



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

Gabriel Dutra Rodrigues

Efeito da inclusão de extratos de microalgas ricos em ácidos graxos e carotenoides em rações no desempenho zootécnico e na coloração de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*)

FLORIANÓPOLIS – SC

2022



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

Gabriel Dutra Rodrigues

Efeito da inclusão de extratos de microalgas ricos em ácidos graxos e carotenoides em rações no desempenho zootécnico e na coloração de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*)

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.^a Dr.^a Mônica Yumi Tsuzuki

Coorientador: Dr. Rafael de Oliveira Jaime Sales

FLORIANÓPOLIS – SC

2022

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

Rodrigues, Gabriel Dutra

Efeito da inclusão de extratos de microalgas ricos em ácidos graxos e carotenoides em rações no desempenho zootécnico e na coloração de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) / Gabriel Dutra Rodrigues ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki, coorientador, Rafael de Oliveira Jaime Sales, 2022.

54 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Nutrição. 3. Peixes Ornamentais Marinhos. 4. Coloração. 5. Microalgas. I. Tsuzuki, Mônica Yumi. II. Sales, Rafael de Oliveira Jaime. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Gabriel Dutra Rodrigues

Efeito da inclusão de extratos de microalgas ricos em ácidos graxos e carotenoides em rações no desempenho zootécnico e na coloração de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*)

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 22 de dezembro de 2022, por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

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

Prof.(a) Débora Machado Fracalossi, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Fabício Pereira Rezende, Dr.
EMBRAPA

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 em Aquicultura

Prof.(a) Mônica Yumi Tsuzuki, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis

2022

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado, iluminando-me e dando forças para seguir em frente.

Aos meus pais, Eloi Rodrigues e Erenita Medeiros Dutra, pelo incentivo e apoio para que eu seguisse o meu caminho e meus sonhos. Sem vocês eu nada seria, amo vocês!

À minha namorada, Daniela, meu amor, que esteve ao meu lado o tempo todo, dando-me apoio e forças para seguir em frente. Minha gratidão e amor eternos!

Ao Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) e aos colegas e amigos que fiz durante o mestrado e que estiveram comigo durante os bons e maus momentos da graduação. Aprendi muito com cada um de vocês.

À minha orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki, e meu coorientador, Rafael de Oliveira Jaime Sales, por todo apoio, atenção, compreensão e confiança para que esse trabalho fosse realizado.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, bem como toda sua equipe, que, de alguma forma, fizeram parte dessa jornada me ensinando e guiando pelo caminho. Serei eternamente grato!

Por fim, ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo auxílio financeiro concedido para realização da pesquisa.

“ Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda. ” (Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de extratos ricos em ácidos graxos e carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana* na dieta na performance zootécnica e coloração corporal em juvenis de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) durante 60 dias. Foram testadas, em triplicata, quatro tratamentos: DCT- Controle; DAG- Dieta contendo 2% Extrato de Ácidos Graxos; DCA- Dieta contendo 2% Extrato de Carotenoides e DCAG- Dieta contendo 2% de cada um dos dois extratos. A inclusão dos extratos ocorreu com a substituição de 50% do óleo de peixe. Juvenis de *A. ocellaris* ($1,22 \pm 0,34$ g e $3,24 \pm 0,29$ cm; média \pm D.P) foram alimentados três vezes ao dia, a 4% do seu peso corporal. Após período de 0 a 30 e 0 a 60 dias foram avaliados a sobrevivência, parâmetros zootécnicos (ganho de peso, ganho médio diário, taxa de crescimento específico, taxa de conversão alimentar, coeficiente de variação de peso e de comprimento) e parâmetros de coloração (CIELab – L: intensidade de coloração; a*: valores positivos = vermelho, negativos = verde; b*: valores positivos = amarelo, negativos = azul), por meio de pesagem, biometria e fotografia dos peixes. A sobrevivência ao final dos 60 dias de cultivo foi superior a 71,1%. Aos 30 dias, observou-se maior peso com a dieta DAG, e maior comprimento com as dietas DAG e DCAG. Entretanto, aos 60 dias, os dados zootécnicos foram similares em todos os tratamentos, demonstrando que a substituição do óleo de peixe pelos extratos de microalgas não acarreta em perdas produtivas. Ao final do experimento, peixes do DCA foram os que obtiveram coloração mais próxima do vermelho (a*) e do amarelo (b*), com cores mais vivas. Uma vez que, a coloração é um dos principais fatores que determinam o preço dos peixes de aquário no mercado mundial, a dieta DCA é recomendada para melhorar a cor sem comprometer o desempenho zootécnico.

Palavras-chave: Aquicultura; Nutrição; Peixes Ornamentais Marinhos; Coloração; Microalgas

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of dietary inclusion of extracts rich in fatty acids and carotenoids from the microalgae *Nannochloropsis gaditana* on the zootechnical performance and body color in juvenile clownfish (*Amphiprion ocellaris*) for 60 days. Four treatments were tested in triplicate: DCT- Control; DAG- diet containing 2% fatty acid extract; DCA- diet containing 2% carotenoid extract; DCAG- diet containing 2% of each of the two extracts. The inclusion of the extracts occurred with the replacement of 50% of fish oil. Juvenile *A. ocellaris* (1.22 ± 0.34 g and 3.24 ± 0.29 cm; mean \pm SD) were fed three times a day at 4% of body weight. After a period of 0 to 30 and 0 to 60 days, survival, growth parameters (weight gain, average daily gain, specific growth rate, feed conversion rate, coefficient of variation of weight and length) and color parameters (CIELab – L: color intensity; a*: positive values = red, negative = green; b*: positive values = yellow, negative = blue) were evaluated by weighing, biometry and photography of the fish. The survival rate at the end of 60 days of rearing was superior to 71.1%. At 30 days, higher weight was observed in the DAG diet, and higher length in the DAG and DCAG diets. However, at 60 days, the growth performance was similar in all treatments, demonstrating that the replacement of fish oil by microalgae extracts does not result in productive losses. At the end of the experiment, fish from the DCA exhibited a color closer to red (a*) and yellow (b*), with brighter colors. Since color is one of the major factors determining the price of aquarium fish in the world market, the DCA diet is recommended for improving color without compromising zootechnical performance.

Keywords: Aquaculture. Nutrition. Ornamental Marine Fish; Coloring; Microalgae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécime de <i>Amphiprion ocellaris</i> utilizado no experimento	12
Figura 2 - Ilustração das medições realizadas para obtenção dos dados de comprimento	28
Figura 3 - Representação tridimensional do sistema CIELab	30
Figura 4 - Pontos das regiões corporais do <i>Amphiprion ocellaris</i> escolhidas para medição da coloração	31
Figura 5 - Peso aos 30 e 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i>	34
Figura 6 - Comprimento padrão aos 30 e 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i>	35
Figura 7 - Média \pm DP das variáveis L, a* e b* do corpo inteiro de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga (<i>Nannochloropsis gaditana</i>) aos 30 dias de cultivo	39
Figura 8 - Média \pm DP das variáveis L, a* e b* do corpo inteiro de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga (<i>Nannochloropsis gaditana</i>) aos 60 dias de cultivo	40
Figura 9 - Exemplos de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga (<i>Nannochloropsis gaditana</i>) aos 60 dias de cultivo	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais (gramas de ingredientes por 100g de ração)	23
Tabela 2 - Perfil de Ácidos Graxos das dietas experimentais (% dos ácidos graxos totais)	24
Tabela 3 - Carotenoides presentes nas dietas experimentais (mg.kg ⁻¹).....	25
Tabela 4 - Carotenoides presentes nas dietas experimentais (mg.kg ⁻¹)	26
Tabela 5 - Desempenho zootécnico aos 30 e 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i>	33
Tabela 6 - Coloração aos 30 dias de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i>	36
Tabela 7 - Coloração aos 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (<i>Amphiprion ocellaris</i>) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i>	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo geral.....	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	17
1.2	ESTRUTURA DO TRABALHO.....	17
2	ARTIGO CIENTIFICO.....	18
3	INTRODUÇÃO.....	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1	PRODUÇÃO DOS EXTRATOS DA MICROALGA <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i>	22
4.2	ELABORAÇÃO DAS RAÇÕES.....	22
4.3	LARVICULTURA.....	26
4.4	EXPERIMENTO: EFEITO DAS DIFERENTES DIETAS NA COLORAÇÃO E NO CRESCIMENTO DOS PEIXES.....	27
4.4.1	Delineamento experimental.....	27
4.4.2	Biometria e análises.....	28
4.5	AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO DOS PEIXES.....	29
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5	RESULTADOS.....	32
5.1	DESEMPENHO ZOOTÉCNICO.....	32
5.2	COLORAÇÃO DOS PEIXES.....	35
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	51

1 INTRODUÇÃO

Mercado da aquariorfilia e origem dos peixes comercializados

Os animais de estimação estão cada vez mais presentes nos nossos lares, com o mercado PET crescendo a cada ano e os peixes ornamentais estão entre os mais populares. No Brasil, só em 2019, os peixes ornamentais representaram 13,8% da população de animais de estimação, ficando atrás apenas dos cães, gatos e aves (ABINPET, 2021). No país, em 2020, o mercado pet movimentou 27,02 bilhões de reais (ABINPET, 2021).

Em 2016, somente a comercialização de peixes ornamentais de água doce e marinhos movimentou cerca de US\$ 337 milhões no mercado de exportações mundial (CALADO et al., 2017; RAJA et al., 2019). Segundo Santos (2018), o Brasil ocupou o 13º lugar no ranking de países exportadores, movimentando, em 2016, 6,5 milhões dólares, sendo a maioria dos animais representada por espécies de água doce.

A popularização e o crescimento do aquarismo no Brasil e no mundo vem impulsionando o extrativismo e o setor de aquicultura (FARIA et al., 2019). Dentro desse setor, a piscicultura ornamental mostra-se como uma das áreas mais lucrativas devido aos altos valores individuais que as diversas espécies comercializadas conseguem alcançar no mercado global. A grande maioria dos peixes ornamentais de água doce são produzidos em cativeiro, no entanto, o extrativismo ainda é responsável por grande parte dos peixes ornamentais marinhos comercializados (WABNITZ et al., 2003; FAO, 2005; SMITH et al., 2008; PALMTAG, 2017). O processo extrativista é geralmente invasivo e danoso ao meio ambiente (uso de químicos e explosivos), devido ao grande número de animais retirados (pesca predatória), sendo que até 80% desses morrem entre a captura, o manejo e o transporte, o que, sem uma efetiva fiscalização, pode levar a uma sobre-exploração dos recursos naturais, mostrando ser uma prática insustentável (WABNITZ et al., 2003; GASPARINI et al., 2005).

A produção desses animais por meio da aquicultura é mais sustentável ecológica e economicamente, pois é possível produzir animais com alto valor de mercado em pequenas áreas, com um constante fornecimento de peixes para o mercado e, como consequência, diminuindo a coleta dos estoques naturais (KODAMA et al., 2011; POUIL et al., 2020). Além disso, a criação em cativeiro produz indivíduos mais resistentes, melhor adaptados às dietas artificiais, com maior expectativa de vida em aquários e possibilita também a produção de animais com fenótipos diferenciados (WITTENRICH, 2007; PALMTAG, 2017).

Peixes-palhaço

Os peixes-palhaço, Família Pomacentridae, subfamília Amphiprioninae, fazem parte do gênero *Amphiprion* que compreende cerca de 30 espécies catalogadas, além da espécie *Premnas biaculeatus* do gênero *Premnas* (THORNHILL, 2012; CALADO et al., 2017). São animais pequenos, medindo entre 5 e 16 cm de comprimento, muito conhecidos pela sua relação simbiótica com as anêmonas do mar (CALADO et al., 2017) e de distribuição tropical, vivendo nas regiões do Indo-Pacífico e do Mar Vermelho (KODAMA et al., 2011; THORNHILL, 2012).

Dentre as espécies existentes, o *Amphiprion ocellaris* (Figura 1), popularmente conhecido como peixe-palhaço comum, é a espécie mais popular no aquarismo marinho, tendo a maior demanda no mercado, estando entre os cinco peixes ornamentais marinhos mais exportados no mundo (RHYNE et al., 2012).

Figura 1: Espécime de *Amphiprion ocellaris* utilizado no experimento



Reino: Animalia
 Filo: Chordata
 Classe: Actinopterygii
 Ordem: Perciformes
 Família: Pomacentridae
 Gênero: Amphiprion
 Espécie: *Amphiprion ocellaris*
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O sucesso dos peixes-palhaços no mercado do aquarismo deve-se muito as suas características positivas como pequeno tamanho, coloração viva e variado padrão de cores, comportamento de associar-se a anêmonas, grande adaptabilidade ao cativeiro, além de possuir

um protocolo de cultivo já fundamentado e facilmente executável (WITTENRICH, 2007; SAHANDI, 2011).

Coloração dos peixes e sua importância no mercado

No mercado de peixes ornamentais, a coloração é considerada um dos parâmetros mais importantes para a determinação do preço e da escolha pelos compradores (CALADO et al., 2017; LUO et al., 2021). Em situação de cativeiro deve-se atentar à perda da coloração natural, o que pode diminuir o valor de mercado dos peixes. Essa perda de coloração ocorre pelas diferenças na dieta dos peixes, visto que a alimentação no ambiente natural é mais rica em carotenoides, pigmentos orgânicos lipossolúveis, produzidos exclusivamente por plantas (fitoplâncton, algas), bactérias e fungos (LIM et al., 2018), que modulam a coloração da pele e músculo dos peixes. Para evitar o problema da perda de coloração na aquicultura deve-se fornecer dietas contendo ingredientes com fontes de carotenoides (NANTHINI DEVI et al., 2015; CALADO et al., 2017).

A determinação da cor no corpo dos peixes é dada pelo acúmulo das substâncias pigmentantes em seu organismo. Na pele, o armazenamento dos carotenoides acontece nos cromatóforos, responsáveis pela expressão da cor e características visuais. Já a coloração muscular ocorre pelo acúmulo dos carotenoides nos depósitos de gordura intramuscular (DANIEL et al., 2017). Os organismos aquáticos possuem várias cores que podem ser obtidas pelo acúmulo de diferentes substâncias pigmentantes, como a cor preta provinda da melanina, as cores metalizadas provindas por bases nitrogenadas, as cores fosforescentes provindas pelas proteínas luminescentes e as demais cores provenientes de antocianinas e xantofilas (PRICE et al., 2008; MAHALWAR et al., 2014).

Desta forma, a reprodução da coloração natural dos peixes criados na aquicultura ainda é um problema e isso está intimamente ligada à alimentação, pois peixes não conseguem sintetizar pigmentos carotenoides, sendo essa provinda da dieta, mostrando a importância da suplementação de carotenoides nas dietas dos peixes marinhos (RAMAMOORTHY et al., 2010; NRC, 2011; GÜROY et al., 2012; CALADO et al., 2017). Sabe-se que os carotenoides, além de utilizados na alimentação como corantes naturais, são precursores de vitamina A, estimulam o sistema imunológico, aumentam a resistência ao estresse, promovem o desenvolvimento embrionário (NIU et al., 2011), melhoram o desempenho reprodutivo, bem

como possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas. (SCABINI et al., 2011; VILCHEZ et al., 2011; SATHASIVAM et al., 2019).

Os carotenoides podem ser obtidos de forma natural ou sintetizados. Dentre os carotenoides naturalmente encontrados temos, por exemplo, o beta-caroteno, a luteína, astaxantina e zeaxantina, mais comumente encontrados em água doce (NRC, 2011). E dentre os carotenoides sintéticos, mais amplamente utilizados no panorama da aquicultura, temos astaxantina, beta-caroteno, zeaxantina e cantaxantina (KALINOWSKI, 2005). Vale destacar que as fontes naturais de carotenoides são compostas, muitas vezes, por diversos carotenoides diferentes, o que pode fazer com que a sua adição nas dietas seja mais complexa de ser estudada (CALADO et. al., 2017).

Estudos com fontes alternativas de carotenoides como macroalgas (*Enteromorpha sp.*), batata doce (*Ipomoea batatas*), cenoura (*Daucus carota*), hibisco (*Hibiscus rosasinensis*), rosas (*Rosa chinensis*), páprica (*Curcuma longa*) e extrato de marigold (*Tagetes erecta*) mostram uma melhora na coloração dos peixes-palhaço comum (*A. ocellaris*) (RAMAMOORTHY et al., 2010; NHAN et al., 2019; EBENEEZAR et al., 2020). Em estudos com urucum (*Bixa orellana*), observou-se uma melhora na pigmentação da pele de kinguios (*Carassius auratus*) (FRIES et al., 2014) e do filé de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (SAFARI e ATASH, 2015). Um estudo com a adição de microalgas (*Ankistrodesmus gracilis* e *Haematococcus pluvialis*) nas dietas demonstrou uma melhora na coloração do peixe Tetra-serpae (*Hyphessobrycon eques*) (BERCHIELLI-MORAIS, FERNANDES e SIPAÚBA-TAVARES, 2016). Güroy et al. (2022) sugeriram que a inclusão da microalga Spirulina, fonte de carotenoides, na dieta melhorou a intensidade da coloração do peixe-palhaço comum (*A. ocellaris*).

Ácidos Graxos

Os lipídeos são fundamentais para a saúde, a sobrevivência e a reprodução dos peixes, possuindo funções bem definidas: fonte de energia, estruturais, hormonais, dentre outras (HALILOGLU et al., 2003; CALADO et al., 2017). Dentro dos lipídeos, os ácidos graxos, especialmente os poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) são muito importantes para os peixes marinhos, pois atuam em diversas funções fisiológicas como regulação da fluidez da membrana, controle da fluutuabilidade, transporte de nutrientes lipossolúveis, como os

carotenoides (CALADO et al., 2017), além de serem fundamentais para a reprodução, desenvolvimento dos alevinos e crescimento dos peixes (FERREIRA, 2009; CALADO et al., 2017). No entanto, os peixes marinhos não são capazes de sintetizar os LC-PUFAs (NRC, 2011), devendo ser fornecidos na dieta a fim de evitar deficiências nutricionais.

Os ácidos graxos podem ser adicionados às dietas por meio de alimentos ricos em fontes lipídicas como as farinhas de origem animal e vegetal, óleos de origem animal e vegetal, resíduos de origem animal, além do zooplâncton, microalgas e ingredientes sintéticos (CALADO et al., 2017; MEJRI et al., 2021). No entanto, as principais fontes de LC-PUFAs para os peixes marinhos vêm de alimentos derivados de pescados. Estes por sua vez, vem sendo cada vez menos utilizados devido aos altos custos e baixa disponibilidade no mercado, além de não serem sustentáveis em longo prazo, visto que são obtidos da atividade pesqueira e estão ligados à sobre-exploração dos estoques naturais (TACON e METIAN, 2008; BENDIKSEN, 2011). Nesse sentido, a busca por substitutos dos derivados de pescados é de suma importância para a sustentabilidade da produção aquícola. No entanto, esta substituição deve ser realizada tendo em mente a manutenção de níveis adequados de proteína, energia e ácidos graxos essenciais, além dos demais nutrientes necessários para os animais (SILVA JÚNIOR et al., 2011).

Alternativas para o óleo de peixe vem sendo mais utilizadas, como os óleos vegetais, devido ao seu baixo preço de mercado. No entanto seu uso deve ser ponderado, pois alguns óleos, como o óleo de soja, não apresentam o mesmo perfil de ácidos graxos, principalmente do ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e do ácido docosa-hexaenoico (DHA, 22:6n-3), quando comparado ao óleo de peixe (MILLER, NICHOLS e CARTER, 2008; SILVA JÚNIOR et al., 2011).

Os LC-PUFAs são considerados essenciais para os peixes marinhos e entre eles o EPA, o DHA e o ácido araquidônico (ARA, 20:4n-6) são os cruciais para os peixes marinhos (NRC, 2011). DHA e EPA estão intimamente envolvidos na fase de desenvolvimento larval, atuando no crescimento, mortalidade, desenvolvimento do sistema imune e sistema de resposta ao estresse, e o ARA ligado à sobrevivência, resistência ao estresse e pigmentação. O EPA juntamente com o ARA são precursores de bioativos eicosanoides como a prostaglandina, leucotrieno e fator de agregação de plaquetas. Deficiências desses ácidos graxos podem causar

piora na saúde, baixo crescimento, baixa eficiência alimentar e maiores níveis de mortalidade em peixes (TOCHER, 2010; HAMRE et al., 2013; CALADO et al., 2017; MEJRI et al., 2021)

Microalgas como fonte de pigmentos e ácidos graxos

A utilização de microalgas em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e alimentos funcionais vem sendo amplamente estudada, visto a gama de compostos de alto valor biológico e econômico que elas apresentam. Alguns desses compostos são os carotenoides, ácidos graxos, ficobilinas, polissacarídeos, entre outros (BOROWITZKA, 2013).

A biomassa de microalgas, devido ao seu alto valor proteico e energético, também pode substituir ingredientes como a farinha e o óleo de peixe (GARCIA-ORTEGA et al., 2016) e também servir como um pigmentante (BERCHIELLI-MORAIS, FERNANDES e SIPAÚBA-TAVARES, 2016; ROSAS et al., 2019). O uso de extrato de microalgas como ingrediente substituto ao óleo de peixe pode ser vantajoso, visto que ambos são ricos em ácidos graxos poli-insaturados (LC-PUFAs) predominantemente das séries ômega-3 (CLELAND et al., 2005; MENDES et al., 2009). Estudos com peixes ornamentais de água doce sugerem efeitos positivos da adição nas dietas da microalga *Spirulina* (*Spirulina platensis*) no crescimento e na coloração dos animais (GÜROY et al., 2012; LILI et al., 2021; MOHAMMADIAZARM et al., 2021). Também há estudos prévios que avaliaram a aplicação da *Spirulina* na dieta de peixes-palhaço (*A. ocellaris*) e sugerem uma melhora na coloração dos mesmos (MARQUES, 2019; HADIJAH, JUNAIIDI e LESTARI, 2020; DÍAZ-JIMÉNEZ et al., 2021).

Entretanto, o uso de microalgas como ingrediente pode trazer algumas dificuldades, pois algumas espécies apresentam parede celular rígida e, conseqüentemente, apresentando baixa digestibilidade para alguns peixes, em particular para os carnívoros (VIZCAÍNO et al., 2019). Dessa maneira, o processamento das microalgas com a finalidade romper mecanicamente a parede celular é uma alternativa. Um estudo com a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) mostrou que o processamento físico da *N. gaditana* melhorou a digestibilidade dos nutrientes em testes *in vitro* e *in vivo* (TEULING et al., 2019). Outros estudos também sugerem que o processamento da biomassa de *N. oculata* pode melhorar a digestibilidade da proteína, lipídeos e β -caroteno (GOH et al., 2009; CAVONIUS, ALBERS e UNDELAND, 2016).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Aprimorar dietas para peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) com o intuito de maximizar o desempenho zootécnico e a coloração dos animais cultivados.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho zootécnico (ganho de peso, ganho médio diário, taxa de crescimento específico, taxa de conversão alimentar e sobrevivência) de juvenis de *Amphiprion ocellaris* alimentados com rações com a inclusão de extratos da microalga *Nannochloropsis gaditana* contendo carotenoides, ácidos graxos e a mescla dos dois;
- Avaliar a alteração da coloração da pele de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com rações com a inclusão de extratos da microalga *N. gaditana* contendo carotenoides, ácidos graxos e a mescla dos dois.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

A dissertação será formatada para ser submetida para publicação na revista científica *Aquaculture International* (ISSN: 0967-6120, E-ISSN: 1573-143X)

2 ARTIGO CIENTIFICO

Efeito da inclusão de extratos de microalgas ricos em ácidos graxos e carotenoides em rações no desempenho zootécnico e na coloração de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*)

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de extratos ricos em ácidos graxos e carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana* na dieta na performance zootécnica e coloração corporal em juvenis de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) durante 60 dias. Foram testadas, em triplicata, quatro tratamentos: **DCT**- Controle; **DAG**- Dieta contendo 2% Extrato de Ácidos Graxos; **DCA**- Dieta contendo 2% Extrato de Carotenoides e **DCAG**- Dieta contendo 2% de cada um dos dois extratos. A inclusão dos extratos ocorreu com a substituição de 50% do óleo de peixe. Juvenis de *A. ocellaris* ($1,22 \pm 0,34$ g e $3,24 \pm 0,29$ cm; média \pm D.P) foram alimentados três vezes ao dia, a 4% do seu peso corporal. Após período de 0 a 30 e 0 a 60 dias foram avaliados a sobrevivência, parâmetros zootécnicos (ganho de peso, ganho médio diário, taxa de crescimento específico, taxa de conversão alimentar, coeficiente de variação de peso e de comprimento) e parâmetros de coloração (CIELab – L: intensidade de coloração; a*: valores positivos = vermelho, negativos = verde; b*: valores positivos = amarelo, negativos = azul), por meio de pesagem, biometria e fotografia dos peixes. A sobrevivência ao final dos 60 dias de cultivo foi superior a 71,1%. Aos 30 dias, observou-se maior peso com a dieta DAG, e maior comprimento com as dietas DAG e DCAG. Entretanto, aos 60 dias, os dados zootécnicos foram similares em todos os tratamentos, demonstrando que a substituição do óleo de peixe pelos extratos de microalgas não acarreta em perdas produtivas. Ao final do experimento, peixes do DCA foram os que obtiveram coloração mais próxima do vermelho (a*) e do amarelo (b*), com cores mais vivas. Uma vez que, a coloração é um dos principais fatores que determinam o preço dos peixes de aquário no mercado mundial, a dieta DCA é recomendada para melhorar a cor sem comprometer o desempenho zootécnico.

Palavras-chave: Aquicultura; Nutrição; Peixes Ornamentais Marinhos; Coloração; Microalgas

3 INTRODUÇÃO

Dentro da aquicultura, a piscicultura ornamental mostra-se como uma das áreas mais lucrativas devido aos altos valores individuais que as diversas espécies comercializadas conseguem alcançar no mercado global.

A popularização e o crescimento do aquarismo no Brasil e no mundo vem impulsionando o extrativismo e o setor de aquicultura (FARIA et al., 2019). No entanto, o extrativismo ainda é responsável por grande parte dos peixes ornamentais marinhos comercializados (WABNITZ, 2003; FAO, 2005). A produção desses animais por meio da aquicultura é mais sustentável ecológica e economicamente, pois é possível produzir animais com alto valor de mercado em pequenas áreas, com um constante fornecimento de peixes para o mercado e, como consequência, diminuindo a coleta dos estoques naturais (KODAMA et al., 2011; POUIL et al., 2020).

Nesse mercado, os peixes da família Pomacentridae representam uma elevada fração dos indivíduos comercializados, sendo que os peixes-palhaço, integrantes dessa família, estão entre os cinco peixes ornamentais marinhos mais exportados no mundo (RHYNE et al., 2012). Grande parcela dos peixes-palhaço fazem parte do gênero *Amphiprion* que é constituído por 30 espécies catalogadas e a espécie *Premnas biaculeatus* do gênero *Premnas* (THORNHILL, 2012; CALADO et al., 2017), distribuindo-se em águas tropicais, de regiões do Indo-Pacífico e do Mar Vermelho (KODAMA et al., 2011; THORNHILL, 2012). O sucesso dos peixes-palhaços no mercado do aquarismo deve-se muito as suas características positivas como pequeno tamanho, coloração viva e variado padrão de cores, comportamento de associar-se a anêmonas, grande adaptabilidade ao cativeiro, além de possuir um protocolo já fundamentado e facilmente executável (WITTENRICH, 2007; SAHANDI, 2011).

No mercado de peixes ornamentais, a coloração é considerada um dos parâmetros mais importantes para a determinação do preço e de escolha dos compradores (CALADO et al., 2017; LUO et al., 2021). Em situação de cultivo, deve-se atentar para a perda da coloração natural, o que pode diminuir o valor de mercado dos peixes. Isso ocorre pelas diferenças na alimentação dos peixes, visto que, no ambiente natural, a alimentação dos animais é mais rica em fontes diversas de carotenoides, pigmentos naturais que modulam a coloração dos peixes, e, portanto,

para evitar esse problema, deve-se fornecer dietas contendo ingredientes com fontes de carotenoides (NANTHINI DEVI et al., 2015; CALADO, 2017).

Toda e qualquer produção animal depende da nutrição e da alimentação de qualidade para o sucesso dos organismos produzidos. Além disso, a indústria de rações busca ingredientes alternativos, principalmente para a farinha de peixe e óleo de peixe, por serem de alto custo e não sustentáveis a longo prazo, visto que ambos são obtidos da atividade pesqueira, que vem sobre-explotando os estoques naturais (TACON e METIAN, 2008; BENDIKSEN, 2011).

Portanto, a busca por substitutos do óleo de peixe é de suma importância para a sustentabilidade das produções aquícolas, no entanto deve ser realizada tendo em mente a manutenção de níveis adequados de energia e ácidos graxos essenciais (SILVA JÚNIOR et al., 2011). Por exemplo, a utilização do óleo de soja, um dos mais utilizados na cadeia de produção animal, deve ser ponderado, uma vez que possui em sua composição maior concentração de ácidos graxos da série ômega-6, diferentemente do óleo de peixe e do extrato de microalgas, modificando o perfil de ácidos graxos corporais (SILVA JÚNIOR et al., 2011). Os ácidos graxos, especialmente os poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), são importantes para diversas funções fisiológicas como regulação da fluidez da membrana, adaptação térmica, além de serem fundamentais para a reprodução, para o desenvolvimento dos alevinos e para o crescimento dos peixes (FERREIRA, 2009; CALADO, 2017).

Sabe-se que os carotenoides, além de utilizados na alimentação como corantes naturais, são precursores de vitamina A, estimulando o sistema imunológico, aumentando a resistência ao estresse, promovendo o desenvolvimento embrionário (NIU et al., 2011), melhorando o desempenho reprodutivo, bem como possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas. (SCABINI et al., 2011; VILCHEZ et al., 2011; SATHASIVAM et al., 2019).

A utilização de microalgas vem sendo amplamente estudada, visto que apresentam uma gama de compostos de alto valor biológico e econômico, nas áreas de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e alimentos funcionais. Alguns desses compostos são os carotenoides, ácidos graxos e as ficobilinas (BOROWITZKA, 2013). A biomassa de microalgas, devido ao seu alto valor proteico e energético, também pode substituir ingredientes como a farinha e o óleo de peixe (GARCIA-ORTEGA et al., 2016) e também servir como um pigmentante (BERCHIELLI-MORAIS, FERNANDES e SIPAÚBA-TAVARES, 2016; ROSAS et al., 2019). O uso de extrato de microalgas como ingrediente substituto ao óleo de peixe pode ser

vantajoso, visto que ambos são ricos em ácidos graxos poli-insaturados (LC-PUFAs) predominantemente das séries ômega-3, ingrediente importante devido aos peixes não serem capazes de sintetizá-los (CLELAND et al., 2005; MENDES et al., 2009; NRC, 2011).

Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar o efeito da inclusão de extratos de ácido graxo e carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana* em rações no desempenho zootécnico e na coloração de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS DA MICROALGA *NANNOCHLOROPSIS GADITANA*

A metodologia de extração de carotenoides e de ácidos graxos da biomassa das microalgas e a fabricação das rações que foram avaliadas no presente estudo foram desenvolvidas pelo coorientador desta pesquisa, Dr. Rafael de Oliveira Jaime Sales, durante o seu doutorado sanduíche no Departamento de Engenharia Química, Universidad de Almería – Espanha (SALES, 2021b).

A microalga *Nannochloropsis gaditana* foi cultivada em fotobiorreatores tubulares na planta piloto na Universidad de Almería – Espanha em modo contínuo (taxa de diluição 0,2 d⁻¹), sendo que diariamente a biomassa era centrifugada e liofilizada.

A partir da biomassa seca e macerada foram obtidos dois extratos, um rico em carotenoides e outro rico em ácidos graxos. A metodologia de extração proposta por Cerón-García et al. (2018b) foi adaptada por Sales et al. (2021a) onde uma solução tricomponente contendo água:propanol:hexano (A:P:H, 12:74:17) KOH 40% foi adicionada à biomassa e ao ajustar a proporção dos solventes para 10:40:50 (A:P:H) ocorria a separação da fase hexânica contendo os carotenoides que era separada por decantação. Em seguida, o pH da solução contendo propanol e água era acidificado, promovendo a liberação dos ácidos graxos, em seguida se adicionava hexano para extrair os ácidos graxos. Finalmente, os solventes dos extratos foram evaporados em rotavapor e os extratos armazenados em câmara fria até a produção das rações. O perfil de carotenoides do extrato foi determinado em HPLC pelo método de Cerón-García et al. (2018a) e o perfil de ácidos graxos do extrato determinado em cromatógrafo gasoso de acordo com López-Rodríguez et al. (2019).

4.2 ELABORAÇÃO DAS RAÇÕES

As rações foram elaboradas no Departamento de Biología e Geología, CEIA3 (Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario) da Universidad de Almería (SALES, 2021b). As

dietas foram formuladas com a substituição de 50% do óleo de peixe pelo extrato de ácidos graxos e a inclusão do extrato de carotenoides, ambos obtidos da microalga *Nannochloropsis gaditana*, compondo três tratamentos e um controle, **DAG** - ração contendo 2% de extrato de ácidos graxos, **DCA** - ração contendo 2% de extrato de carotenoides, **DCAG** - ração contendo 2% de extrato de carotenoides e 2% de ácidos graxos da microalga, e **DCT** – tratamento controle, sem a inclusão de nenhum dos extratos. A composição detalhada das dietas está descrita nas Tabela 1, 2 e 3.

Os ingredientes para a ração foram moídos e homogeneizados em um misturador de fita de hélice vertical (Sammic BM-10, Azpeitia, Espanha), posteriormente óleo de peixe, cloreto de colina diluído e os extratos foram adicionados. A mistura foi peletizada a 1 mm e os peletes de ração secados em estufa a 27°C por 24 horas e guardados a -20 °C.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais (gramas de ingredientes por 100g de ração)

Ingredientes	DCT	DAG	DCA	DCAG
Farinha de peixe ^a	15,0	15,0	15,0	15,0
Farinha de glúten de trigo	15,0	15,0	15,0	15,0
Farelo de soja	37,4	37,4	37,4	37,4
Premix atrator ^b	8,0	8,0	8,0	8,0
Óleo de peixe	4,0	2,0	4,0	2,0
Óleo de soja	4,0	4,0	4,0	4,0
Extrato de ácidos graxos	0,0	2,0	0,0	2,0
Extrato de carotenoides	0,0	0,0	2,0	2,0
CPSP90 ^c	5,0	5,0	5,0	5,0
Celmanax	0,5	0,5	0,5	0,5
Nucleoforce	0,1	0,1	0,1	0,1
Lecitina de soja	1,0	1,0	1,0	1,0
Lisina	1,2	1,2	1,2	1,2
Metionina	0,5	0,5	0,5	0,5
Maltodextrina	3,2	3,2	1,2	1,2
Colina	0,5	0,5	0,5	0,5

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais (gramas de ingredientes por 100g de ração) (continuação)

Ingredientes	DCT	DAG	DCA	DCAG
Betaína	0,5	0,5	0,5	0,5
Premix vitamínico-mineral	2,0	2,0	2,0	2,0
Stay C Roche 0,2%	0,1	0,1	0,1	0,1
Goma guar	1,0	1,0	1,0	1,0
Alginato	1,0	1,0	1,0	1,0

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

^a Proteína 69,40%; Extrato Etéreo 12,30%, Norsildemel (Bergen, Noruega)

^b 37,50% farinha de krill; 62,50% farinha de lula.

^c Proteína 84,10%; Extrato Etéreo 8,80%, Sopropeche (França)

Fonte: SALES et al. (2021b).

Tabela 2 - Perfil de Ácidos Graxos das dietas experimentais (% dos ácidos graxos totais) (continua)

Ácido Graxo (A.G.)	DCT	DAG	DCA	DCAG
14:0	1,7 ± 0,0	2,7 ± 0,0	2,2 ± 0,0	2,8 ± 0,1
16:0	15,3 ± 0,0	17,1 ± 0,1	16,1 ± 0,0	17,3 ± 0,2
16:1n-7	2,3 ± 0,0	5,5 ± 0,0	3,9 ± 0,0	6,2 ± 0,2
16:2n-4	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0
16:3n-4	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0
18:0	4,7 ± 0,0	3,8 ± 0,0	4,3 ± 0,0	3,6 ± 0,0
18:1n-9	17,7 ± 0,0	16,4 ± 0,1	16,6 ± 0,0	15,8 ± 0,2
18:1n-7	2,1 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,6 ± 0,0
18:2n-6	26,7 ± 0,1	26,1 ± 0,1	24,6 ± 0,0	24,8 ± 0,2
18:3n-3	3,2 ± 0,0	3,0 ± 0,0	2,9 ± 0,0	2,9 ± 0,0
18:4n-3	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0
20:1n-9	2,3 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,1 ± 0,0	1,8 ± 0,0
20:4n-6 (ARA)	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,6 ± 0,0
20:4n-3	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0

Tabela 2 - Perfil de Ácidos Graxos das dietas experimentais (% dos ácidos graxos totais) (continuação)

Ácido Graxo (A.G.)	DCT	DAG	DCA	DCAG
20:5n-3 (EPA)	4,5 ± 0,0	6,8 ± 0,1	6,3 ± 0,0	7,9 ± 0,1
22:5n-3	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0
22:6n-3 (DHA)	10,8 ± 0,0	7,0 ± 0,2	9,9 ± 0,0	6,7 ± 0,1
Outros A.G.	5,4 ± 0,1	4,6 ± 0,0	5,4 ± 0,1	5,2 ± 0,1
SFA	21,7 ± 0,0	23,6 ± 0,1	22,6 ± 0,1	23,7 ± 0,3
MUFA	24,4 ± 0,0	25,5 ± 0,1	24,6 ± 0,0	25,4 ± 0,0
LC-PUFA	17,2 ± 0,1	16,0 ± 0,3	18,5 ± 0,1	16,9 ± 0,1
n-3	20,2 ± 0,1	18,2 ± 0,3	20,8 ± 0,1	18,7 ± 0,1
n-6	27,5 ± 0,1	27,4 ± 0,1	25,8 ± 0,0	26,4 ± 0,2
n-9	20,0 ± 0,0	18,3 ± 0,1	18,7 ± 0,0	17,6 ± 0,2
n-3/n-6	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0
EPA/DHA	0,4 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). SFA: Ácido Graxo Saturado; MUFA: Ácido Graxo Monoinsaturado; LC-PUFA: Ácido Graxo Poli-insaturado de Cadeia Longa; EPA: Ácido Eicosapentaenoico; DHA: Ácido Docosahexaenoico.

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: SALES et al. (2021b).

Tabela 3 - Carotenoides presentes nas dietas experimentais (mg.kg⁻¹) (continua)

Carotenoide	DCT	DAG	DCA	DCAG
Neoxantina	0,2 ± 0,1	3,8 ± 4,3	66,8 ± 1,0	82,0 ± 2,2
Violaxantina	0,2 ± 0,0	2,5 ± 0,4	257,6 ± 10,7	221,4 ± 12,4
Anterioxantina	-	1,6 ± 0,2	40,4 ± 0,8	32,8 ± 2,3
Vaucheroxantina	-	0,8 ± 1,1	8,2 ± 0,3	8,8 ± 0,5
Zeaxantina	0,8 ± 0,0	3,0 ± 0,1	9,4 ± 0,5	12,5 ± 0,6
Vaucheroxantina Éster	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,6	0,3 ± 0,1
Cantaxantina	-	0,1 ± 1,7	2,0 ± 9,4	2,5 ± 12,9

Tabela 4 - Carotenoides presentes nas dietas experimentais (mg.kg⁻¹) (continuação)

Carotenoide	DCT	DAG	DCA	DCAG
β-caroteno	0,2 ± 0,1	9,4 ± 1,7	277,6 ± 9,4	297,1 ± 12,9
Total	1,6 ± 0,1	21,5 ± 0,4	662,7 ± 21,8	657,3 ± 30,5

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3).

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: SALES et al. (2021).

4.3 LARVICULTURA

Juvenis de *A. ocellaris* utilizados foram provenientes de casais de reprodutores mantidos no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil, em tanques-rede conectados a um sistema de recirculação de 8.000 litros. Os casais foram alimentados duas vezes ao dia até à saciedade aparente com ração comercial Soft Line Marine (Tropical®, Polônia) e com patê composto por mexilhão, lula, peixes, ostras, algas, camarões frescos e premix vitamínico-mineral. Foi fornecido um vaso de cerâmica para deposição dos ovos. Após 7 dias de incubação o vaso foi levado para o tanque de incubação e larvicultura.

Após a eclosão, as larvas foram mantidas em sistema de água verde adicionando a microalga *Nannochloropsis oculata* (1x10⁶ células.ml⁻¹), com renovação diária de 20% da água de cultivo. Larvas foram alimentadas com rotíferos (10 rot.ml⁻¹) até o 7º dia, do 5º ao 10º dia foi ofertado náuplios de *Artemia* (10 náuplios.ml⁻¹), e do 9º dia até a metamorfose foi ofertado metanáuplios de *Artemia* enriquecidos com Algamac® 3050 Flake, PTAqua, Irlanda, (10 metanáuplios.ml⁻¹). Após o período de larvicultura, peixes foram “desmamados” (processo de transição do alimento vivo para o alimento inerte) com a ração NRD da Inve®, EUA, e engordados com a ração Marine Power da Tropical® (Polônia) por cinco meses até atingirem 3 – 3,5 cm de comprimento, tamanho em que conseguiam ingerir as dietas experimentais (1 mm).

4.4 EXPERIMENTO: EFEITO DAS DIFERENTES DIETAS NA COLORAÇÃO E NO CRESCIMENTO DOS PEIXES

4.4.1 Delineamento Experimental

O estudo foi realizado em 12 aquários com 15 litros cada, conectados em sistema de recirculação de água (filtro biológico, filtro mecânico - 10 μm e fracionador de espuma - Skimmer).

Foram testados quatro tratamentos, em triplicata, com as rações já descritas no item 1.2: **DAG** - extrato de ácidos graxos; **DCA** - extrato de carotenoides; **DCAG** - extrato de carotenoides e ácidos graxos; **DCT** - sem a inclusão de nenhum dos extratos.

Peixes foram alimentados a 4% do peso corporal com as dietas acima, 3 vezes ao dia (8:00, 12:00 e 16:00). Duas horas após a alimentação os aquários eram inspecionados e os mesmos sifonados quando havia sobras, a fim de manter a qualidade de água. A dose diária de alimentação foi ajustada de acordo com a biomassa dos peixes a cada biometria realizada.

Os juvenis de *A. ocellaris* apresentaram a pele mais próxima da cor alaranjada e tamanho homogêneos. Em cada aquário foram colocados aleatoriamente 15 indivíduos totalizando 180 animais e densidade de estocagem de 1 peixe por litro.

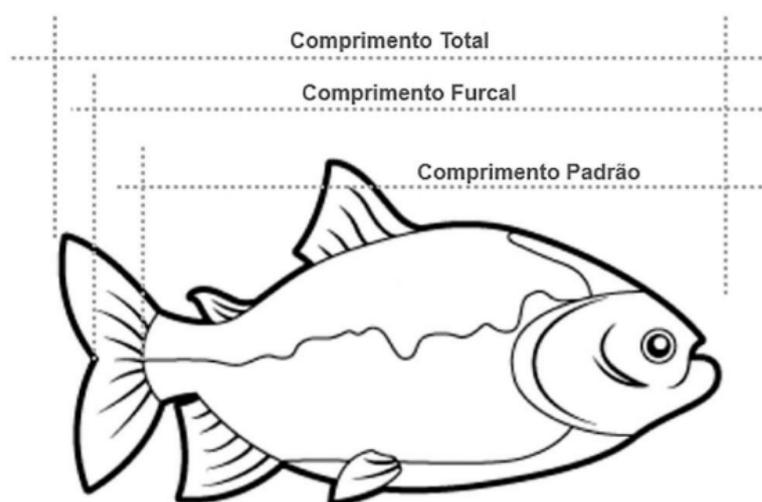
Os indivíduos apresentaram peso inicial de $1,08 \pm 0,25$ g (média \pm desvio padrão) (DCT), $1,21 \pm 0,27$ g (DAG), $1,18 \pm 0,27$ g (DCA) e $1,27 \pm 0,29$ g (DCAG), não havendo diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$). O comprimento padrão inicial foi de $3,17 \pm 0,31$ cm (DCT), $3,22 \pm 0,24$ cm (DAG), $3,25 \pm 0,33$ cm (DCA) e $3,31 \pm 0,28$ cm (DCAG), não havendo diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Durante o experimento a temperatura foi mantida em $27,4 \pm 0,53$ °C com auxílio de termostato-aquecedores, o fotoperíodo mantido em 12 horas de luz, a salinidade em $35 \pm 0,62$ ppm. Estes parâmetros eram monitorados diariamente. Amônia total e nitrito foram mantidos em $<0,025$ ppm e pH mantido em 8, sendo monitorados semanalmente com utilização de testes colorimétricos (Labcon Test®, Brasil).

4.4.2 Biometria e Análises

No início (dia 0), no meio (dia 30) e no final do experimento (dia 60), os peixes foram anestesiados por meio de imersão em água com óleo de cravo (20 mg.L^{-1}) até que fosse atingido o estágio de anestesia cirúrgica (PEDRAZZANI e OSTRENSKY, 2014). Logo após, peixes foram individualmente pesados em balança analítica (precisão 0,01g) e medidos (comprimento padrão, da extremidade do focinho à raiz da nadadeira caudal, e furcal, da extremidade do focinho à divisão dos lobos da nadadeira caudal) com paquímetro (precisão em mm) após jejum de 24 horas. Após as biometrias, os peixes eram colocados em aquários com água limpa e aeração para total recuperação, sendo após retornados para os aquários experimentais correspondentes.

Figura 2 - Ilustração das medições realizadas para obtenção dos dados de comprimento



Fonte: MAPA, 2022.

A partir dos dados biométricos obtidos foram calculadas as seguintes variáveis:

- *Coefficiente de variação do peso (CV; %/dias)* = (Desvio padrão do peso/Peso médio dos peixes) x 100

- *Coefficiente de variação do comprimento (CV; %/dias)* = (Desvio padrão do comprimento/Comprimento médio dos peixes) x 100
- *Ganho de peso (GP em g)* = Peso final (g) – Peso inicial (g)
- *Ganho de peso médio diário (GMD; g/dias)* = [(Peso final (g) – Peso inicial (g))/Tempo (dias)]
- *Taxa de crescimento específico (TCE; %/dias)* = [(ln Peso final – ln Peso inicial)/Tempo (dias)] x 100
- *Taxa de conversão alimentar (FCR)* = Consumo de ração (g)/Ganho de peso (g)
- *Sobrevivência (S; %)* = [(população inicial – nº indivíduos mortos)/população inicial] x 100

4.5 AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO DOS PEIXES

Aos 30 e 60 dias realizou-se o registro fotográfico dos peixes, individualmente em fundo branco, por meio de um celular (Positivo® Q20, 13 MP), a fim de analisar posteriormente a coloração dos animais. O celular foi colocado em um suporte tipo tripé e posicionado a uma altura de 25 cm acima dos peixes, os quais foram iluminados com o auxílio de 4 lâmpadas fluorescentes compactas (18 W, 6.500K) dispostas nos dois lados da mesa. O registro fotográfico foi feito em ambiente controlado, sem efeito da luz natural, em um mini estúdio fotográfico caseiro com fundo branco e em ambiente fechado com lona do tipo blecaute (YASIR e QIN, 2009).

Para a análise de coloração da pele, as fotos foram analisadas em software de colorimetria digital (versão 1.6.6.5, Research Lab Tools, São Paulo, Brasil) (RAVINDRANATH et al., 2018; LIZANA, MENDOZA e PERALES, 2020; QURESHI et al., 2020; QUARTAROLLI, SILVEIRA e TOMA, 2021; SIRISATHITKUL e KAEWAREELAP, 2021) para obtenção dos parâmetros do sistema CIELab (CIE, 1986), que permite especificar as cores em um espaço tridimensional (Figura 3), onde L*, que representa a luminosidade entre claro e escuro (variando valores entre 0 e 100); a* - valores positivos = vermelho e negativos = verde; b* - valores positivos = amarelo e negativos = azul. As coordenadas a* e b* também apontam saturação da cor (valores menores, aproximando de zero, cores neutras e valores maiores mais saturadas). Para evitar e corrigir o efeito do fundo branco nas fotografias foi

realizado as médias dos parâmetros CIELab do fundo branco e esse descontado dos resultados encontrados nas fotografias dos peixes, da seguinte forma:

$$\Delta L^* = L^* - L^*_0$$

$$\Delta a^* = a^* - a^*_0$$

$$\Delta b^* = b^* - b^*_0$$

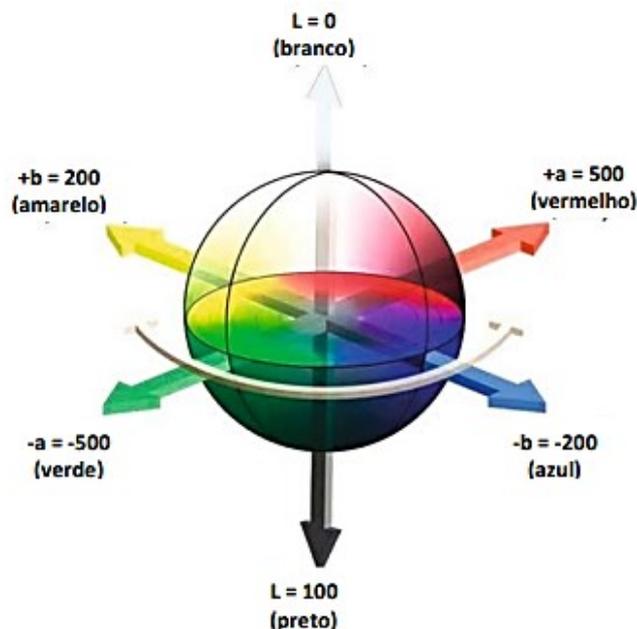
Onde:

L^* , a^* e b^* = valores encontrados nos peixes;

L^*_0 , a^*_0 e b^*_0 = valores encontrados no fundo branco;

ΔL^* , Δa^* e Δb^* = valores finais dos parâmetros sem influência do fundo branco.

Figura 3 - Representação tridimensional do sistema CIELab



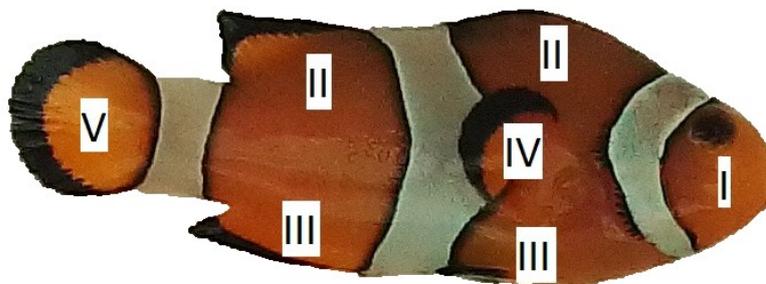
* L = varia entre 0 e 100; a^* e b^* = não apresentam limites numéricos

Fonte: SINGH, PARWATE e SHUKLA, 2009.

Para a obtenção dos dados foi realizada a divisão do corpo dos peixes em cinco pontos de análise (Figura 4), sendo: I – região da cabeça, II – região dorsal, III – região ventral, IV –

nadadeira peitoral e V – nadadeira caudal e corpo inteiro (CI), calculado a partir das médias das regiões anteriores.

Figura 4 - Pontos das regiões corporais do *Amphiprion ocellaris* escolhidas para medição da coloração



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A análise estatística dos dados zootécnicos e da coloração com distribuição paramétrica foram analisadas usando análise de variância unidirecional (*one-way* ANOVA) e as diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$) determinadas usando o teste post-hoc de Tukey. Os dados não paramétricos foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis e as diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$) determinadas usando o teste post-hoc de Dunn.

Os dados foram analisados separadamente do dia 0 ao dia 30, e novamente do dia 0 ao dia 60 de cultivo, sendo apresentados como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Os resultados de desempenho zootécnico de 0 a 30 e de 0 a 60 dias estão apresentados na Tabela 5 e Figuras 5 e 6.

Não houve diferença estatística para a sobrevivência aos 30 dias e 60 dias de experimento ($p > 0,05$). Em 30 dias, a sobrevivência variou de 86,67% (DCAG) até 93,33% (DCT e DCA). Já aos 60 dias, ela variou de 71,10% (DCT) até 82,20% (DCAG). Mortalidades começaram a ser observadas por volta do 20º dia de experimento, devido a brigas e animais machucados e isolados.

Aos 30 dias, os valores das variáveis coeficiente de variação do comprimento, ganho de peso, ganho de peso médio diário (GMD), taxa de crescimento específico (TCE), e conversão alimentar (FCR) não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 4). Já o peso dos indivíduos do tratamento DAG foi maior quando comparado aos demais tratamentos (Figura 5). O comprimento dos indivíduos foi maior nos tratamentos DAG e DCAG, mas somente quando comparado ao controle (Figura 6). O coeficiente de variação de peso do tratamento DCAG foi menor, mas somente se comparado ao controle (DCT) e ao tratamento DCA (Tabela 5).

Aos 60 dias, dados do peso, comprimento, coeficiente de variação do comprimento, ganho de peso, ganho de peso médio diário (GMD), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de conversão alimentar (FCR) não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Assim como aos 30 dias, o coeficiente de variação de peso foi menor no tratamento DCAG e maior no tratamento DCA ($p < 0,05$), sendo 1,5 vezes maior neste último tratamento em relação ao DCAG.

Tabela 5 - Desempenho zootécnico aos 30 e 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

	0-30 dias					0-60 dias				
	DCT	DAG	DCA	DCAG	P-Valor	DCT	DAG	DCA	DCAG	P-Valor
Sobrevivência (%)	93,3 ± 6,7	91,1 ± 10,2	93,3 ± 11,5	86,7 ± 11,5	0,719	71,1 ± 10,2	80,0 ± 13,3	82,2 ± 13,9	75,6 ± 13,9	0,732
C.V. Peso (%/dias)	34,1 ± 0,9 ^a	31,9 ± 1,8 ^{ab}	35,2 ± 4,6 ^a	26,6 ± 4,7 ^b	0,057	34,0 ± 2,8 ^{ab}	31,6 ± 1,7 ^{ab}	37,7 ± 7,2 ^b	25,3 ± 3,7 ^a	0,026
C.V. Comprimento (%/dias)	11,5 ± 1,0	10,3 ± 1,3	10,6 ± 2,7	9,1 ± 2,5	0,542	11,1 ± 0,6	11,2 ± 0,4	11,6 ± 2,7	8,9 ± 1,3	0,249
Ganho de peso (g)	0,26 ± 0,06	0,33 ± 0,17	0,31 ± 0,04	0,18 ± 0,08	0,290	0,50 ± 0,14	0,48 ± 0,21	0,50 ± 0,13	0,34 ± 0,12	0,579
GMD (g/dias)	0,009±0,002	0,011±0,006	0,010±0,001	0,006±0,003	0,370	0,017±0,005	0,016±0,006	0,017±0,005	0,011±0,004	0,548
TCE (%/dias)	0,70 ± 0,2	0,81 ± 0,46	0,75 ± 0,16	0,47 ± 0,16	0,473	1,21 ± 0,33	1,11 ± 0,53	1,16 ± 0,20	0,76 ± 0,24	0,419
FCR	1,68 ± 0,22	2,31 ± 1,07	2,28 ± 0,33	3,81 ± 1,41	0,095	1,69 ± 0,56	2,01 ± 0,85	1,81 ± 0,52	2,68 ± 1,38	0,557

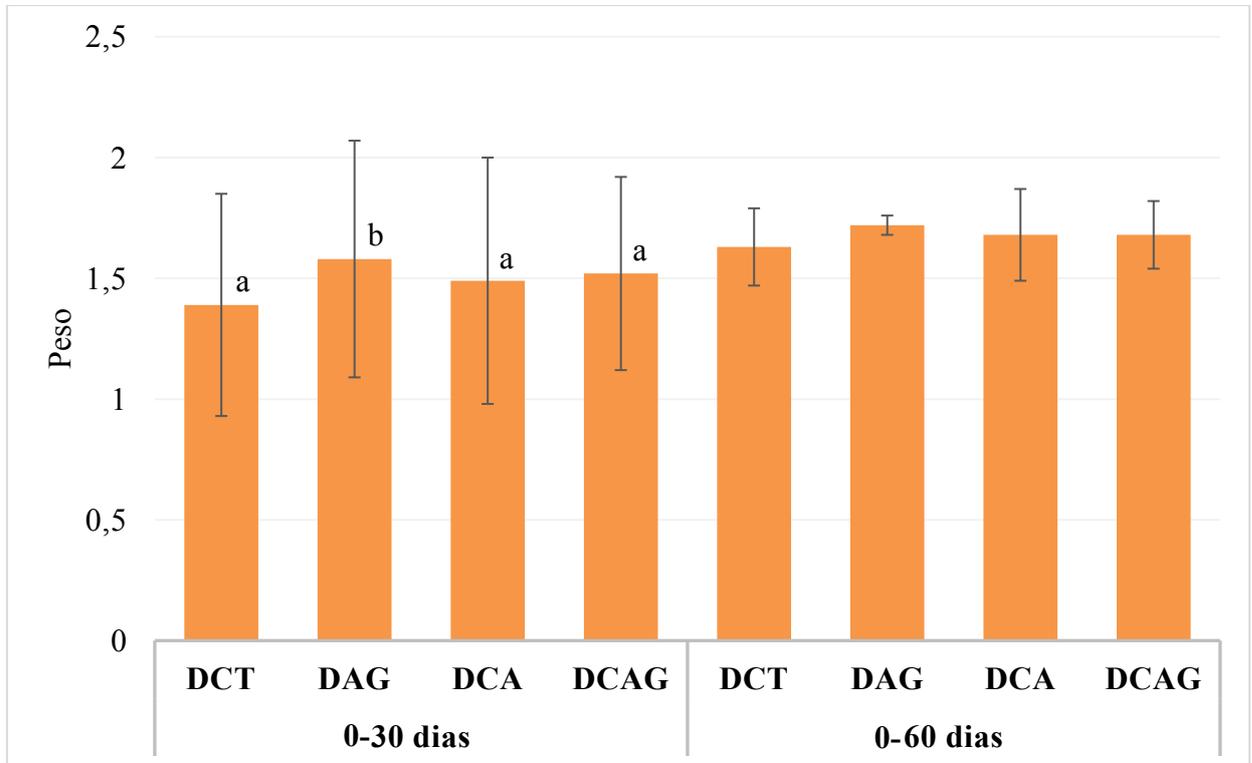
Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05).

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

* C.V. (Coeficiente de Variação); GMD (Ganho de peso Médio Diário); TCE (Taxa de Crescimento Específico); FCR (Taxa de Conversão Alimentar).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 5 - Peso aos 30 e 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

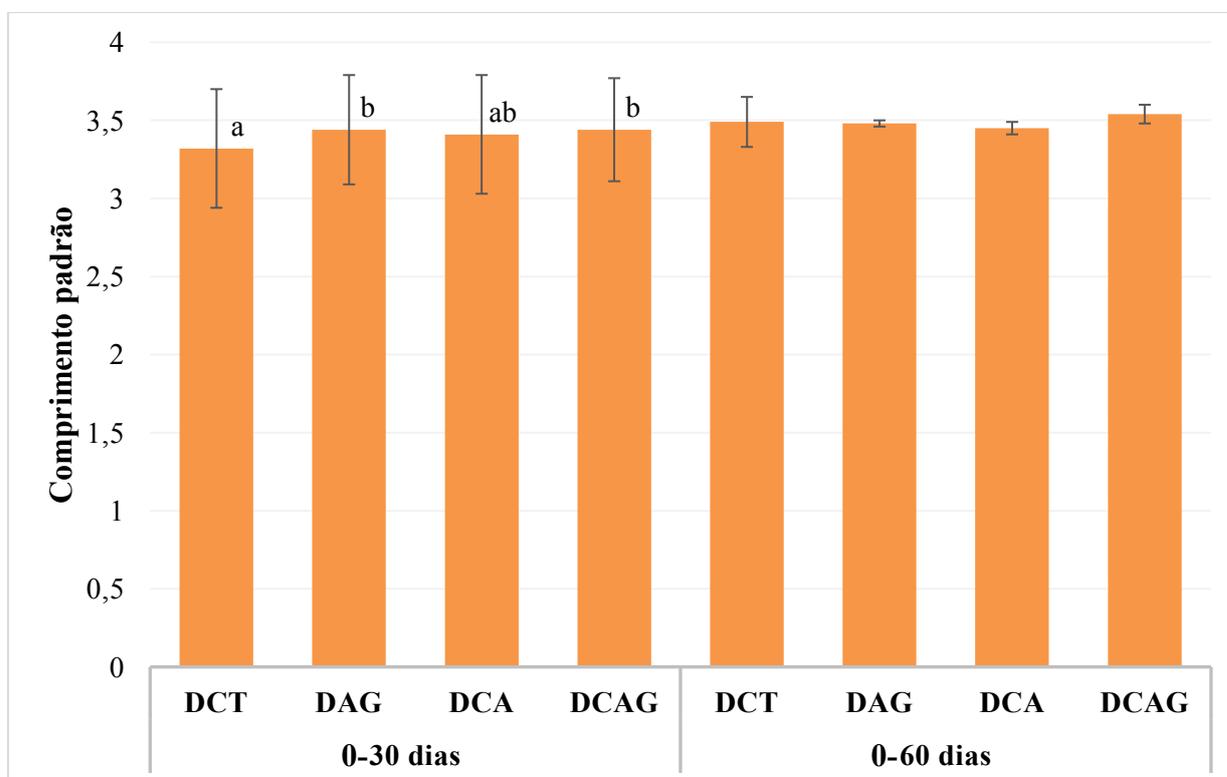


Barras verticais indicam desvio padrão. Letras diferentes entre tratamentos no mesmo período indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 6 - Comprimento padrão aos 30 e 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana*.



Barras verticais indicam desvio padrão. Letras diferentes entre tratamentos no mesmo período indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.2 COLORAÇÃO DOS PEIXES

Os resultados da coloração aos 30 dias e 60 dias estão apresentados nas Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente.

Tabela 6 - Coloração aos 30 dias de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

Cabeça					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	40,4 ± 4,27 ^a	40,1 ± 4,59 ^{ab}	42,1 ± 3,42 ^a	37,7 ± 4,42 ^b	< 0,001
a*	20,6 ± 2,72 ^a	21,8 ± 3,90 ^a	21,8 ± 3,98 ^a	24,5 ± 4,24 ^b	< 0,001
b*	29,9 ± 4,70 ^a	28,4 ± 6,13 ^a	32,8 ± 4,28 ^b	30,2 ± 6,26 ^a	< 0,001
Dorso					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	14,9 ± 3,28 ^a	16,0 ± 3,97 ^a	19,3 ± 5,56 ^b	14,8 ± 3,19 ^a	0,001
a*	-0,9 ± 5,66 ^a	-1,2 ± 5,57 ^a	1,7 ± 5,95 ^b	-0,3 ± 6,31 ^a	0,059
b*	8,2 ± 10,91	5,1 ± 10,99	9,2 ± 10,77	8,3 ± 12,13	0,351
Ventre					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	29,8 ± 4,88 ^{ab}	29,9 ± 5,37 ^{ab}	32,3 ± 5,35 ^b	28,3 ± 4,19 ^a	0,005
a*	14,0 ± 6,85	15,5 ± 7,07	17,3 ± 6,45	16,0 ± 6,86	0,168
b*	16,3 ± 6,77 ^a	17,2 ± 7,14 ^a	22,3 ± 6,55 ^b	20,0 ± 8,50 ^{ab}	< 0,001
Nadadeira Peitoral					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	24,1 ± 7,38 ^{ac}	26,5 ± 8,68 ^{ab}	28,6 ± 8,49 ^b	22,1 ± 8,04 ^c	0,003
a*	10,8 ± 11,09	12,9 ± 11,86	14,2 ± 10,58	11,5 ± 11,93	0,583
b*	10,2 ± 10,79 ^a	11,7 ± 11,83 ^{ab}	18,1 ± 8,92 ^c	14,7 ± 15,40 ^{bc}	0,019
Nadadeira Caudal					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	27,6 ± 10,92 ^{ab}	29,4 ± 10,69 ^a	33,9 ± 12,27 ^c	25,3 ± 10,11 ^b	0,009
a*	6,1 ± 8,24	6,4 ± 8,82	9,8 ± 7,91	7,8 ± 10,28	0,173
b*	16,2 ± 12,48 ^a	14,5 ± 13,18 ^a	22,6 ± 13,47 ^b	15,6 ± 13,64 ^a	0,036

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05).

* L (luminosidade, entre claro e escuro); a* (valores positivos = vermelho e negativos = verde); b* (valores positivos = amarelo e negativos = azul); a* e b* também representam saturação da coloração.

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 7 - Coloração aos 60 dias de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

Cabeça					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	38,9 ± 4,10	38,5 ± 3,94	37,7 ± 4,43	38,2 ± 3,00	0,690
a*	13,6 ± 4,33 ^a	17,2 ± 5,15 ^b	16,7 ± 4,99 ^b	16,3 ± 3,99 ^{ab}	0,008
b*	21,9 ± 4,96 ^a	24,5 ± 5,90 ^b	26,1 ± 5,19 ^b	24,4 ± 6,31 ^b	0,018
Dorso					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	15,6 ± 6,26 ^a	18,8 ± 4,88 ^{ab}	19,9 ± 5,08 ^b	18,3 ± 5,03 ^{ab}	0,013
a*	0,01 ± 5,70 ^a	3,2 ± 6,85 ^b	3,9 ± 6,10 ^b	0,6 ± 5,50 ^a	0,019
b*	8,1 ± 11,78	8,5 ± 11,02	11,0 ± 9,37	5,8 ± 8,22	0,267
Ventre					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	28,4 ± 4,92	28,8 ± 4,99	29,3 ± 5,66	28,0 ± 5,59	0,669
a*	11,0 ± 6,83 ^a	15,1 ± 8,13 ^{ab}	16,7 ± 6,69 ^b	13,3 ± 6,28 ^{ab}	0,006
b*	9,7 ± 5,75 ^a	12,0 ± 7,97 ^{ab}	14,6 ± 7,62 ^b	11,0 ± 7,00 ^{ab}	0,034
Nadadeira Peitoral					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	24,5 ± 8,33	25,8 ± 8,02	27,5 ± 9,08	24,2 ± 8,72	0,219
a*	10,0 ± 11,20	14,1 ± 12,72	10,9 ± 10,86	11,5 ± 11,54	0,233
b*	21,3 ± 11,76	24,6 ± 11,88	26,6 ± 12,41	23,9 ± 11,94	0,352
Nadadeira Caudal					
	DCT	DAG	DCA	DCAG	p-Valor
L	25,5 ± 10,46 ^a	30,8 ± 8,82 ^{ab}	34,2 ± 11,71 ^b	27,0 ± 11,47 ^a	0,003
a*	4,1 ± 8,50 ^a	8,7 ± 10,10 ^{bc}	10,5 ± 7,95 ^b	5,6 ± 8,39 ^{ac}	0,007
b*	10,5 ± 14,47 ^a	12,4 ± 12,68 ^a	22,5 ± 11,37 ^b	14,3 ± 14,15 ^a	0,001

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05).

* L (luminosidade, entre claro e escuro); a* (valores positivos = vermelho e negativos = verde); b* (valores positivos = amarelo e negativos = azul); a* e b* também representam saturação da coloração.

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Aos 30 dias, a coloração na região da cabeça apresentou diferença estatística nas três variáveis estudadas: L, a* e b*. O valor da variável L (intensidade de coloração) foi maior nos tratamentos DCA, DAG e Controle (DCT), se comparada com DCAG (p < 0,05). Já o valor da variável a* (valores positivos = vermelho e negativos = verde) foi maior no tratamento DCAG em relação aos demais tratamentos e o valor da variável b* (valores positivos = amarelo e negativos = azul) maior no tratamento DCA se comparada aos demais tratamentos.

Na região dorsal o tratamento DCA apresentou maiores valores de L e a* em relação aos demais tratamentos (p < 0,05).

Na região ventral foi observada diferença estatística nos valores dos parâmetros L, onde o tratamento DCA apresentou maior valor somente em relação ao DCAG, e b*, onde apenas o tratamento DCA apresentou o maior valor em relação ao DCT e DAG.

Na região da nadadeira peitoral ocorreu diferença estatística nos valores das variáveis L, onde o tratamento DCA apresentou maior média, em relação ao tratamento controle e DCAG, e em b*, o tratamento DCA teve maior valor quando comparado ao tratamento controle e DAG.

Na região caudal, o tratamento DCA apresentou maior média para o parâmetro L e b*, se comparado aos demais tratamentos ($p < 0,05$).

Já aos 60 dias, a coloração na região da cabeça apresentou diferença estatística dos valores das variáveis a*, onde os tratamentos DCA e DAG apresentaram maiores valores somente em relação ao tratamento controle (DCT), e b*, onde todos os tratamentos mostraram resultados maiores e distintos da dieta DCT ($p < 0,05$).

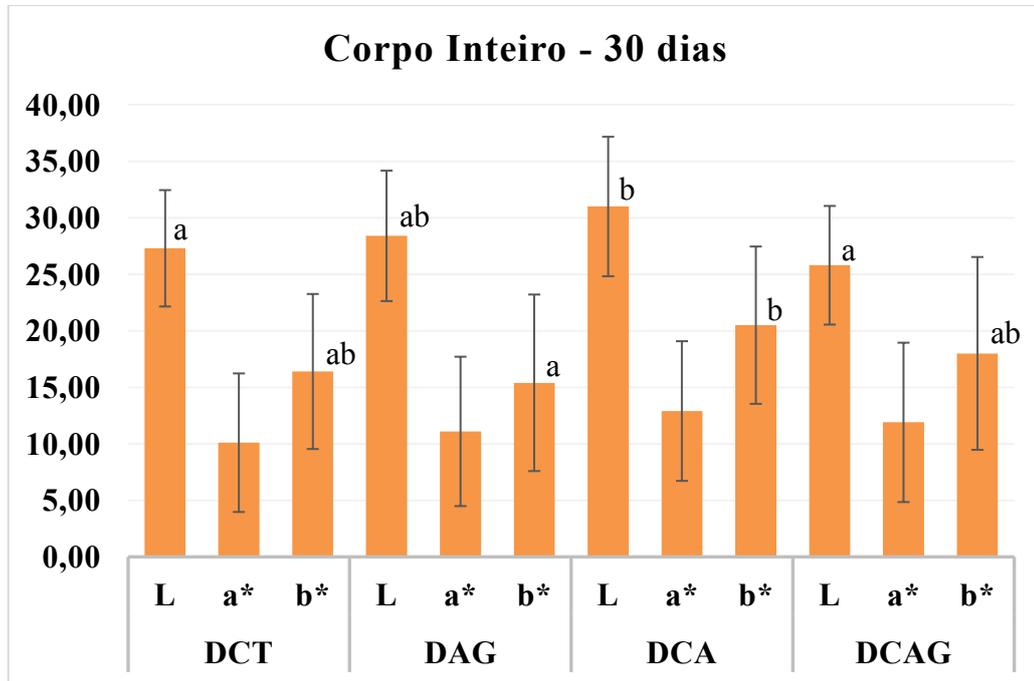
Na região dorsal o tratamento DCA apresentou maior valor somente em comparação ao tratamento controle para o parâmetro L, e os tratamentos DAG e DCA apresentaram valores maiores para a variável a*, em relação aos demais tratamentos.

Na região ventral, a coloração apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) e maiores em valor para os parâmetros a* e b* na dieta DCA, comparada às demais dietas.

Na região da nadadeira peitoral não ocorreram diferenças estatísticas nos parâmetros estudados ($p > 0,05$) e na região caudal, o tratamento DCA apresentou maior média para o parâmetro L; os tratamentos DAG e DCA apresentaram maiores médias para o parâmetro a* em relação ao DCT, e o tratamento DCA apresentou maior valor em relação aos demais tratamentos para b*.

O corpo inteiro, demonstra, de forma geral, a tendência dos valores obtidos para cada variável em cada região dos diferentes tratamentos. Aos 30 dias, para a variável L, o tratamento DCA apresentou maior valor comparado com DCT e DCAG, e para b*, DCA foi maior em valor comparado somente com DAG ($p < 0,05$) (Figura 7). Já aos 60 dias, novamente o tratamento DCA apresentou maior valor para as variáveis a* e b* (Figura 8), especialmente comparado ao tratamento controle DCT ($p < 0,05$).

Figura 7 - Média \pm DP das variáveis L, a* e b* do corpo inteiro de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga (*Nannochloropsis gaditana*) aos 30 dias de cultivo.



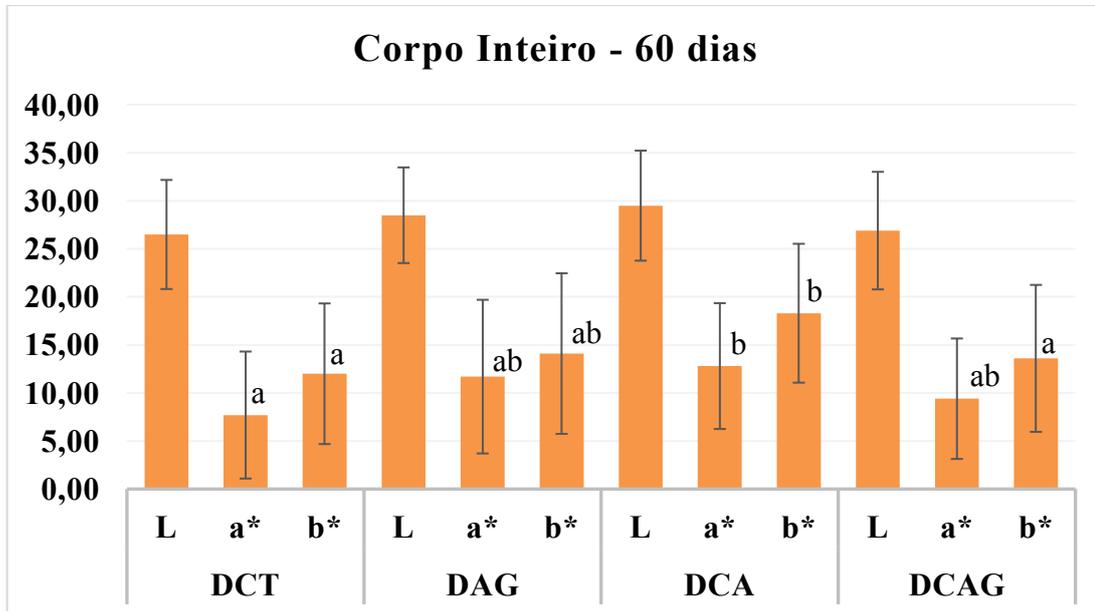
Barras verticais indicam desvio padrão. Letras diferentes na mesma variável nos diferentes tratamentos indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Variáveis: * L (luminosidade, entre claro e escuro); a* (valores positivos = vermelho e negativos = verde); b* (valores positivos = amarelo e negativos = azul); a* e b* também representam saturação da coloração.

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 8 - Média \pm DP das variáveis L, a* e b* do corpo inteiro de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga (*Nannochloropsis gaditana*) aos 60 dias de cultivo.



Barras verticais indicam desvio padrão. Letras diferentes na mesma variável nos diferentes tratamentos indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

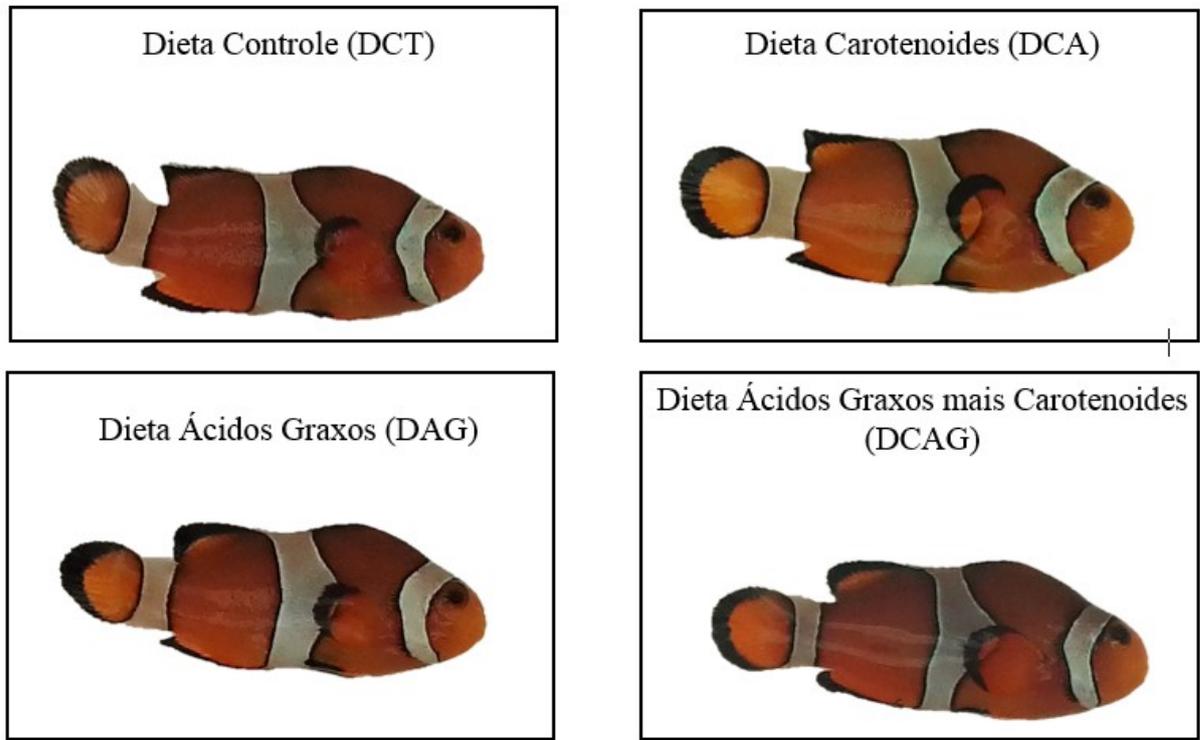
Variáveis: * L (luminosidade, entre claro e escuro); a* (valores positivos = vermelho e negativos = verde); b* (valores positivos = amarelo e negativos = azul); a* e b* também representam saturação da coloração.

* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De forma ilustrativa, a Figura 9 traz exemplares de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) aos 60 dias de experimento de cada tratamento estudado.

Figura 9 - Exemplos de juvenis de peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados com extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga (*Nannochloropsis gaditana*) aos 60 dias de cultivo.



* DCT (Dieta Controle, sem adição de extrato de microalgas); DAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos); DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides); DCAG (2% de inclusão do extrato com ácidos graxos e 2% de inclusão do extrato com carotenoides).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6 DISCUSSÃO

A sobrevivência ao final dos 60 dias de cultivo variou de 71,10% a 82,20%. A pouca mortalidade observada que começou por volta do 20º dia de experimento, possivelmente ocorreu devido ao comportamento agonístico por parte de peixes maiores em relação aos menores (BUSTON, 2003).

Em relação ao desempenho zootécnico, somente os resultados de peso, coeficiente de variação (C. V.) de peso e comprimento padrão foram diferentes aos 30 dias, sendo o valor em peso maior na dieta com 2% de inclusão do extrato de ácidos graxos (DAG), menor C.V. de peso na dieta com 2% de inclusão dos extratos de ácidos graxos e carotenoides (DCAG) em relação aos demais tratamentos e maior comprimento padrão nos tratamentos DAG, DCA (2% de inclusão do extrato de carotenoides) e DCAG em relação ao tratamento controle (DCT). Neste caso, o extrato de ácidos graxos derivados da microalga pode ter influenciado na obtenção desses resultados visto que as dietas DAG, DCA e DCAG possuem níveis ligeiramente mais elevados de ácido graxo eicosapentaenoico (EPA) e ácido araquidônico (ARA) em relação ao DCT, os quais são essenciais para o crescimento e ganho de peso (OLIVOTTO et al., 2011; MEJRI et al., 2021) e que pode ter influenciado positivamente nos primeiros 30 dias de cultivo; além de maior relação EPA/DHA (DAG - 1:1, DCA - 0,6:1 e DCAG - 1,2:1) das dietas tratamento em relação ao DCT (0,4:1), onde um estudo com Dourada (*Sparus aurata*) mostrou que os peixes alimentados com uma dieta com maior relação EPA/DHA (2:1) melhorou o crescimento dos animais quando comparados com os animais alimentados com relações menores, 1:1 e 1:2 (IBEAS et al., 1997).

Aos 60 dias, somente C.V. de peso foi maior em DCA quando comparado ao DCAG ($p < 0,05$). Resultados de C.V. de peso demonstram uma tendência a um ganho de peso menos homogêneo nos peixes que receberam a dieta DCA, e mais homogeneidade em peso em termos numéricos na DCAG. Esse crescimento mais homogêneo na dieta DCAG pode ter sido influenciado pelos maiores níveis de EPA e ARA, ácidos graxos vitais para o crescimento dos peixes marinhos (MEJRI et al., 2021), além da maior relação EPA/DHA presente nesta dieta, ácidos graxos vitais para o crescimento dos peixes marinhos (IBEAS et al., 1997; SARGENT et al., 1999).

A conversão alimentar (FCR) não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, mesmo aos 30 ou 60 dias, no entanto, apresentou uma tendência de valores maiores no tratamento DCAG, o que pode demonstrar um maior consumo de ração. Essas observações são importantes para a produção de *A. ocellaris*, pois podem ser decisivas na escolha da dieta se for levado em consideração a questão econômica.

Para os demais parâmetros, as diferentes dietas não afetaram de forma significativa o desempenho zootécnico dos peixes. Sales et al. (2021b) ao estudar a inclusão dos mesmos extratos de *N. gaditana* utilizados nesse trabalho também não encontrou resultados significativos no desempenho zootécnico do pargo europeu (*Sparus aurata*), alimentados com as dietas durante 39 dias.

A pequena diferença dos níveis de EPA e DHA nas dietas aqui utilizadas podem ter influenciado o desempenho zootécnico nos 30 dias devido aos animais mais jovens possuírem uma taxa de crescimento mais rápida e serem mais sensíveis à inclusão de ácidos graxos (CALADO et al., 2017; MEJRI et al., 2021), no entanto, ao decorrer do tempo já não se observou uma diferença significativa nos resultados. Esse crescimento mais rápido no início do cultivo pode ser interessante para os produtores de peixes ornamentais, que podem ter animais atingindo o tamanho e peso de venda de forma mais acelerada.

Portanto, os resultados do presente trabalho mostram que o desempenho zootécnico após dois meses de cultivo não foi afetado com a substituição parcial do óleo de peixe pelos extratos de ácidos graxos e de carotenoides da microalga (*Nannochloropsis gaditana*), validando sua utilização sem perdas produtivas. Todas as dietas aqui estudadas possuem níveis de EPA e DHA maiores que o indicado para peixes marinhos (0,5 a 2,0%) (CALADO et al., 2017) o que pode explicar essa não diferença no desempenho zootécnico dos peixes após 60 dias de cultivo, dado que todas as dietas possivelmente supriram as necessidades de ácidos graxos altamente insaturados, importantes para o crescimento dos animais.

Em relação à coloração, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo foi observado que a inclusão dos extratos de microalgas nas rações foi eficaz na mudança de coloração dos juvenis de *A. ocellaris*, resultado semelhante ao encontrado por Güroy et al. (2022) que evidenciaram uma maior intensidade na coloração de peixes-palhaço *A. ocellaris* ao adicionar a microalga *Spirulina* na dieta dos animais durante 90 dias.

Aos 30 dias de experimento, resultados de intensidade da coloração (L) e b* (coloração amarelada) foram maiores para o tratamento DCA nas regiões da cabeça, ventre, nadadeira peitoral e nadadeira caudal. A região dorsal foi a única região a apresentar valores negativos para a* (coloração verde) nas dietas DCT, DAG e DCAG, provavelmente resultado das clorofilas presentes no extrato de microalga (SALES et al., 2021b).

O valor médio do corpo inteiro dos peixes mostrou que os tratamentos DCA e DAG apresentaram coloração mais intensa (L), bem como mais amarelada (b*) nos tratamentos DCA, DCAG e DCT.

Diante disso, é possível notar que os resultados obtidos para a coloração aos 30 dias não foram muito claros, mas de forma geral o tratamento DCA se sobressaiu diante os demais tratamentos, especialmente em termos de cores mais intensas (parâmetro L).

Já aos 60 dias de experimento, os resultados demonstraram um aumento da intensidade da coloração (L) no dorso e nadadeira caudal, e aumento das cores mais amareladas (b*) e avermelhadas (a*) nas regiões da cabeça, ventre e nadadeira caudal dos peixes alimentados com a dieta DCA. A média do corpo inteiro dos peixes nesta data também mostrou que o tratamento DCA melhorou a coloração dos peixes, deixando-a mais vermelha (a*) e amarelada (b*), especialmente se comparada ao controle, entretanto, sem diferenças para a intensidade luminosa (L). Yasir e Qin (2009) observaram, ao estudar a coloração de peixe-palhaço (*A. ocellaris*) durante 5 semanas, que quanto menor a intensidade luminosa (L), mais viva era a coloração (a* e b*) dos peixes. Sales et al. (2021b) ao estudarem a inclusão dos mesmos extratos de *N. gaditana* utilizados nesse trabalho, durante 39 dias, também observaram que a inclusão dos extratos da microalga deixou a coloração da pele de *S. aurata* mais amarelada (b*).

Resultados similares também foram encontrados pelos autores Kouba et al. (2013) e Berchielli-Morais, Fernandes e Sipaúba-Tavares (2016) que obtiveram maiores valores de a* (avermelhado) e b* (amarelado) em peixes Acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*), utilizando microalga (*Haematococcus pluvialis*) por 28 dias, e em peixes Tetra-serpae (*Hyphessobrycon eques*), utilizando microalgas (*Ankistrodesmus gracilis* e *Haematococcus pluvialis*) por 45 dias, respectivamente. Gouveia et al. (2003) também encontraram nas Carpas Koi (*Cyprinus carpio*) tonalidades mais avermelhadas (a*) e no Kinguio (*Carassius auratus*) tonalidades mais avermelhadas (a*) e amareladas (b*) quando utilizado biomassa de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* e *Spirulina*) nas dietas durante 70 dias de experimento.

Outro estudo com peixe ornamental de água doce, Ciclídeo acei (*Pseudotropheus acei*) encontrou maiores valores para a variável a^* quando adicionado Spirulina na dieta dos animais durante 90 dias (GÜROY et al., 2012). Diante da literatura exposta, o presente trabalho se destaca pelos resultados encontrados de maiores valores de L (intensidade da coloração) nas regiões dorsais e nadadeira caudal com as dietas DAG e DCA.

No presente estudo, o aumento das colorações avermelhadas e amareladas no tratamento DCA refletiu diretamente o aumento de pigmentos (2% de inclusão do extrato de carotenoides da microalga *N. gaditana*) lipossolúveis responsáveis pelas cores laranjas, amarela e vermelha na dieta. Esse resultado era esperado, visto que a utilização de carotenoides já é amplamente utilizada para enriquecer a coloração dos organismos aquáticos (GOUVEIA et al., 2008; CALADO et al., 2017). Deve-se ressaltar que, os resultados positivos da coloração são interessantes uma vez que o mercado de peixes ornamentais preza pela qualidade e variedade da coloração, muito mais do que pelo desempenho zootécnico (CALADO et al., 2017; LUO et al., 2021). Além disso, a inclusão de carotenoides nas dietas pode trazer outros benefícios como ação antioxidante, melhora do sistema imune, deixando os peixes menos suscetíveis às doenças, e maior resistência ao estresse (NIU et al., 2011; SCABINI et al., 2011; VILCHEZ et al., 2011; CARVALHO e CARAMUJO, 2017; GORA et al., 2019; SATHASIVAM et al., 2019).

Trabalhos futuros devem ser realizados para avaliar se as inclusões destes extratos afetam outros aspectos produtivos do peixe-palhaço, como sanidade e resistência ao estresse.

7 CONCLUSÃO

A inclusão dos extratos de carotenoides e ácidos graxos provenientes da microalga *Nannochloropsis gaditana* nas rações ofertadas para juvenis do peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*), aumentou o peso, especialmente com a dieta DAG, e o comprimento dos peixes, especialmente com as dietas DAG, DCA e DCAG, no período de 0 a 30 dias de experimento.

Já no período de 0 a 60 dias de experimento não observou-se diferenças significativas nos parâmetros de desempenho zootécnico, demonstrando que a substituição do óleo de peixe pelos extratos de microalgas não acarreta em perdas produtivas.

Em relação a coloração, no período de 0 a 30 dias, de forma geral, a melhor pigmentação dos peixes foi obtida no tratamento com a inclusão do extrato de carotenoides (DCA) da microalga *N. gaditana*, especialmente comparado ao controle.

Ao final do experimento (60 dias) ficou demonstrado que os animais do DCA foram os que obtiveram coloração mais próxima do vermelho e do amarelo, com cores mais vivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENDIKSEN, E. A. et al. Sustainable aquafeeds: Progress towards reduced reliance upon marine ingredients in diets for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, n. 314, p. 132-139, 2011.
- BERCHIELLI-MORAIS, F. A., FERNANDES, J. B. K., SIPAUBA-TAVARES, L. H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration of ornamental fish *Hyphessobrycon eques* (Steindacher 1882). **Aquaculture Research**, n. 47, p. 3061-3069, 2016.
- BOROWITZKA, M.A. High-value products from microalgae — their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, n. 25, p. 743–756, 2013.
- BUSTON, P. M. Social hierarchies: size and growth modification in clownfish. **Nature**, v. 424, n. 6945, p. 145, 2003.
- CALADO, R., OLIVOTTO, I., OLIVER, M. P., & HOLT, G. J. **Marine Ornamental Species Aquaculture**. 712 p., 2017.
- CARVALHO, C. C. C. R., CARAMUJO, M. J. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health. **Frontiers in Marine Science**, 4(93), p. 1-14, 2017.
- CERÓN-GARCÍA, M. C. et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, n. 257, p. 316-324, 2018a.
- CERÓN-GARCÍA, M. C. et al. Preparative Recovery of Carotenoids from Microalgal Biomass. **Methods Molecular Biology**, n. 1852, p. 107-115, 2018b.
- CIE, Colorimetry. In: Commission Internationale de l’Eclairage 15.2, CIE pub, Vienna, 1986.
- CLELAND, L. G., JAMES, M. J., PROUDMAN, S. M. Fish oil: what the prescriber needs to know. **Arthritis Research & Therapy**, 8:202, 2005.
- DANIEL, N. et al. Application of carotenoids on coloration of aquatic animals. **International Journal of Fisheries and Aquatic Research**, 2:1-7, 2017.
- FAO. **ORNAMENTAL FISH. FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT**. ROME. 2005.
- FARIA, C. F. A. et al. Caracterização do mercado de aquicultura ornamental e aquariofilia no Rio Grande do Norte. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental - Florianópolis**, v. 8, n. 1, p.203-215, 2019.

FERREIRA, P. M. P. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. **Instituto Nacional de Recursos Biológicos – IPIMAR**, 2009. ISBN 978-972-9372-37-7.

GORA, A. H. et al. Effect of dietary supplementation of crude microalgal extracts on growth performance, survival and disease resistance of *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) larvae. *Indian Journal of Fisheries*, 66, p. 64-72, 2019.

GOUVEIA, L. et al. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. **Aquaculture Nutrition**, 9, 123-129, 2003.

GOUVEIA, L. et al. Microalgae in novel food product. In: PAPADOPOULOS, K. N. (Ed.), **Food Chemistry Research Developments**, Nova Science Publishers, p. 107, 2008.

GÜROY B. et al. Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. **Aquaculture International**, 20(5):869–878, 2012.

GÜROY, D. et al. Color intensity and growth performance of common clownfish (*Amphiprion ocellaris*) enhanced by dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*). **Aquaculture International**, 2022.

IBEAS, C. et al. Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPA/DHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, 150, p. 91-102, 1997.

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

KOUBA et al. Colour intensity in angelfish (*Pterophyllum scalare*) as influenced by dietary microalgae addition. **Journal of Applied Ichthyology**, 29, 193-199, 2013.

LIZANA, R. R., MENDOZA, O. Z., PERALES, C. V. Evaluation of Tarsus Pigmentation in Chickens Fed with Different Levels of Xanthophyll Pigment: A Practical Application of the CIELab System. **International Journal of Poultry Science**, v. 19. p. 265-269, 2020.

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M. et al. Assessment of multi-step processes for an integral use of the biomass of the marine microalga *Amphidinium carterae*. **Bioresource Technology**, n. 282, p. 370-377, 2019.

LUO M. et al. Fish pigmentation and coloration: molecular mechanisms and aquaculture perspectives. **Reviews in Aquaculture**, 13(4):2395–2412, 2021.

MEJRI, S. C. et al. Essential Fatty Acid Requirements in Tropical and Cold-Water Marine Fish Larvae and Juveniles. **Frontiers in Marine Science**, 8:680003, 2021.

MENDES, A. et al. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. **Journal of Applied Phycology**, n. 21, p. 199-214, 2009.

NANTHINI DEVI, K., AJITH KUMAR T. T., BALASUBRAMANIAN T. Pigment deficiency correction in captive clown fish, *Amphiprion ocellaris* using different carotenoid sources. **Journal of Fisheries Sciences**, 9(4):072-079, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. 2011.

NIU, J. et al. Carotenoids in aquaculture, an overview. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 2:44-58, 2011.

OLIVOTTO, I. et al. Advances in Breeding and rearing marine ornamentals. **Journal of the World Aquaculture Society**, 42, p. 135–166, 2011.

PEDRAZZANI, A. S., OSTRENSKY, N. A. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.769-776. 2014.. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12535>.

POUIL, S. et al. Aquaculture of marine ornamental fish: overview of the production trends and the role of academia in research progress. **Reviews in Aquaculture**, 12(2):1217–1230, 2020.

QUARTAROLLI, L. F., SILVEIRA, A. T., TOMA, H. E. Overcoming lithium analysis difficulties with a simple colorimetric/spectrophotometric method. **Analytical Methods**, 13, 3627–3631, 2021.

QURESHI, A. et al. CdSe/CdS/ZnS nanocrystals decorated with Fe₃O₄ nanoparticles for point-of-care optomagnetic detection of cancer biomarker in serum. **Sensors & Actuators: B. Chemical**. 321, 128431, 2020.

RAVINDRANATH, R. et al. Smart app-based on-field colorimetric quantification of mercury via analyte-induced enhancement of the photocatalytic activity of TiO₂–Au nanospheres. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 410:4555–4564, 2018.

RHYNE, A. L., et al. Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The Volume and Biodiversity of Fish Imported into the United States. **PLoS ONE** 7(5): e35808. 2012.

ROSAS, V. T. et al. Feasibility of the use of Spirulina in aquaculture diets. **Reviews in Aquaculture**, 11(4):1367–1378, 2019.

SAHANDI, J. Reproduction of Persian Gulf anemone fish (*Amphiprion clarkii*) in captive system. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation – International Journal of the Bioflux Society**, 4 (5):704–708, 2011.

SALES, R. O. et al. Processing *Nannochloropsis gaditana* biomass for the extraction of high value biocompounds. **Journal Of Applied Phycology**, 2021a.

- SALES, R. O. et al. Effects of dietary use of two lipid extracts from the microalga *Nannochloropsis gaditana* (Lúbian, 1982) alone and in combination on growth and muscle composition in juvenile gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Algal Research**, v. 53, p. 102162 2021b.
- SARGENT, J. et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, 179, p. 217–229, 1999.
- SATHASIVAM, R. et al. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. 26, p. 709-722, 2019.
- SCABINI, V. Reproductive performance of gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) fed two combined levels of carotenoids from paprika oleoresin and essential fatty acids. **Aquaculture Nutrition**, 17:304-312, 2011.
- SILVA JÚNIOR, R. F. et al. Substituição do óleo de peixe por óleo de soja em dietas para beijupirá (*Rachycentron canadum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.980-987, 2011.
- SINGH, B., PARWATE, D.V., SHUKLA, S.K. Radiosterilization of fluoroquinolones and cephaloporphins: assessment of radiation damage on antibiotics by changes in optical property and colorimetric parameters. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, vol.10, n.1, 2009.
- SIRISATHITKUL, Y., KAEWAREELAP, S. Color Analysis of Batik Fabric by Facile Smartphone Colorimetry. **International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**. Vol. 11, N. 11, 2021.
- TACON, A. G. J, METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, 285, p. 146-158, 2008.
- THORNHILL, D. J. Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade. **Defenders of Wildlife**, Washington, v. 187, p. 179, 2012.
- VILCHEZ, C. et al. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. **Marine Drugs Journal** 9:319-333, 2011.
- WABNITZ, C. et al. **From Ocean to Aquarium the global trade in marine ornamental species**. UNEP-WCMC, Cambridge, UK, 2003.
- WITTENRICH, M. L. **The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes**. Plaza, Neptune City, New Jersey, USA, p. 85.
- YASIR, I., QIN, J.G. Effect of light intensity on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier. **Journal of the World Aquaculture Society**, vol.40, n.3, 2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. **Mercado Pet Brasil**. 2021.

BENDIKSEN, E. A. et al. Sustainable aquafeeds: Progress towards reduced reliance upon marine ingredients in diets for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, n. 314, p. 132-139, 2011.

BERCHIELLI-MORAIS, F. A., FERNANDES, J. B. K., SIPAUBA-TAVARES, L. H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration of ornamental fish *Hypheosobrycon eques* (Steindacher 1882). **Aquaculture Research**, n. 47, p. 3061-3069, 2016.

BOROWITZKA, M.A. High-value products from microalgae — their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, n. 25, p. 743–756, 2013.

CALADO, R., OLIVOTTO, I., OLIVER, M. P., & HOLT, G. J. **Marine Ornamental Species Aquaculture**. 712 p., 2017.

CAVONIUS, L. R., ALBERS, E., UNDELAND, I. *In vitro* bioaccessibility of proteins and lipids of pH-shift processed *Nannochloropsis oculata* microalga. **Food Function**, v.7, 2016.

CLELAND, L. G., JAMES, M. J., PROUDMAN, S. M. Fish oil: what the prescriber needs to know. **Arthritis Research & Therapy**, 8:202, 2005.

DANIEL, N. et al. Application of carotenoids on coloration of aquatic animals. **International Journal of Fisheries and Aquatic Research**, 2:1-7, 2017.

DÍAZ-JIMÉNEZ, L. et al. The effect of two carotenoid sources, background colour and light spectrum on the body pigmentation of the clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture Research**, v. 52, p. 3052-3061, 2021.

EBENEEZAR S. et al. Evaluation of dietary oleoresins on the enhancement of skin coloration and growth in the marine ornamental clown fish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). **Aquaculture**, v. 529:735728, 2020.

FAO. **ORNAMENTAL FISH. FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT**. ROME. 2005.

FARIA, C. F. A. et al. Caracterização do mercado de aquicultura ornamental e aquariofilia no Rio Grande do Norte. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental** - Florianópolis, v. 8, n. 1, p.203-215, 2019.

FERREIRA, P. M. P. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. **Instituto Nacional de Recursos Biológicos – IPIMAR**, 2009. ISBN 978-972-9372-37-7.

- FRIES, G. M. et al. Urucum em dietas para alevinos de kinguios *Carassius auratus*: Desempenho produtivo e pigmentação da pele. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 3401-3414, 2014.
- GASPARINI, J. L. et al. Marine ornamental trade in Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 14, n. 12, p. 2883–2899, 2005.
- GÜROY, B. et al. Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. **Aquaculture International**, 20(5):869–878, 2012.
- GÜROY, D. et al. Color intensity and growth performance of common clownfish (*Amphiprion ocellaris*) enhanced by dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*). **Aquaculture International**, 2022.
- HADIJAH, JUNAIDI, M., LESTARI, D. P. Giving *Spirulina platensis* meal in feed to the brightness of clown fish (*Amphiprion ocellaris*). **Jurnal Perikanan**, v. 10, n. 1, 2020.
- HALILOGLU, H.I. et al. Comparisons of fatty acid composition in some tissues of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. **Food Chemistry**, v.86, p.55-59, 2003.
- HAMRE, K. et al. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. **Reviews in Aquaculture**, 5, p. S26–S58, 2013.
- KALINOWSKI, C. T. et al. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. **Aquaculture**, 244:223–231, 2005.
- KODAMA, G. et al. Viabilidade econômica do cultivo de peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, n.1, p. 61 – 72, 2011.
- LIM, K. C. et al. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, 10, p. 738-773, 2018.
- LILI, W. et al. Effect of Spirulina flour on changes of color intensity in angelfish (*Pterophyllum scalare*) strain three color. **Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research**, v. 11(2), p. 52–58, 2021.
- LUO M. et al. Fish pigmentation and coloration: molecular mechanisms and aquaculture perspectives. **Reviews in Aquaculture**, 13(4):2395–2412, 2021.
- MAHALWAR, P. et al. Local reorganization of xanthopores, fine tannings and colors the striped pattern of zebrafish. **Science**, 345(6202):1362-1364, 2014.
- MENDES, A. et al. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. **Journal of Applied Phycology**, n. 21, p. 199-214, 2009.

- MEJRI, S. C. et al. Essential Fatty Acid Requirements in Tropical and Cold-Water Marine Fish Larvae and Juveniles. **Frontiers in Marine Sciences**, v. 8, 2021.
- MILLER, M. R., NICHOLS, P. D., CARTER, C. G. n-3 Oil sources for use in aquaculture – alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. **Nutrition Research Reviews**, 21, p. 85-96, 2008.
- MOHAMMADIAZARM, H., Effects of spirulina powder (*Spirulina platensis*) as a dietary additive on Oscar fish, *Astronotus ocellatus*: assessing growth performance, body composition, digestive enzyme activity, immune-biochemical parameters, blood indices and total pigmentation. **Aquaculture Nutrition**, v. 27(1), p. 252–260, 2021.
- NANTHINI DEVI, K., AJITH KUMAR T. T., BALASUBRAMANIAN T. Pigment deficiency correction in captive clown fish, *Amphiprion ocellaris* using different carotenoid sources. **Journal of Fisheries Sciences**, 9(4):072-079, 2015.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. 2011.
- NHAN, H. et al. Effects of natural dietary carotenoids on skin coloration of false Clownfish (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830). **Aquaculture nutrition**, 25, p. 662-668, 2019.
- NIU, J. et al. Carotenoids in aquaculture, an overview. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 2:44-58, 2011.
- PALMTAG, M. R. **The marine ornamental species trade**. Marine ornamental species aquaculture, p. 3–14, 2017.
- POUIL, S. et al. Aquaculture of marine ornamental fish: overview of the production trends and the role of academia in research progress. **Reviews in Aquaculture**, 12(2):1217–1230, 2020.
- PRICE, A. C. et al. Pigments, patterns, and fish behavior. **Zebrafish**, 5(4):297-307, 2008.
- RAJA, K. et al. Present and future market trends of indian ornamental fish sector. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, 7(2): 06-15, 2019.
- RAMAMOORTHY, K. et al. Proximate composition and carotenoid content of natural carotenoid sources and its colour enhancement on marine ornamental fish *Amphiprion ocellaris* (Cuveir, 1880). **World Journal of Fish and Marine Sciences**, 2(6):545–550, 2010.
- RHYNE, A. L., et al. Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The Volume and Biodiversity of Fish Imported into the United States. **PLoS ONE** 7(5): e35808. 2012.
- ROSAS, V. T. et al. Feasibility of the use of Spirulina in aquaculture diets. **Reviews in Aquaculture**, 11(4):1367–1378, 2019.

- SAFARI, O., ATASHI, M. M. S. The effects of dietary supplement of annatto (*Bixa orellana*) seed meal on blood carotenoid content and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 937, p. 275-281, 2015.
- SAHANDI, J. Reproduction of Persian Gulf anemone fish (*Amphiprion clarkii*) in captive system. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation – International Journal of the Bioflux Society**, 4 (5):704–708, 2011.
- SANTOS, E. **Brasil é 13º na exportação de peixes ornamentais**. EMBRAPA, 2018.
- SATHASIVAM, R. et al. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. 26, p. 709-722, 2019.
- SCABINI, V. Reproductive performance of gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) fed two combined levels of carotenoids from paprika oleoresin and essential fatty acids. **Aquaculture Nutrition**, 17:304-312, 2011.
- SILVA JÚNIOR, R. F. et al. Substituição do óleo de peixe por óleo de soja em dietas para beijupirá (*Rachycentron canadum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.980-987, 2011.
- SMITH, K. F. et al. U.S. drowning in unidentified fishes: scope, implications, and regulation of live fish import. **Conservation Letters**, 1:103–109, 2008.
- TACON, A. G. J, METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, 285, p. 146-158, 2008.
- TEULING, E. et al. Cell wall disruption increases bioavailability of *Nannochloropsis gaditana* nutrients for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 499, p. 269-282, 2019.
- THORNHILL, D. J. Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade. **Defenders of Wildlife**, Washington, v. 187, p. 179, 2012.
- TOCHER, D. R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, 41, p. 717–732, 2010.
- VILCHEZ, C. et al. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. **Marine Drugs Journal** 9:319-333, 2011.
- VIZCAÍNO, A. J. et al. Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and *Senegalese sole*. **Algal Research**, v. 37, p. 145-153, 2019.
- WABNITZ, C. et al. **From Ocean to Aquarium the global trade in marine ornamental species**. UNEP-WCMC, Cambridge, UK, 2003.
- WITTENRICH, M. L. **The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes**. Plaza, Neptune City, New Jersey, USA, p. 85.