima exposto, a resposta da performance zootécnica com a inclusão de farinha de insetos na dieta de peixes parece ser variável, sendo esta muitas vezes relacionada à percentagem de inclusão deste ingrediente alternativo. De forma geral, a inclusão em níveis

mais elevados (acima de 50%) da farinha de inseto parece afetar negativamente o desempenho dos peixes cultivados, estando de acordo com o observado no presente estudo.

Uma das principais divergências relacionadas à inclusão da farinha de insetos em rações para aquicultura é a presença da quitina nesses animais (ALEGBELEYE *et al.*, 2012; FINKE, 2015; NOGALÉS-MERIDA *et al.*, 2017; VAN HUIS, 2016). Os efeitos da quitina ainda não são totalmente compreendidos e os resultados são controversos. Autores relataram que altas concentrações de quitina nas dietas pode induzir a uma redução geral da digestibilidade e a uma pior conversão alimentar (FINKE, 2007; HENRY *et al.*, 2015; RENNA *et al.*, 2017; VAN HUIS *et al.*, 2013). Em estudo realizado com juvenis da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*, Fontes *et al.* (2019) verificaram que a dieta a base de farinha da barata cinérea possuía percentual de quitina maior em comparação com os tratamentos onde utilizou-se farinhas de grilo *Gromphadorhina portentosa* e *Gryllus assimilis* na fase adulta, *Zophobas morio* e *T. molitor* na fase larval, ocasionando uma redução no coeficiente de digestibilidade aparente.

No presente estudo, o menor consumo de ração, juntamente com uma pior conversão alimentar e ganho de peso no tratamento com a substituição de 75% de farinha de peixe pela de barata cinérea podem estar relacionados à presença da quitina em níveis mais elevados neste tratamento. Foi verificado que a quitina diminuiu o consumo de ração e o crescimento em carpas *Cyprinus carpio*, tilápias *O. niloticus*; *Oreochromis aureus* e bacalhau *Gadus morhua* em níveis de inclusão superiores a 1% (GOPALAKANNAN e ARUL, 2006; SHIAU e YU, 1999; HANSEN *et al.*, 2007). Entretanto, nenhum efeito negativo foi observado em tilápias *Oreochromis mossambicus* tratadas com 60% de farinha da larva de mariposa *Imbrasia belina* ou em enguia japonesa *Anguilla japonica*, dourada *Pagrus major* e no olhete japonês *Seriola quinqueradiata* alimentados com dieta suplementada com 10% de quitina (RAPATSA e MOYO, 2017; KONO *et al.*, 1987).

A atividade quitinolítica pode variar entre as espécies de peixes, e até mesmo entre as fases de vida de uma mesma espécie (BARROSO *et al.*, 2014). No turbot *P. maxima*, não foi verificado atividade quitinolítica nos primeiros estágios da vida (KROECKEL *et al.*, 2012), enquanto a cobia *Rachycentron canadum*, apresentou atividade muito alta (FINES e HOLT, 2010). No bacalhau *G. morhua*, a enzima quitinase foi encontrada no estômago e intestino (DANULAT e KAUSH, 1984). Essas diferenças são pouco compreendidas e estão principalmente relacionadas à presença ou ausência de estruturas capazes de quebrar o exoesqueleto das presas. Olsen *et al.* (2006) descobriram que baixos níveis de quitina nas dietas podem ter função prebiótica, aumentando o crescimento e a atividade de bactérias benéficas no

trato gastrointestinal, melhorando a saúde do hospedeiro e promovendo a função digestiva (SUZER *et al.*, 2008; MUNIR *et al.*, 2016). Portanto, o efeito negativo ou positivo da quitina, presente nos insetos, pode variar dependendo da espécie de inseto, da quantidade de inclusão de farinha de inseto nas dietas para peixes, bem como ser intrínseco da espécie e do estágio de desenvolvimento dos peixes.

As enzimas digestivas, especialmente as proteases, amilases e lipases, desempenham um papel fundamental no processo digestivo dos peixes, pois a atividade destas pode demonstrar o impacto causado pela utilização da ração no desempenho do crescimento dos animais (HJELMELAND *et al.*, 1984; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN *et al.*, 2006). O presente estudo verificou que a atividade da amilase no intestino de juvenis de *A. ocellaris* não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.

Trabalhos com o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (CAO *et al.*, 2012, PANINI *et al.*, 2017), carpa comum *Cyprinus carpio* (LI *et al.*, 2017) e salmão-do-Atlântico (BELGHIT *et al.*, 2018) também não mostraram diferenças significativas na atividade de enzimas digestivas quando houve substituição total ou parcial da farinha de peixe por farinhas de insetos. Em ensaio com *O. mossambicus*, Rapatsa e Moyo (2017) mostraram o aumento proporcional da atividade de enzimas digestivas quando 10 a 60% da farinha de peixe foi substituída pela farinha da larva de mariposa *Imbrasia belina*. Da mesma forma, Li *et al.* (2019) verificaram aumento proporcional da atividade enzimática em rã-touro *Lithobates catesbeianus* de acordo com o aumento da inclusão da farinha de *M. domestica* nas dietas.

De acordo com Bruni *et al.* (2018), a quitina presente na mosca soldado-negra *H. illucens* induziu a inflamação intestinal observada em *Oncorhynchus mykiss* causando redução no bem-estar e crescimento dos indivíduos (STAMER *et al.*, 2008). No presente trabalho, não foram observados sinais de lesão no intestino dos animais, corroborando o achado de Zarantoniolo *et al.* (2018) e Vargas *et al.* (2017) para zebrafish *D. rerio* e de Vargas-abúndez *et al.* (2019) para *A. ocellaris*, que relacionaram a ausência de inflamações no intestino devido à alta suplementação de ácidos graxos de cadeia média nas dietas a base de insetos. Efeitos negativos relacionados à inflamação intestinal e baixa digestibilidade também foram relatados para as espécies: *P. maxima*, *D. labrax* e *P. fulvidraco*, quando houve inclusão superior a 50% da farinha de insetos (KROECKEL *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2018).

A análise morfométrica das vilosidades intestinais de *A. ocellaris* alimentados com farinha de barata cinérea revelou uma redução significativa do comprimento das vilosidades em amostras do tratamento 75%, somente em comparação com o grupo controle. Este fato pode

estar relacionado com a diminuição da atividade da tripsina no nível 75%, uma vez que essa protease indica um índice útil e expressivo do estado nutricional e da capacidade de crescimento assim como a qualidade da dieta, sugerindo que a diminuição na atividade da tripsina indica que o alimento possui baixa qualidade ou não foi digerido pelo animal (HJELMELAND et al., 1984). Em estudo com a mesma espécie foi verificado uma redução nas vilosidades intestinais dos peixes alimentados com níveis 50% e 75% de inclusão da farinha de larva da mosca soldado-negra *H. illucens* (VARGAS-ABÚNDEZ et al., 2019).

A análise histológica do fígado de juvenis de *A. ocellaris* no presente estudo mostrou que houve um aumento no acúmulo de lipídio nos hepatócitos nos níveis 25%, 50 % e 75%, em relação ao grupo controle. O índice hepatossomático (IHS) é uma forma de quantificar o estoque de energia (glicogênio) no fígado (CYRINO et al., 2000). O IHS calculado no presente trabalho, apresentou redução significativa nos tratamentos com inclusão da farinha de barata cinerea quando comparados ao grupo controle, com dieta a base de farinha de peixe. Este resultado indica um maior gasto de energia para os tratamentos com inclusão da farinha de barata cinérea.

O fígado desempenha um papel fundamental no metabolismo de lipídios dos peixes, uma vez que a sua estrutura morfológica, composição macromolecular e expressão gênica são influenciadas pela dieta (VARGAS-ABÚNDEZ et al., 2019). Vários estudos sugerem que a inclusão da farinha de insetos, por conta do alto teor de quitina, interfere na absorção de lipídios e algumas vitaminas, o que pode levar a um baixo desempenho dos peixes, uma vez que esses nutrientes são fontes essenciais de energia (KOIDE, 1998; SHIAU e YU, 1999; HALVER e HARDY, 2002; OLSEN et al., 2006; XIA et al., 2010; ALEGBELEYE et al., 2012).

Em outras espécies de peixes, o acúmulo de lipídios foi semelhante entre os diferentes níveis de inclusão de farinha de inseto, e a composição de ácidos graxos dos animais refletiu a composição de ácidos graxos das dietas (GASCO et al., 2016; BORGOGNO et al., 2017; DEVIC et al., 2017; RENNA et al., 2017; VARGAS et al., 2018; ZARANTONIELLO et al., 2018; ZHOU et al., 2018). As disparidades no acúmulo de lipídios no fígado entre as espécies estão diretamente ligadas ao tamanho e fase de vida, e a duração dos experimentos (TURCHINI et al., 2009).

Tendo em vista o exposto, novos estudos são necessários, a fim de compreender melhor as respostas fisiológicas de *A. ocellaris* tratados com farinha de *N. cinerea* em diferentes níveis de inclusão por um período maior e em diferentes fases do ciclo de vida.

## 2.5 CONCLUSÃO

A substituição parcial da farinha de peixe por farinha de *Nauphoeta cinerea* não mostrou efeitos deletérios no crescimento de juvenis de *A. ocellaris*, mostrando que este é um ingrediente promissor para a espécie. Entretanto, houve uma tendência na diminuição do ganho de peso com o aumento da percentagem de inclusão da farinha de barata cinérea nas dietas, e uma pior conversão alimentar (2,13) para os peixes alimentados com a maior taxa de inclusão da barata cinérea (T75), apesar de não serem detectadas diferenças significativas. Já o consumo de ração (CR) foi claramente menor em T75 em relação aos demais níveis de inclusão da farinha de barata cinérea. O menor consumo de ração, juntamente com uma pior conversão alimentar e ganho de peso no tratamento com a substituição de 75% de farinha de peixe pela de barata cinérea podem estar relacionados à presença da quitina em níveis mais elevados neste tratamento.

Após 45 dias de experimento, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na atividade específica das enzimas digestivas nos diferentes tratamentos.

A histologia não revelou sinais de lesões no trato intestinal de nenhum dos tratamentos, no entanto foi verificado uma redução significativa no comprimento das vilosidades intestinais em amostras do tratamento T75 em relação ao T0. O acúmulo de lipídios nos hepatócitos foi proporcional ao aumento dos níveis de inclusão da farinha de *N. cinérea* nas dietas experimentais e o IHS indicou que o acúmulo de glicogênio foi menor nos tratamentos com a inclusão da farinha de barata cinérea.

A partir do acima exposto, recomenda-se, nas condições do presente estudo, a substituição de até 50% da farinha de peixe pela farinha de barata cinérea nas dietas para juvenis de peixes palhaços.

## REFERÊNCIAS

ALEGBELEYE, W.O.; OBASA, S.O.; OLUDE, O.O.; OTUBU, K.; JIMOH, W. Preliminary evaluation of the nutritive value of the variegated grasshopper (*Zonocerus variegates*) for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. **Aquaculture Research**, v.43, p.412–420. 2012.

AVELLA, M.A., OLIVOTTO, I., SILVI, S., PLACE, A.R., CARNEVALI, O. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.298, p.359–371. 2009.

- BARROSO, F.G.; DE HARO, C.; SÁNCHEZ-MUROS, M.J.; VENEGAS, E.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; PÉREZ-BAÑÓN, C. The potential of various insect species for use as food for fish. **Aquaculture**, 422–423:193–201. 2014.
- BARROSO, F.G.; SÁNCHEZ-MUROS, M.J.; SEGURA, M.; MOROTE, E.; TORRES, A.; RAMOS, R.; GUIL, J.L. Insects as food: enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.62, p.8–13. 2017.
- BELGHIT, I.; LILAND, N.S.; WAAGBO, R.; BIANCAROSA, I.; PELUSIO, N.; LI, Y.; KROGDAHL, A.; LOCK, E.J. Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.491, p.72–81. 2018.
- BORGOGNO, M.; DINNELLA, C.; IACONISI, V.; FUSI, R.; SCARPALEGGIA, C.; SCHIAVONE, A.; PARISI, G. Inclusion of *Hermetia illucens* larvae meal on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed: effect on sensory profile according to static and dynamic evaluations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(10), 3402-3411. 2017
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254. 1976.
- BRUNI, L.; PASTORELLI, R.; VITI, C.; GASCO, L.; PARISI, G. Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. **Aquaculture** 487, 56–63. 2018.
- BUSTON, P. M. Social hierarchies: size and growth modification in clownfish. **Nature**, Londres, v. 424, n. 6945, p. 145, 2003.
- CALADO, R., OLIVOTTO, I., PLANAS, M., HOLT, G.J. **Marine Ornamental Species Aquaculture**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2017.
- CAO, J.M.; YAN, J.; WANG, G.X.; HUANG, Y.H.; ZHANG, R.B.; ZHOU, T.L.; LIU, Q.F.; SUN, Z.W. Effects of replacement of fish meal with housefly maggot meal on digestive enzymes, transaminases activities and hepatopancreas histological structure of *Litopenaeus vannamei*. **South China Fish. Sci.** 8(5), 72-79. 2012.
- CHONG, A., HASHIM, R., ALI, A.B. Assessment of soybean meal in diets for discus (*Symphysodon aequifasciata*) farming through a fishmeal replacement study. **Aquaculture Research**, v.34, p.913–922. 2003.
- CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; MARTINO, R. C. Retenção de proteína e energia em juvenis de "black bass" *Micropterus salmoides*. **Scientia Agricola**, 57(4), 609-616. 2000.
- DANULAT, E.; KAUSCH, H. Chitinase activity in the digestive tract of the cod *Gadus morhua* (L.). **J Fish Biol.** v24. 1984.
- DEVIC, E.; LESCHEN, W.; MURRAY, F.; LITTLE, D. C. Growth performance, feed utilization and body composition of advanced nursing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed

- diets containing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. **Aquaculture nutrition**, 24(1), 416-423. 2018.
- DÍAZ-JIMÉNEZ, L., HERNÁNDEZ-VERGARA, M. P., PÉREZ-ROSTRO, C. I. Protein/lipid ratio for the growth of juvenile clownfish, *Amphiprion ocellaris*. **Journal of the World Aquaculture Society**. 2019.
- DUMAS, A.; RAGGI, T.; BARKHOUSE, J.; LEWIS, E.; WELTZIEN, E. The oil fraction and partially defatted meal of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) affect differently growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, blood glucose and lipid digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 492, 24–34. 2018.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, E. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271- 278. 1961.
- FAO. **The state of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome. 2020.
- FINES, B.C.; HOLT, G.J. Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**. 303:34–39. 2010.
- FINKE, M.D. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. **Zoo Biology**, v.34, p.554–564. 2015.
- Finke, M.D. Estimate of chitin in raw whole insects. **Zoo Biology**. 26, 105–115. 2007.
- GAI, F.; GASCO, A.; DAPRÀ, F.; PALMEGIANO, G.B.; SICURO, B. Enzymatic and histological evaluations of gut and liver in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed with rice protein concentrate-based diets. **J. World Aquac. Soc.** 43, 218–229. 2012.
- GASCO, L., FINKE, M., VAN HUIS, A. Can diets containing insects promote animal health? **Journal Insects Food Feed**, v.4, p.1–4. 2018.
- GASCO, L., GAI, F., MARICCHIOLO, G., GENOVESE, L., RAGONESE, S., BOTTARI, T., CARUSO, G. Fishmeal alternative protein sources for aquaculture feeds: current situation and alternative sources. In: **Feeds for the Aquaculture Sector**, Springer International Publishing, Cham, p.1–28. 2018.
- GASCO, L.; HENRY, M.; PICCOLO, G.; MARONO, S.; GAI, F.; RENNA, M.; LUSSIANA, C.; ANTONOPOULOU, E.; MOLA, P.; CHATZIFOTIS, S. *Tenebrio molitor* meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility. **Anim. Feed Sci. Technol.** 220, 34–45. 2016.
- GATLIN, D. M. **Principles of fish nutrition**. Southern Regional Aquaculture Center. p. 1-8. 2010.

- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**. 255: 179–187. 2006.
- HALVER, J.E.; HARDY, R.W. **Fish Nutrition**. Academic Press, San Diego: CA, 2002.
- HANSEN, A.C.; ROSENLUND, G.; KARLSEN, Ø.; KOPPE, W.; HEMRE, G.I. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects on growth and protein retention. **Aquaculture**. 272: 599–611. 2007.
- HENRY, M.; GASCO, L.; PICCOLO, G.; FOUNTOULAKI, E. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 203 p.1–22. 2015.
- HENRY, M. A. et al. Does dietary insect meal affect the fish immune system? The case of mealworm, *Tenebrio molitor* on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 81, p. 204-209, 2018.
- HJELMELAND, K. HUSE, I.; JØRGENSEN, T.; MOLVIK, G.; RAA, J. Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua*) larvae. In: THE PROPAGATION of cod *Gadus morhua*: an international symposium. Arendal: **Institute of Marine Research**. p 14-17. 1984.
- HOWE, E.R.; SIMENSTAD, C.A.; TOFT, J.D.; CORDELL, J.R.; BOLLENS, S.M. Macroinvertebrate prey availability and fish diet selectivity in relation to environmental variables in natural and restoring north San Francisco bay tidal marsh channels. **San Francisco Estuary Watershed Science**, v.12, p. 1–46. 2014.
- IACONISI, V.; MARONO, S.; PARISI, G.; GASCO, L.; GENOVESE, L.; MARICCHIOLO, G.; BOVERA, F.; PICCOLO, G. Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* larvae meal: effects on growth performance and final quality traits of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). **Aquaculture**, v.476, p.49–58. 2017.
- KARLSEN, Ø.; AMLUND, H.; BERG, A.; OLSEN, R.E. The effect of dietary chitin on growth and nutrient digestibility in farmed Atlantic cod, Atlantic salmon and Atlantic halibut. **Aquac. Res.** 48(1), 1-11. 2017.
- KHOO, M. L.; DAS, S. K.; ABD GHAFAR, M. Growth pattern, diet and reproductive biology of the clownfish *Amphiprion ocellaris* in waters of Pulau Tioman, Malaysia. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 3, p. 233-239, 2018.
- KODAMA, G.; ANNUNCIACAO, W. F.; SANCHES, E. G.; GOMES, C. H. D. A. M.; TSUZUKI, M. Y. Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 61-72, 2011.
- KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition research**, v. 18, n. 6, p. 1091-1101, 1998.
- KONO, M.; MATSUI, T.; SHIMIZU, C. Effect of chitin, chitosan, and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. **Nippon Suisan Gakkaish**. 53:125–129. 1987.

KROECKEL, S.; HARJES, A.G.E.; ROTH, I.; KATZ, H.; WUERTZ, S.; SUSENBETH, A.; SCHULZ, C. When a turbot catches a fly: evaluation of a pre-pupae meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture** v.364, p.345–352. 2012.

LEAL, M. C.; VAZ, M. C. M.; PUGA, J.; ROCHA, R. J. M.; BROWN, C.; ROSA, R.; CALADO, R. Marine ornamental fish imports in the European Union: an economic perspective. **Fish and Fisheries**. v. 17, p. 459– 468, 2016.

LI, S. L.; JI, H.; ZHANG, B.X.; ZHOU, J. S.; YU, H.B. Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological structure. **Aquaculture**. 477, 62-70. 2017.

LI, X.; RAHIMNEJAD, S.; WANG, L.; LU, K.; SONG, K.; ZHANG, C. Substituting fish meal with housefly (*Musca domestica*) maggot meal in diets for bullfrog Rana (*Lithobates*) catesbeiana: Effects on growth, digestive enzymes activity, antioxidant capacity and gut health. **Aquaculture**. 499, 295-305. 2019.

LOCK, E.J.; ARSIWALLA, T.; WAAGBØ, R. Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolt. **Aquaculture Nutrition**. 22:1202– 1213. 2016.

MAGALHÃES, R., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A., LEAL, R.S., MARTÍNEZ-LLORENS, S., OLIVA-TELES, A., PERES, H. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture** v.476, p.79–85. 2017.

MARCIONETTI, A., ROSSIER, V., BERTRAND, J.A.M., LITSIOS, G., SALAMIN, N. First draft genome assembly of an iconic clownfish species (*Amphiprion frenatus*). **Molecular Ecology Resource**. 2018.

MOORHEAD, J. A., ZENG, C. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. **Reviews in fisheries science**. v. 18, p. 315-345. 2010.

MUNIR, M. B.; HASHIM, R.; CHAI, Y. H.; MARSH, T. L.; & NOR, S. A. M. Dietary prebiotics and probiotics influence growth performance, nutrient digestibility and the expression of immune regulatory genes in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture**. 460, 59-68. 2016.

NOGALES-MÉRIDA, S.; GOBBI, P.; JÓZEFIK, D.; MAZURKIEWICZ, J.; DUDEK, K.; RAWSKI, M.; JÓZEFIK, A. Insect meals in fish nutrition. **Reviews in Aquaculture**. 2018.

OLIVOTTO, I.; TOKLE, N.E.; NOZZI, V.; COSSIGNANI, L.; CARNEVALI, O. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: a feeding study. **Aquaculture** v.308, p.124–131. 2010.

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 Physiology** v.159, p.207–218. 2011.

OLIVOTTO, I.; CHEMELLO, G.; VARGAS, A.; RANDAZZO, B.; PICCINETTI, C.C.; CARNEVALI, O. Marine ornamental species culture: From the past to “Finding Dory”. **General and Comparative Endocrinology** v.245, p.116–121. 2017.

OLSEN, R.E.; SUONTAMA, J.; LANGMYHR, E.; MUNDHEIM, H.; RING, E.; MELLE, W.; MALDE, M.K.; HEMRE, G.I. The replacement of fishmeal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquac. Nutr.** 12, 280–290. 2006.

PANINI, R. L., PINTO, S. S., NÓBREGA, R. O., VIEIRA, F. N., FRACALOSSO, D. M., SAMUELS, R. I., AMBONI, R. D. Effects of dietary replacement of fishmeal by mealworm meal on muscle quality of farmed shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Food Research International**, 102, 445-450. 2017.

PICCOLO, G.; IACONISI, V.; MARONO, S.; LOPONTE, R.; GASCO, L.; NIZZA, S.; BOVERA, F.; PARISI, G. Effect of *Tenebrio molitor* larvae meal on growth performance, in vivo nutrients digestibility, somatic and marketable indexes of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Animal Feed Science Technology**, v.226, p.12–20. 2017.

RAPATSA, M.M.; MOYO, N.A.G. Evaluation of *Imbrasia belina* meal as a fishmeal substitute in *Oreochromis mossambicus* diets: growth performance, histological analysis and enzyme activity. **Aquac Reports.**;5:18–26. 2017.

RENNA, M.; SCHIAVONE, A.; GAI, F.; DABBOU, S.; LUSSIANA, C.; MALFATTO, V.; GASCO, L. Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2017.

RHYNE, A.L., TLUSTY, M.F., SZCZEBAK, J.T.; HOLMBERG, R.J. Expanding our understanding of the trade in marine aquarium animals. **PeerJ** v.5, p.e2949. 2017.

RONCARATI, A., GASCO, L., PARISI, G., TEROVA, G. Growth performance of common catfish (*Ameiurus melas* Raf.) fingerlings fed mealworm (*Tenebrio molitor*) diet. **Journal Insects Food Feed**. v.1, p.233–240. 2015.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K.; MOSS, R.; ANDRESEN, L. H.; BERG, A.; WAAGBØ, R. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 7, 2006.

SANKIAN, Z.; KHOSRAVI, S.; KIM, Y. O.; LEE, S. M. Effects of dietary inclusion of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) meal on growth performance, feed utilization, body composition, plasma biochemical indices, selected immune parameters and antioxidant enzyme activities of mandarin fish (*Siniperca scherzeri*) juveniles. **Aquaculture**, v. 496, p. 79-87, 2018.

SHIAU, S.Y.; YU, Y.P. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* - *O. aureus*. **Aquaculture**. 179:439–446. 1999.

STAMER, A.; KATZ, P.; WESSEL, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Protein Concentrates Derived from Fly Mass-Production: *Hermetia* Meal as an Alternative to Fishmeal. **16th IFOAM Org World Congr.** pp. 16–20, Modena, Italy. 2008.

SU, J., GONG, Y., CAO, S., LU, F., HAN, D., LIU, H., JIN, J., YANG, Y., ZHU, X., XIE, S. Effects of dietary *Tenebrio molitor* meal on the growth performance, immune response and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Fish Shellfish Immunology** v.69, p.59–66. 2017.

SUZER, C.; OBAN, D.; KAMACI, H. O.; SAKA, Ş.; FIRAT, K.; OTGUCUOĞLU, Ö.; KÜÇÜKSARI, H. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 140-145, 2008.

TURCHINI, G.M.; TORSTENSEN, B.E.; NG, W.K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Rev Aquac.** 1:10–57. 2009.

VAN HUIS, A. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 563–583, 2013.

VAN HUIS, A.; VAN ITTERBEECK, J.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; MUIR, G.; VANTOMME, P. **Edible insects. Future prospects for food and feed security.** FAO Forestry Paper No. 171, 201 p, FAO, Rome, Italy, 2013.

VAN HUIS, A. Edible insects are the future? **The Proceedings of the Nutrition Society**, p. 1–12, 2016.

VARGAS, A.; RANDAZZO, B.; RIOLO, P.; TRUZZI, C.; GIOACCHINI, G.; GIORGINI, E.; OLIVOTTO, I. Rearing zebrafish on black soldier fly (*Hermetia illucens*): Biometric, histological, spectroscopic, biochemical, and molecular implications. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 404-419, 2018.

VARGAS-ABÚNDEZ, A. J., RANDAZZO, B., FODDAI, M., SANCHINI, L., TRUZZI, C., GIORGINI, E., & OLIVOTTO, I. Insect meal-based diets for clownfish: Biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. **Aquaculture**, v. 498, p. 1-11. 2019.

XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocol.** 25, 170–179. 2010.

XIAO, X., JIN, P., ZHENG, L., CAI, M., YU, Z., YU, J., ZHANG, J. Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal protein as a fishmeal replacement on the growth and immune index of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Aquaculture Research**, v.49, p.1569–1577. 2018.

WITTENRICH, M.L. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. **T.F.H Publications.** Neptune city. 301p. 2007.

ZARANTONIELLO, M.; BRUNI, L.; RANDAZZO, B.; VARGAS, A.; GIOACCHINI, G.; TRUZZI, C.; OLIVOTTO, I. Partial dietary inclusion of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) full-fat prepupae in zebrafish feed: biometric, histological, biochemical, and molecular implications. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 519-532, 2018.

ZHOU, J. S.; LIU, S. S.; JI, H.; YU, H. B. Effect of replacing dietary fish meal with black soldier fly larvae meal on growth and fatty acid composition of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture Nutrition**, 24(1), 424-433. 2018.

ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 40(1), 165-174. 2011.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AVELLA, M.A., OLIVOTTO, I., SILVI, S., PLACE, A.R., CARNEVALI, O. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.298, p.359–371. 2009.

BARROSO, F.G. et al. The potential of various insect species for use as food for fish. **Aquaculture**. v. 422–423, p. 193–201, 2014.

BARROSO, F.G.; SÁNCHEZ-MUROS, M.J.; SEGURA, M.; MOROTE, E.; TORRES, A.; RAMOS, R.; GUIL, J.L. Insects as food: enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.62, p.8–13. 2017.

BIONDO, M. V.; BURKI, R. P. A systematic review of the ornamental fish trade with emphasis on coral reef fishes: an impossible task. **Animals**. 10(11), 2014. 2020.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 14, de 28 de março de 2014.

CALADO, R.; OLIVOTTO, I.; PLANAS, M.; HOLT, G.J. **Marine Ornamental Species Aquaculture**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2017.

CHONG, A., HASHIM, R., ALI, A.B. Assessment of soybean meal in diets for discus (*Symphysodon aequifasciata*) farming through a fishmeal replacement study. **Aquaculture Research**, v.34, p.913–922. 2003.

COLLINS, S.A. **Antinutritional Factors in Modeling Plant-Based Rainbow Trout**. 2014. 215 p. Tese de Doutorado. Department of Animal and Poultry Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. 215p.

COSTA NETO, E. M. Insects as human food: an overview. **Amazônica: Revista de Antropologia**, p. 562-582. 2013.

DÍAZ-JIMÉNEZ, L., HERNÁNDEZ-VERGARA, M. P., PÉREZ-ROSTRO, C. I. Protein/lipid ratio for the growth of juvenile clownfish, *Amphiprion ocellaris*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. p. , 2019.

EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), TURCK, D.; CASTENMILLER, J.; DE HENAUW, S.; HIRSCH-ERNST, K. I.; KEARNEY, J.; KNUTSEN, H. K. Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA Journal**, 19(1), e06343. 2021.

ERWIN, T.L. The biodiversity question: how many species of terrestrial arthropods are there? In: LOWMAN, M.D., RINKER, H.B. **Forest Canopies**, v.2, p.259-269. 2004.

ESPE, M. LEMME, A. PETRI, A. EL-MOWAFI, A. Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fishmeal? **Aquaculture**, v.255, p.255–262. 2006.

EVERS, H.G.; PINNEGAR, J.K.; TAYLOR, M.I. Where are they all from? sources and sustainability in the ornamental freshwaterfish trade. *Journal of Fish Biology* 26: 909–916. 2019.

FAO - Food Agriculture Organization of the United Nations. **Edible insects: future prospects for food and feed security**. Roma, Itália, 2013. 201p.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018**: Meeting the Sustainable Development Goals; Rome, Italy, 2018.

FAO. **The state of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome. 2020.

FAUTIN, D.; ALLEN, G.R. Anemonefishes and their host sea anemones. Western Australian Museum, Perth, 160 p. 1992.

FINKE, M.D. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biology*, v.34, p.554–564. 2015.

FONTES, T. V.; DE OLIVEIRA, K. R. B.; GOMES ALMEIDA, I. L.; MARIA ORLANDO, T.; RODRIGUES, P. B.; COSTA, D. V. D. Digestibility of insect meals for Nile tilapia fingerlings. *Animals*, v.9, n. 4, p.181. 2019.

FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. (Ed.). **Nutriaqua**: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1ª ed. ampliada. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. 375p. 2013

GAI, F.; GASCO, A.; DAPRÀ, F.; PALMEGIANO, G.B.; SICURO, B., Enzymatic and histological evaluations of gut and liver in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed with rice protein concentrate-based diets. *Journal World Aquaculture Society*, v.43, p.218–229. 2012.

GASCO, L.; HENRY, M.; PICCOLO, G.; MARONO, S.; GAI, F.; RENNA, M. *Tenebrio molitor* meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, v.222, p.34–45. 2016.

GASCO, L.; FINKE, M.; VAN HUIS, A. Can diets containing insects promote animal health? *Journal Insects Food Feed*, v.4, p.1–4. 2018.

GASCO, L.; GAI, F.; MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L.; RAGONESE, S.; BOTTARI, T.; CARUSO, G. Fishmeal alternative protein sources for aquaculture feeds: current situation and alternative sources. In: **Feeds for the Aquaculture Sector**, Springer International Publishing, Cham, p.1–28. 2018.

GASPARINI, J.L.; FLOETER, S.R.; FERREIRA, C.E.L.; SAZIMA I. Marine ornamental trade in Brazil. *Biodivers Conserv.* 14: 2883–2899. 2005.

GATLIN, D. M.; BARROWS, F. T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T. G.; HARDY, R. W.; WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, v. 38, p. 551-579. 2007.

GATLIN, D. M. **Principles of fish nutrition**. Southern Regional Aquaculture Center. p. 1-8. 2010.

GUTOWSKA, M.A.; DRAZEN, J.C.; ROBISON, B.H. Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v.139, p.351–358. 2004.

HENRY, M.; GASCO, L.; PICCOLO, G.; FOUNTOULAKI, E. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 203 p.1–22. 2015.

HOWE, E.R.; SIMENSTAD, C.A.; TOFT, J.D.; CORDELL, J.R.; BOLLENS, S.M. Macroinvertebrate prey availability and fish diet selectivity in relation to environmental variables in natural and restoring north San Francisco bay tidal marsh channels. **San Francisco Estuary Watershed Science**, v.12, p. 1–46. 2014.

KHOO, M. L.; DAS, S. K.; ABD GHAFAR, M. Growth pattern, diet and reproductive biology of the clownfish *Amphiprion ocellaris* in waters of Pulau Tioman, Malaysia. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 3, p. 233-239, 2018.

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

KROECKEL, S.; HARJES, A.G.E.; ROTH, I.; KATZ, H.; WUERTZ, S.; SUSENBETH, A.; SCHULZ, C. When a turbot catches a fly: evaluation of a pre-pupae meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture** v.364, p.345–352. 2012.

LEAL, M. C.; VAZ, M. C. M.; PUGA, J.; ROCHA, R. J. M.; BROWN, C.; ROSA, R.; CALADO, R. Marine ornamental fish imports in the European Union: na economic perspective. **Fish and Fisheries**. v. 17, p. 459– 468, 2016.

LINDSAY, G.J.H. **Chitinolytic enzymes and bacteria in fish and their role in nutrition**. PhD Thesis. Aberdeen University, United States. 1983.

LINDSAY, G.J.H.; GOODAY, G.W. Chitinolytic enzymes and the bacterial microflora in the digestive tract of cod, *Gadus morhua*. **Journal of Fish Biology** v.26 p.255–265. 1985.

MAGALHÃES, R.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A.; LEAL, R.S.; MARTÍNEZ-LLORENS, S.; OLIVA-TELES, A. PERES, H. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture** v.476, p.79–85. 2017.

MARCIONETTI, A.; ROSSIER, V.; BERTRAND, J.A.M.; LITSIOS, G.; SALAMIN, N. First draft genome assembly of an iconic clownfish species (*Amphiprion frenatus*). **Molecular Ecology Resource**. 2018.

MERRIFIELD, D.L., OLSEN, R.E., MYKLEBUST, R., RINGO, E., EL-SHEMY, H. Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish. In: El-Shemy, H. (Ed.), **Soybean and Nutrition**. InTech. 2011.

MONTICINI, P. The ornamental fish trade: production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects. 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, DC: National Academic Press, 2011. 376 p.

NOGALES-MÉRIDA, S.; MARTINEZ-LLORENS, S.; MONINO, A.V.; JOVER-CERDA, M.; TOMAS-VIDAL, A. Fish oil substitution by soya bean oil in sharpnose seabream *Diplodus puntazzo*: performance, fatty acid profile, and liver histology. **Journal of Applied Aquaculture** v.29 p.46–61. 2017.

NOGALES-MÉRIDA, S.; GOBBI, P.; JÓZEFIAK, D.; MAZURKIEWICZ, J.; DUDEK, K.; RAWSKI, M.; JÓZEFIAK, A. Insect meals in fish nutrition. **Reviews in Aquaculture**. 2018.

NOVÁK, J.; KALOUS, L.; PATOKA, J. Modern ornamental aquaculture in Europe: Early history of freshwater fish imports. **Reviews in Aquaculture**, 12(4), 2042-2060. 2020.

OATA (2014). OATA Annual Review 2013/2014. Westbury: Ornamental Aquatic Trade Association Available at <http://ornamentalfish.org/oata-annrep-13-14-single-web/>.

OGUNJI, J.; SUMMAN-TOOR, R.U.A.; SCHULZ, C.; KLOAS, W. Growth performance, nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed housefly maggot meal (Magmeal) diets. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** v.8, p.141–147. 2008.

OLIVOTTO, I.; TOKLE, N.E.; NOZZI, V.; COSSIGNANI, L.; CARNEVALI, O. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: a feeding study. **Aquaculture** v.308, p.124–131. 2010.

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 Physiology** v.159, p.207–218. 2011.

OLIVOTTO, I.; CHEMELLO, G.; VARGAS, A.; RANDAZZO, B.; PICCINETTI, C.C.; CARNEVALI, O. Marine ornamental species culture: From the past to “Finding Dory”. **General and Comparative Endocrinology** v.245, p.116–121. 2017.

OONINCX, D. G. A. B.; VAN ITTERBEECK, J.; HEETKAMP, M. J.; VAN DEN BRAND, H.; VAN LOON, J. J.; VAN HUIS, A. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. **PLoS One**, v. 5, p. 1–7, 2010.

OONINCX, D. G. A. B.; DE BOER, I. J. M. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans – a life cycle assessment. **PLoS One**, v. 7, p. 1-5, 2012.

PANINI, R. L., PINTO, S. S., NÓBREGA, R. O., VIEIRA, F. N., FRACALOSSO, D. M., SAMUELS, R. I., AMBONI, R. D. Effects of dietary replacement of fishmeal by mealworm meal on muscle quality of farmed shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Food Research International**, 102, 445-450. 2017.

REYNOSO, F.L.; CASTAÑEDA-CHÁVEZ, M.; ZAMORA-CASTRO, J.-E.; HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; RAMÍREZ-BARRAGÁN, M.A.; SOLÍS-MORÁN, E. La Acuariofilia de Especies Ornamentales Marinas: Un Mercado de Retos y Oportunidades. **Lat. Am. J. Aquat. Res.** 40, 12–21. 2012.

RHYNE, A. L.; TLUSTY, M. F.; SCHOFIELD, P. J.; KAUFMAN, L. E. S.; MORRIS JR, J. A.; BRUCKNER, A. W. Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The Volume and Biodiversity of Fish Imported into the United States. **PLoSOne**, v. 7, n. 5, p.e35808 2012.

RHYNE, A.L.; TLUSTY, M.F.; SZCZEBAK, J.T.; HOLMBERG, R.J. Expanding our understanding of the trade in marine aquarium animals. **PeerJ** v.5, p.e2949. 2017.

SAMPAIO, F. D.; CAROLINA, A. F.; VINÍCIUS, M. S. T.; JEAN, R. V.; LUÍS, F. F. The precautionary principle and its approach to risk analysis and quarantine related to the trade of marine ornamental fishes in Brazil. **Marine Policy**, v.51, p.163-168. 2015.

SÁNCHEZ-MUROS, M<sup>a</sup>.J.; HARO, C.; SANZ, A.; TRENZADO, C.E.; VILLARECES, S.; BARROSO, F.G. Nutritional evaluation of *Tenebrio molitor* meal as fishmeal substitute for tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet. **Aquaculture Nutrition**. 2015.

SHELOMI, M. Why we still don't eat insects: Assessing entomophagy promotion through a diffusion of innovations framework. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 311–318, 2015.

SU, J.; GONG, Y.; CAO, S.; LU, F.; HAN, D.; LIU, H.; JIN, J.; YANG, Y.; ZHU, X.; XIE, S. Effects of dietary *Tenebrio molitor* meal on the growth performance, immune response and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Fish Shellfish Immunology** v.69, p.59–66. 2017.

TIBALDI, E.; ZITTELLI, G. C.; PARISI, G.; BRUNO, M.; GIORGI, G.; TULLI, F.; POLI, B. M. Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp.(T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. **Aquaculture**, 440, 60-68. 2015.

TORNHILL, D.J. Ecological Impacts and Practices of the Coral Reef Wildlife Trade. **Defenders of Wild Life**. 2012.

TULLI, F.; CHINI ZITTELLI, G.; GIORGI, G.; POLI, B.M.; TIBALDI, E.; TREDICI, M.R. Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. **J. Aquat. Food Prod. Technol.** 21, 188–197. 2012.

VAN HUIS, A. Edible insects are the future? **The Proceedings of the Nutrition Society**, p. 1–12, 2016.

VARGAS-ABÚNDEZ, A. J.; RANDAZZO, B.; FODDAI, M.; SANCHINI, L.; TRUZZI, C.; GIORGINI, E.; OLIVOTTO, I. Insect meal-based diets for clownfish: Biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. **Aquaculture**, v. 498, p. 1-11. 2019.

XIAO, X.; JIN, P.; ZHENG, L.; CAI, M.; YU, Z.; YU, J.; ZHANG, J. Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal protein as a fishmeal replacement on the growth and immune index of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Aquaculture Research**, v.49, p.1569–1577. 2018.

XUE, M.; CUI, Y. Effect of several feeding stimulants on diet preference by juvenile gibel carp (*Carassius auratus*), fed diets with or without partial replacement of fish meal by meat and bone meal. *Aquaculture* 198, 281–292. 2001.

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

WITTENRICH, M.L. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. **T.F.H Publications**. Neptune city. 301p. 2007.

ZAKI, M.A.; SALEM, M.E.S.; GABER, M.M.; NOUR, A.M. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, feed utilization, body composition & histology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **World J Eng Technol** 3:38. 2015.

ZARANTONIELLO, M.; BRUNI, L.; RANDAZZO, B.; VARGAS, A.; GIOACCHINI, G.; TRUZZI, C.; OLIVOTTO, I. Partial dietary inclusion of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) full-fat prepupae in zebrafish feed: biometric, histological, biochemical, and molecular implications. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 519-532, 2018.

ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 40(1), 165-174. 2011.