

Higor Hoffmann

**Pigmentação e crescimento de *Amphiprion ocellaris* utilizando
astaxantina natural e sintética**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Mônica Yumi Tsuzuki, Dra.
Coorientador: Roberto Bianchini Derner, Dr.

Florianópolis/SC
2016

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

Hoffmann, Higor

Pigmentação e crescimento de *Amphiprion ocellaris* utilizando astaxantina natural e sintética / Higor Hoffmann ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki ; coorientador, Roberto Bianchini Derner. - Florianópolis, SC, 2016.

60 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Peixe-palhaço. 3. Coloração. 4. Peixes ornamentais. 5. Naturese e CAROPHYLL Pink. I. Tsuzuki, Mônica Yumi . II. Derner, Roberto Bianchini . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Pigmentação e crescimento de *Amphiprion ocellaris* utilizando astaxantina natural e sintética

Por

HIGOR HOFFMANN

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



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

Banca Examinadora:



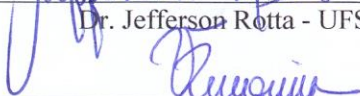
Dr. Roberto Bianchini Derner – *Presidente*



Dr. Fábio de Farias Neves - UDESC



Dr. Jefferson Rotta - UFSC



Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira - UFSC

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que me auxiliaram direta e indiretamente para a realização desse trabalho:

À orientadora, Prof. Mônica Yumi Tsuzuki, pela oportunidade nesse período. Ao meu coorientador, Prof. Roberto Bianchini Derner o que me deu todo apoio moral e financeiro para a realização do trabalho. Às minhas colegas de trabalho Renata Ávila Ozório e Ana Silvia Pedrazzani que foram as pessoas mais próximas e mais interadas da minha caminhada rumo ao Mestrado. Muito obrigado por tudo.

Ao pessoal do LAPOM, Lucas, Giovani, Douglas Bruna e Paulinha, também ao pessoal do LAPMAR, Cris Carvalho e Gabriel pelas dicas, sugestões e uso das instalações do Laboratório e à equipe do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA).

Aos meus queridos amigos Ana Paula, Milena, Tauê, Rômulo, Pola, Maiá e Fernandinho que estiveram sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins e sempre torcendo.

A indústria ALCON, por ter doado a astaxantina sintética para realização deste trabalho e ao Laboratório de Métodos e Extração e Separação da Universidade Federal do Góias pela realização das análises.

A toda minha FAMÍLIA, que mesmo distante, se fez presente durante o Mestrado.

E, finalmente, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UFSC, ao Carlito que resolveu todas as questões burocráticas com a eficiência de sempre, e à CAPES pelo auxílio financeiro concedido durante este período.

RESUMO

Para o mercado da aquariofilia, os peixes devem apresentar características específicas, em especial o tamanho, a forma e a coloração. O objetivo desse trabalho foi o de comparar a eficiência de produtos comerciais (CAROPHYLL Pink e Naturose) contendo astaxantina sintética e natural, respectivamente, na coloração, no crescimento e na sobrevivência de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*. Três dietas experimentais foram desenvolvidas a partir de uma ração base: Dieta controle (D_C = sem inclusão de astaxantina), Dieta suplementada com astaxantina sintética (D_{AS}) e Dieta suplementada com astaxantina natural (D_{AN}), sendo que o carotenoide foi incluído na ração base pelo método de aspersão. No período experimental de 60 dias foram realizadas cinco tomadas de dados para a biometria e fotografia dos peixes (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Para leitura da coloração foram aplicadas as coordenadas RGB (red, green e blue) no software Adobe Photoshop® CS6, e depois transformadas para HSB (hue, saturation e brightness, ou matiz, saturação e brilho) por programação no programa Matlab R2016a. A análise da coloração foi realizada em cinco regiões do corpo dos peixes. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa (ANOVA unifatorial, $p < 0,05$) entre as dietas em relação ao peso e ao comprimento total dos peixes, e a sobrevivência foi de 100% em todos os tratamentos. A suplementação da ração com astaxantina base foi efetiva para que os peixes ficassem mais pigmentados, sendo que a dieta contendo Naturose foi a mais eficiente para a pigmentação dos peixes. Após 45 dias de experimento, nas dietas com a inclusão de astaxantina, foi possível visualizar mudanças mais significativas da pigmentação nas diferentes regiões, sendo a região ventral (RV) a mais pigmentada em menor tempo de alimentação. Ao final dos 60 dias de experimento ficou demonstrado que os peixes alimentados com a dieta contendo astaxantina natural foram os que tiveram a coloração mais próximo ao vermelho, comprovando a relação da pigmentação com a suplementação de carotenoides na alimentação e com o tempo de alimentação.

Palavras-chave: 1. Aquicultura. 2. Peixe-palhaço. 3. Coloração. 4. Peixes ornamentais. 5. Naturose e CAROPHYLL Pink.

ABSTRACT

For the ornamental fish trade, the individuals must have specific characteristics, in particular the size, shape and coloration. The aim of this study was to compare the efficiency of commercial products (CAROPHYLL Pink and Naturose) containing synthetic and natural astaxanthin, respectively in, color, growth and survival of juvenile clownfish *Amphiprion ocellaris*. Three experimental diets were developed from a base feed: Control Diet (DC = without the addition of astaxanthin), Diet supplemented with synthetic astaxanthin (DAS) and Diet supplemented with natural astaxanthin (DAN), included by the spray method. During the trial period (60 days) five data collections were carried out for biometry (weight and body length) and individual photo documentation (0, 15, 30, 45 and 60 days). RGB coordinates were applied for coloring reading (red, green and blue) in Adobe Photoshop® CS6 software, and then transformed to HSB (hue, saturation and brightness) in Matlab R2016a software. The color analysis was performed on five fish body areas. There were no significant differences between diets on fish weight and body length, and the survival rate was 100% in all treatments. The inclusion of dietary astaxanthin was effective for fish pigmentation. The diet supplemented with Naturose was the most efficient for fish coloration. After 45 days, it was possible to view significant changes in coloration in fish fed with the inclusion of astaxanthin in different body areas, with the ventral region the most pigmented one in the shortest feeding time. At the end of 60 days, it was shown that fish fed with a natural astaxanthin containing diet were the ones closest to the species characteristic red color, showing the relationship of pigmentation with carotenoid supplementation associated with feeding and feeding time.

Keywords: 1. Aquiculture. 2. Clownfish. 3. Coloration. 4. Ornamental fish. 5. Naturose and CAROPHYLL Pink

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arranjo estrutural da astaxantina [3S, 3'S].....	200
Figura 2. Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Figura 3. Foto esquematizada das regiões do <i>Amphiprion ocellaris</i> para leitura da coloração (25 pixels / região), contendo os cartões de referência amarelo e vermelho e etiqueta de identificação (n° do tanque / n° amostral). Sendo I- Região da cabeça (RC), II- Região dorsal (RD), III- Região ventral (RV), IV- Nadadeira peitoral (NP) e V- Nadadeira caudal (NC).....	33
Figura 4. Valores médios do matiz (H, °) para o corpo inteiro das dietas controle, astaxantina sintética e astaxantina natural ao longo de 60 dias.....	42
Figura 5. Valores médios da saturação (S, %) para o corpo inteiro das dietas, sendo a dieta controle, dieta com astaxantina sintética e dieta com astaxantina natural ao longo de 60 dias.....	43
Figura 6. Valores médios do brilho (B, %) para o corpo inteiro das dietas, sendo a dieta controle, dieta com astaxantina sintética e dieta com astaxantina natural ao longo de 60 dias.....	43
Figura 7. Imagens dos peixes ao final do experimento que receberam as dietas: a) D _C , b) D _{AS} e c) D _{AN}	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da ração base utilizada na elaboração das dietas. Dados constantes na embalagem do produto	30
Tabela 2. Concentrações de astaxantina empregada nas dietas de peixes	31
Tabela 3. Dados do peso (g) dos juvenis de <i>A. ocellaris</i> alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e astaxantina natural ao longo do tempo. Onde D_C = dieta controle, D_{AS} = dieta com astaxantina sintética e D_{AN} = dieta com astaxantina natural	34
Tabela 4. Dados do comprimento total (cm) dos juvenis de <i>A. ocellaris</i> alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e astaxantina natural ao longo do tempo. Onde D_C = dieta controle, D_{AS} = dieta com astaxantina sintética e D_{AN} = dieta com astaxantina natural	35
Tabela 5. Valores do Matiz (H, °) dos juvenis de <i>A. ocellaris</i> alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e natural em relação ao tempo.....	36
Tabela 6. Valores da Saturação (S, %) dos juvenis de <i>A. ocellaris</i> alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e natural	38
Tabela 7. Valores do brilho (B, %) dos juvenis de <i>A. ocellaris</i> alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e natural.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1.1 Pigmentos	18
1.1.2 Os carotenoides.....	18
1.1.3 Astaxantina e suas principais funções biológicas.....	19
1.1.4 <i>Haematococcus pluvialis</i> : cultivo e seus produtos comerciais.	21
1.1.5 Manutenção da coloração de peixes em cativeiro.....	22
1.2 OBJETIVO GERAL.....	23
1.2.1 Objetivos Específicos.....	23
2. ARTIGO CIENTÍFICO:	25
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
Material biológico e condições experimentais.....	29
Biometria.....	29
Dietas Experimentais	30
Índice de coloração da pele de juvenis de <i>A. ocellaris</i>	32
Análise estatística	33
RESULTADOS	34
Sobrevivência e crescimento de juvenis de <i>A. ocellaris</i>	34
Índices de coloração x tempo.....	35
Matiz.....	35
Saturação	37
Brilho.....	38
Comparação do índice de coloração do corpo inteiro entre D_C , D_{AS} e D_{AN} em relação ao tempo	40
DISCUSSÃO	42
Crescimento e Sobrevivência.....	42
Índice de coloração x tempo	43
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	49
APÊNDICE	55
A) Rotina desenvolvida para transformação dos valores de RGB em HSB no software MATLAB R2016a.....	55
B) Fotografia de juvenis de <i>A. ocellaris</i> após 60 dias de experimento.....	58
ANEXO A – Descrição	56
Protocolo da análise do teor de astaxantinas nas amostras.....	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A aquariofilia consiste na prática de criar peixes e outros organismos aquáticos ornamentais, simulando condições similares às daquelas do meio ambiente onde estes animais são encontrados (DILER; DILEK, 2002). Com o crescimento do mercado para esta atividade, tem havido maior preocupação com relação à sustentabilidade, uma vez que, a maioria dos animais marinhos comercializados ainda provem de extrativismo (WABNITZ et al. 2003). Os peixes recifais, apresentam diferentes formatos, colorações chamativas e tamanho reduzido, o que os tornam os principais alvos de coleta para fins ornamentais (ZUANON; SALARO; FURUYA, 2011).

Um bom exemplo destes peixes altamente explorados são os pertencentes à família Pomacentridae, por apresentarem as características descritas anteriormente, particularmente a espécie de peixes-palhaço *Amphiprion ocellaris*. De acordo com a Global Marine Aquarium Database, esta foi a espécie marinha mais comercializada entre 1997 a 2002 (GREEN, 2003) e, conforme Rhyne et al. (2012) *A. ocellaris* foi a quinta espécie mais comercializada nos Estados Unidos em 2011 e 2012. Segundo Wittenrich (2007), os peixes-palhaço apresentam muitas peculiaridades, que os tornam candidatos perfeitos para a vida em cativeiro. Na natureza, estes peixes são fortemente ligados ao local onde vivem e raramente se aventuram longe da proteção da anêmona-do-mar. Por isso, não apresentam rápida natação e raramente sofrem estresse devido às limitações do aquário. Vale ressaltar que, em relação a essa espécie, já existe um protocolo facilmente executável de manutenção de reprodutores e para a obtenção de desova e larvicultura, o que a torna ideal para a aquicultura (WITTENRICH, 2007).

No ambiente natural, estes peixes consomem microalgas, macroalgas e crustáceos durante todo o seu ciclo de vida, o que permite que ingiram uma grande quantidade de pigmentos, especialmente os carotenoides, os quais são assimilados através da cadeia alimentar (RICHMOND, 2004), apresentando assim, colorações da pele e da carne de tonalidade superior em comparação com os indivíduos de cativeiro (DILER; DILEK, 2002).

Por conta da crescente necessidade de desenvolvimento de tecnologia de produção em cativeiro dos peixes ornamentais marinhos, faz-se também necessário o estudo da viabilidade da incorporação de

novas fontes alimentares que confirmam aos peixes as características de cor similares àquelas dos peixes selvagens, para que assim os animais produzidos em cativeiro sejam atrativos para o consumidor.

1.1.1 Pigmentos

Pigmentos são compostos químicos que absorvem a luz em diferentes comprimentos de ondas na faixa da luz visível, produzindo cor dependente da estrutura específica da molécula (cromóforo), o qual é capturado e/ou excitado por um elétron, assim a energia não é absorvida e logo é refletida e/ou refratada. E é essa energia refletida que será reconhecida pelo cérebro como coloração (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

A classificação dos pigmentos pode ocorrer de diferentes formas de acordo com sua natureza, podendo ser natural (pigmentos) ou sintética (corantes) (LATSCHA, 1990), além das aplicações a que destinam (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2011). Pigmentos naturais são produzidos por organismos vivos como plantas, animais, fungos e micro-organismos, enquanto os pigmentos sintéticos são obtidos em laboratório, sendo que os pigmentos naturais e sintéticos são compostos orgânicos (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Ainda, há tipos de pigmentos que podem ser classificados como inorgânicos e de efeito (YAMANAKA et al. 2006).

Na aquicultura, a pigmentação está relacionada com vários fatores, os quais estão diretamente ligados ao próprio pigmento (quantidade, tipo/estrutura, forma, estabilidade, utilidade biológica e período de administração), ao regime alimentar (ingredientes, mix alimentar, produto, nutrição, qualidade e consumo de ração), às características do peixe (espécie, genética, fase de desenvolvimento, metabolismo, sexo e tecido alvo), à questão ambiental (sistema de cultivo, qualidade da água, iluminação e variação sazonal) e aos tipos de doenças (infecções bacterianas, fúngicas, virais, parasitismo e envenenamento químico) (DILER; DILEK, 2002).

1.1.2 Os carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais lipofílicos que são depositados em vários órgãos, em especial na pele e nas gônadas, agindo diretamente na pigmentação da pele dos peixes (ZUANON; SALARO; FURUYA, 2011), apresentando uma coloração amarela até a vermelha, e estão relacionados com ações instintivas de camuflagem e cortejamento

(CHRISTIANSEN; LIE; TORRISSEN, 1995), sinalização durante interações sociais como agressão e submissão (ZUANON; SALARO; FURUYA, 2011), além de serem importantes como sinal de aptidão para o acasalamento (CLOTFELTER; ARDIA; MCGRAW, 2007).

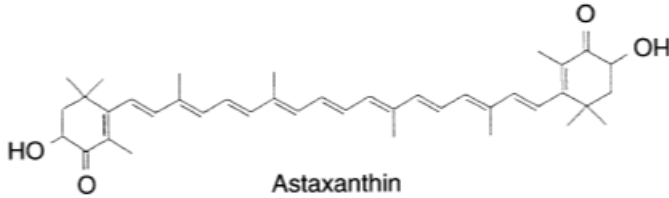
De acordo com Zuanon, Salaro e Furuya (2011), além de favorecer a pigmentação da pele dos peixes, os carotenoides são importantes em diversas funções biológicas, como na reprodução, quimiopercepção, suplementação do oxigênio intracelular, crescimento, receptor de elétrons, estabilização de proteínas/membranas, transporte de cálcio, resposta imune, sistema endócrino, proteção contra a oxidação, a irradiação e alta temperatura, além de digestão enzimática. Também são os precursores da vitamina A.

Segundo Goodwin (1962), os carotenoides pertencem ao grupo mais antigo de pequenas moléculas e provavelmente o mais encontrado em produtos naturais, estruturalmente formados por polímeros de isopreno (BERGAMASCHI, 2010), sendo os mais comuns a serem encontrados: beta-caroteno, alfa-caroteno, gama-caroteno, beta-criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina e a astaxantina (GOODWIN, 1962). Esses carotenoides são somente sintetizados por plantas, algas e micro-organismos (GOODWIN, 1962). Os peixes, como outros animais, são incapazes de sintetizar os carotenoides (SILVA, 2000), que precisam ser supridos diretamente em sua dieta (LORENZ; CYSEWSKI, 2004). Segundo Zuanon et al. (2011), dietas deficientes em corantes e pigmentos influenciam na diminuição da pigmentação da pele, o que leva a uma diminuição do valor dos peixes ornamentais no mercado da aquariofilia.

1.1.3 Astaxantina e suas principais funções biológicas

A astaxantina (Figura 1) (3, 3'- dihidroxi – 4, 4' – diketo – β - caroteno) é o carotenoide natural mais comumente encontrado em crustáceos, aves tropicais e peixes (CHEN; MEYERS, 1984; KAMATH, 2007). É conhecida por provocar a tonalidade rosa avermelhada na carne de salmonídeos, camarões e lagostas (LORENZ; CYSEWSKI, 2004). Geralmente sua fórmula estrutural é formada por oito unidades de isoprenos, constituindo em uma cadeia longa contendo de 3 a 15 duplas ligações de polieno, dando origem às fórmulas estruturais naturais [3S, 3'S] e sintéticas [3R, 3'S], [3R, 3'S] e [3R, 3'R] (NGUYA, 2013), dependendo de onde a hidroxila esteja ligada (KAMATH, 2007).

Figura 1. Arranjo estrutural da astaxantina [3S, 3'S].



Fonte: GOODWIN (1962).

Lorenz e Cysewski (2004) relataram as principais funções biológicas essenciais provocadas pela ingestão da astaxantina natural em peixes, as quais incluem a proteção contra a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, a proteção contra os efeitos da luz ultravioleta, melhora na reposta imunológica, acentuação da pigmentação, aumento do comportamento reprodutivo e melhora na reprodução. A ingestão natural da astaxantina no ambiente marinho ocorre através da biossíntese dos produtores primários (micro e macroalgas) que, conseqüentemente é bioacumulada pelos consumidores primários e secundários (zooplâncton e crustáceos), ocorrendo a transferência do carotenoide para os níveis tróficos superiores (KAMATH, 2007).

Zuanon, Salaro e Furuya (2011) reportaram que a astaxantina é o pigmento de maior eficiência na pigmentação da pele de peixes ornamentais, considerando diferentes fontes e níveis de inclusão em dietas. De acordo com Bjerkeng et al. (1999), a utilização da astaxantina para pigmentação da carne do salmão também pode melhorar a rentabilidade da sua produção, uma vez que os peixes com maior pigmentação alcançam maior valor de mercado.

A ingestão de carotenoides por peixes de cativeiro é dependente do fornecimento de dietas contendo estes compostos, porém, nas rações, os carotenoides apresentam certa instabilidade, devido à composição, ao processamento e às condições de armazenamento da ração, ocasionando uma redução na função de pigmentação (MEYES; LATSCHA, 1997).

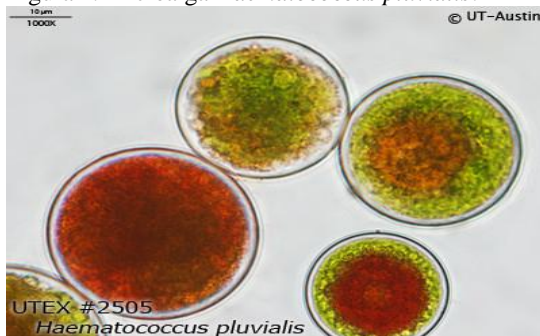
Existem versões sintéticas da astaxantina, como o produto CAROPHYLL® Pink, formulado para ser estável e uma fonte confiável e similar da astaxantina natural. Segundo Nguyen (2013), a astaxantina sintética tem sido amplamente utilizada em dietas de peixes como suplemento alimentar para a pigmentação animal. Uma alternativa natural de obtenção de astaxantina pode ser alcançada através da microalga *Haematococcus pluvialis*.

1.1.4 *Haematococcus pluvialis*: cultivo e seus produtos comerciais

Haematococcus pluvialis (Figura 2) é uma microalga da classe Clorofíceas e é encontrada em águas doces (MARGALITH, 1999). As células algais apresentam coloração verde quando se encontram em condições ambientais ideais, mas quando expostas a variações extremas, como elevada irradiância, privação de nitrogênio, aumento de temperatura e mudanças no pH, é verificada uma mudança em sua coloração, ficando avermelhadas devido à acumulação de astaxantina e, finalmente, ocorre a formação de cistos contendo elevado teor deste pigmento, que pode chegar a 5% na biomassa seca (GHIGGI, 2007).

Diversas empresas, especializadas em cultivo de microalgas, produzem esta microalga em larga escala (DERNER et al. 2006) e empregam a astaxantina em produtos destinados tanto para a aquicultura quanto para o consumo humano (RICHMOND, 2004).

Figura 2. Microalga *Haematococcus pluvialis*.



Fonte: UTEX, (2016).

O cultivo de *H. pluvialis*, visando à produção de astaxantina, ocorre em duas etapas, sendo ambas desenvolvidas em condições fotoautotróficas. A primeira etapa constituída por um crescimento vegetativo da biomassa, é realizado sob condições ótimas de cultivo, como a temperatura, o pH, a luz e os nutrientes e, na segunda etapa, a biomassa produzida é submetida a condições de estresse, geralmente associado ao aumento da temperatura, à carência de nitrogênio e à elevada irradiância, o que induz nas células algais o processo de carotenogênese, o qual leva ao aparecimento da cor amarela, laranja ou vermelha (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

Atualmente, em âmbito comercial, biomassa seca de *H. pluvialis* rica em astaxantina é comercializada na forma de concentrados em pó,

liofilizados ou como extrato em óleo vegetal (DERNER et al. 2006). Um dos produtos comerciais é Naturose™, que é considerado um produto natural, e é produzido pela empresa Cyanotech (USA), que utiliza uma combinação de fotobioreatores e tanques rasos para o cultivo desta microalga. Uma vez que as células se tornam ricas em astaxantina, são coletadas, secadas e moídas para que ocorra a lise da parede celular. Logo, o produto é seco por “spray dryer” e é preservado com etoxiquina ou outros antioxidantes para assegurar o tempo de prateleira. Em geral, a astaxantina derivada desse cultivo apresenta em sua composição cerca de 70% de monoésteres, 25% de diésteres e 5% de pigmento livre, sendo mais encontrados produtos contendo 1,5% de astaxantina (DORE; CYSEWSKI, 2003).

O produto CAROPHYLL® Pink tem uma composição de astaxantina sintética emulsificada em antioxidantes, uma matriz de gelatina e carboidratos, sendo revestido por uma película de amido de milho (concentrações não divulgadas). O produto é disponibilizado na forma de pó e serve para suplementação de carotenoides em dietas para animais. A concentração neste produto varia de 8% a 10% (LA ROCHE ltd, 1999; FEEDAP, 2014).

Em relação ao valor de mercado, numa comparação entre astaxantina sintética e natural, dados reportados por Kamath (2007) mostraram diferenças significativas, sendo o produto sintético encontrado por até \$2.000 dólares o quilograma, enquanto que o produto natural pode ser encontrado por valores entre \$10.000 – 15.000 dólares o quilograma.

1.1.5 Manutenção da coloração de peixes em cativeiro

O comércio de peixes ornamentais é um dos segmentos mais promissores da Aquicultura e, segundo Cardoso et al. (2012) conforme vem crescendo a atividade de aquariofilia, os consumidores buscam por espécies e linhagens cuja beleza e raridade são expressas em características como forma do corpo, comportamento e, principalmente, a coloração. De acordo com Cardoso et al. (2012), os peixes oriundos da atividade extrativista, em geral, apresentam tons de colorações mais fortes e acentuados em comparação com a indivíduos de cativeiro, o que faz com que, na hora da compra, o consumidor prefira peixes que tenham coloração mais intensa. Essa característica na coloração, faz com que os peixes sejam comprados mais rapidamente e/ou que tenham um valor mais elevado em comparação aos outros com colorações menos marcantes.

Reconhecidamente, a coloração é uma das características mais afetadas em organismos de cativeiro, devido às condições de estresse, como despesca, privação alimentar e espacial, qualidade nutricional e no transporte, uma vez que os peixes são submetidos a estes fatores desde o produtor até o consumidor (REZENDE, 2010).

De forma geral, as dietas comercializadas para peixes marinhos ornamentais têm elevado valor comercial, bem como, deficiência em carotenoides, o que dificulta a manutenção da coloração, apresentando características distintas da espécie encontrada no ambiente natural. Isso faz com que os peixes produzidos em cativeiro tenham uma tendência de desvalorização comercial em relação aos peixes oriundos de captura (REZENDE, 2010).

Ghiggi (2007) afirma que a incorporação de carotenoides na dieta pode propiciar melhores resultados de coloração e índices zootécnicos dos animais de cativeiro. Uma vez que na natureza os peixes-palhaços apresentam coloração mais acentuada (próximo ao vermelho) por conta da dieta rica em carotenoides, quando em cativeiro pode ocorrer a atenuação da coloração (amarelo). Assim, alguns trabalhos têm sido realizados com objetivo de verificar as mudanças da coloração pelo uso de dietas suplementadas com carotenoides, inclusive com astaxantina. Nestes estudos, foi verificado que a suplementação da dieta com astaxantina foi a forma mais eficiente para o aumento da coloração (YASIR; QUIN, 2009; YASIR; QUIN, 2010; HO; O'SHEA; POMEROY; 2012; HO; BERTRAN; LIN, 2013) (Tabela. 1).

1.2 OBJETIVO GERAL

Comparar os efeitos da astaxantina sintética e da astaxantina natural (biomassa seca da microalga *Haematococcus pluvialis*) na dieta no crescimento e na coloração do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Comparar a eficiência da utilização de astaxantina natural e de astaxantina sintética na pigmentação (coloração) da pele de juvenis de *A. ocellaris*;
- Determinar o crescimento e sobrevivência dos juvenis de *A. ocellaris* alimentados com dieta contendo astaxantina natural e astaxantina sintética;
- Determinar as mudanças da coloração em diferentes regiões do corpo de *A. ocellaris* em relação ao tempo.

Este trabalho será submetido à revista científica Aquaculture Internacional e está formatado conforme as normas da revista.

2. ARTIGO CIENTÍFICO:

PIGMENTAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Amphiprion ocellaris* UTILIZANDO ASTAXANTINA NATURAL E SINTÉTICA

Higor Hoffmann¹, Ana Silvia Pedrazzani¹, Renata Ávila Ozório¹, Roberto Bianchini Derner², Mônica Yumi Tsuzuki¹

¹Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

²Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (Federal University of Santa Catarina), CP: 476, Florianópolis-SC, CEP: 88040-970, Telefone (48) 37214792. Email: hoffmannhigor@gmail.com; monica.tsuzuki@ufsc.br

RESUMO

Para o mercado da aquariofilia, os peixes devem apresentar características específicas, em especial o tamanho, a forma e a coloração. O objetivo desse trabalho foi o de comparar a eficiência de produtos comerciais (CAROPHYLL Pink e Naturose) contendo astaxantina sintética e natural, respectivamente, na coloração, no crescimento e na sobrevivência de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*. Três dietas experimentais foram desenvolvidas a partir de uma ração base: Dieta controle (D_C = sem inclusão de astaxantina), Dieta suplementada com astaxantina sintética (D_{AS}) e Dieta suplementada com astaxantina natural (D_{AN}), sendo que o carotenoide foi incluído na ração base pelo método de aspersão. No período experimental de 60 dias foram realizadas cinco tomadas de dados para a biometria e fotografia dos peixes (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Para leitura da coloração foram aplicadas as coordenadas RGB (red, green e blue) no software Adobe Photoshop® CS6, e depois transformadas para HSB (hue, saturation e brightness, ou matiz, saturação e brilho) por programação no programa Matlab R2016a. A análise da coloração foi realizada em cinco regiões do corpo dos peixes. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa (ANOVA unifatorial, $p < 0,05$) entre as dietas em relação ao peso e ao comprimento total dos peixes, e a sobrevivência foi de 100%

em todos os tratamentos. A suplementação da ração com astaxantina base foi efetiva para que os peixes ficassem mais pigmentados, sendo que a dieta contendo Naturose foi a mais eficiente para a pigmentação dos peixes. Após 45 dias de experimento, nas dietas com a inclusão de astaxantina, foi possível visualizar mudanças mais significativas da pigmentação nas diferentes regiões, sendo a região ventral (RV) a mais pigmentada em menor tempo de alimentação. Ao final dos 60 dias de experimento ficou demonstrado que os peixes alimentados com a dieta contendo astaxantina natural foram os que tiveram a coloração mais próximo ao vermelho, comprovando a relação da pigmentação com a suplementação de carotenoides na alimentação e com o tempo de alimentação.

Palavras-chave: 1. Peixe-palhaço, 2. Coloração, 3. Peixes ornamentais, 4. Naturose, 5. CAROPHYLL Pink.

ABSTRACT

For the ornamental fish trade, the individuals must have specific characteristics, in particular the size, shape and coloration. The aim of this study was to compare the efficiency of commercial products (CAROPHYLL Pink and Naturose) containing synthetic and natural astaxanthin, respectively in, color, growth and survival of juvenile clownfish *Amphiprion ocellaris*. Three experimental diets were developed from a base feed: Control Diet (DC = without the addition of astaxanthin), Diet supplemented with synthetic astaxanthin (DAS) and Diet supplemented with natural astaxanthin (DAN), included by the spray method. During the trial period (60 days) five data collections were carried out for biometry (weight and body length) and individual photo documentation (0, 15, 30, 45 and 60 days). RGB coordinates were applied for coloring reading (red, green and blue) in Adobe Photoshop® CS6 software, and then transformed to HSB (hue, saturation and brightness) in Matlab R2016a software. The color analysis was performed on five fish body areas. There were no significant differences between diets on fish weight and body length, and the survival rate was 100% in all treatments. The inclusion of dietary astaxanthin was effective for fish pigmentation. The diet supplemented with Naturose was the most efficient for fish coloration. After 45 days, it was possible

to view significant changes in coloration in fish fed with the inclusion of astaxanthin in different body areas, with the ventral region the most pigmented one in the shortest feeding time. At the end of 60 days, it was shown that fish fed with a natural astaxanthin containing diet were the ones closest to the species characteristic red color, showing the relationship of pigmentation with carotenoid supplementation associated with feeding and feeding time.

Keywords: 1. Clownfish, 2. Coloration, 3. Ornamental fish, 4. Naturose, 5. CAROPHYLL Pink.

INTRODUÇÃO

Um dos setores mais promissores da Aquicultura é a piscicultura de peixes ornamentais, que também é um setor dinâmico e que sempre busca inovações (CARDOSO et al. 2012). Neste mercado, os consumidores, cada vez mais, almejam por espécies e linhagens cuja beleza e raridade são expressas em características como hábito comportamental e principalmente colorações e formato do corpo distintos ou específicos (REZENDE, 2010).

Segundo Rezende (2010), uma das maiores dificuldades encontradas por produtores de peixes ornamentais para sua comercialização reporta-se à intensidade das cores e ao vigor dos peixes ao chegarem aos consumidores. Em geral, organismos aquáticos quando no ambiente natural apresentam maior coloração e tonalidades mais intensas do que organismos de cativeiro (DILER; DILEK, 2002). De acordo com Rezende (2010), essa diferença na coloração dos animais pode estar associada às condições negativas de bem-estar, ao intenso estresse provocado por todo o processo desde a despesca dos organismos até a chegada na loja, bem como, por períodos de privação alimentar e até mesmo pela qualidade do alimento oferecido aos peixes.

Uma vez que, nos ambientes aquáticos, somente micro-organismos, como bactérias e microalgas, além de macroalgas, são capazes de sintetizar carotenoides (GOODWIN, 1962; BERGAMASCHI, 2010), surge a necessidade da suplementação deste pigmento nas dietas dos organismos aquáticos ornamentais cultivados, com o objetivo de melhorar a pigmentação (RICHMOND, 2004). Esta prática já é bastante habitual na produção de salmonídeos, onde são empregados carotenoides como fonte de pigmento, visando favorecer uma coloração rosa-avermelhada à carne, principalmente em cultivos do salmão-do-Atlântico *Salmo salar* (CHRISTIANSEN; LIE; TORRISSEN, 1995;

WATHNE *et al.*, 1998; BJERKENG *et al.*, 1999). Os carotenoides também estão se tornando bastante populares para a suplementação de rações destinada às espécies ornamentais, com destaque para a família Pomacentridae (YASIR; QUIN, 2009; YASIR; QUIN, 2010; HO; O'SHEA; POMEROY, 2012; SEYED *et al.*, 2013; HO, BERTRAN; LI, 2013).

Segundo a Global Marine Aquarium Database, a espécie *Amphiprion ocellaris* foi a espécie marinha mais comercializada entre os anos de 1997 a 2002 (GREEN, 2003). Recentemente a família Pomacentridae encontra-se entre as 20 principais famílias mais importadas pelos Estados Unidos, sendo *Amphiprion ocellaris* e *Amphiprion percula* a quarta e a quinta espécies mais comercializadas no mercado norte americano, respectivamente (RHYNE *et al.* 2012).

Dentre os carotenoides, a astaxantina é um dos compostos de maior eficiência na pigmentação dos peixes é a (TANAKA *et al.* 1992). Esse pigmento, é encontrado naturalmente em microalgas, bactérias e crustáceos (SILVA, 2000), sendo que a microalga *Haematococcus pluvialis* é o organismo com maior capacidade de concentração de astaxantina (GHIGGI, 2007). O cultivo desta microalga é realizado em escala comercial para obtenção de astaxantina natural, entretanto, no mercado também são encontradas as versões sintéticas da astaxantina (DERNER *et al.* 2006).

Várias funções biológicas essenciais em peixes estão diretamente ligadas a ingestão de astaxantina, que vão desde a acentuação da pigmentação, proteção fotooxidativa, proteção contra a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, melhora na resposta imunológica, intensificação do comportamento reprodutivo e melhora nos índices de reprodução (LORENZ; CYSEWSKI, 2004).

Segundo Lorenz e Cysewski (2000), a manutenção da coloração de peixes ornamentais marinhos em cativeiro é realizada pelo fornecimento de rações enriquecidas com carotenoides e a fonte utilizada são alimentos frescos (lula e camarão), astaxantina e cataxantina sintéticas, e astaxantina natural derivada da microalga *Haematococcus pluvialis*.

Além do aumento na coloração da pele e da carne, a incorporação de biomassa de *H. pluvialis*, rica em astaxantina (podendo ter 5% em peso seco), na dieta dos peixes propicia melhores índices zootécnicos, bem como, uma possível diminuição do estresse oxidativo e dos radicais livres (GHIGGI, 2007), assim como fornece níveis de lipídeos à dieta.

Uma vez que a cor é uma característica comercialmente importante em peixes ornamentais, neste trabalho foi comparada a

eficiência na coloração da pele de peixes-palhaço alimentados com dieta suplementada com astaxantina sintética e com astaxantina natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e condições experimentais

Foram utilizados 180 juvenis de *Amphiprion ocellaris* com cinco meses de idade, peso inicial médio de $0,70 \pm 0,28$ g e comprimento total médio de $2,89 \pm 0,20$ cm. O sistema de cultivo consistiu de 9 caixas circulares de fibra-de-vidro (100 L) na cor azul contendo 90 L de água oceânica, numa salinidade 35. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente (20 indivíduos em cada caixa), determinando uma densidade de 0,22 peixes por litro.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos – LAPOM, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Durante o período experimental de 60 dias, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09:00 h e 16:00 h) e a ração foi ofertada numa estimativa de 4% da biomassa. Duas horas após o arraçoamento, as unidades experimentais foram inspecionadas e, quando ocorreram sobras, a quantidade diária de ração foi reduzida. A dose diária de ração foi ajustada à biomassa a cada 15 dias (biometria), conforme o aumento de peso dos peixes durante o experimento.

A água marinha empregada nos cultivos foi previamente tratada com emprego de filtro bag ($10 \mu\text{m}$), caixa de tratamento de água (sump) e fracionador de espuma (skimmer). O sistema experimental de cultivo foi mantido em circulação aberta, numa taxa de renovação de $14,3 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, correspondente a uma renovação de $380 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$. A temperatura da água nas unidades experimentais foi mantida a $26,5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ com auxílio de termostatos e aquecedores. Diariamente, foram monitorados alguns parâmetros de qualidade da água: oxigênio dissolvido, temperatura e salinidade. O pH e a amônia total foram medidos a cada três dias, com o emprego de testes colorimétricos (LabconTest®).

Biometria

Ao longo do experimento, foram realizadas cinco biometrias (0, 15, 30, 45 e 60 dias), para a determinação do peso, do comprimento total, do comprimento padrão e da altura da cabeça dos juvenis de peixe-

palhaço. Para a biometria, 5 peixes foram retirados sequencialmente de cada uma das unidades experimentais e foram anestesiados através de imersão em água com 30 mg. L⁻¹ de óleo de cravo-da-Índia. Os animais permaneceram nesta solução até que o estágio IV fosse atingido (anestesia cirúrgica) e foram mantidos durante 5 minutos, sendo este estágio considerado seguro para manipulação dos animais (PEDRAZZANI; OSTRENSKY, 2014). Após a biometria, os peixes foram transferidos para aquários contendo água limpa, onde permaneceram durante a total recuperação, sendo então devolvidos às unidades experimentais correspondentes.

Dietas Experimentais

Para a elaboração das dietas experimentais, foi utilizada como base uma ração comercial peletizada desenvolvida para peixes de corte (NUTRIPISCIS STARTER 45, 0,8 – 1,0 mm de diâmetro) (Tabela 2). A ração base foi previamente quebrada e peneirada (0,5 – 0,8 mm) para adequação ao tamanho dos peixes. Foram desenvolvidas três dietas experimentais: D_C= Dieta controle, com emprego de ração base; D_{AS}= dieta com ração base e adição de astaxantina sintética e D_{AN}= Dieta com ração base e adição de astaxantina natural.

Tabela 1. Composição centesimal da ração base utilizada na elaboração das dietas. Dados constantes na embalagem do produto.

Componentes	Quantidade (g. kg⁻¹)	Percentual (%)
Umidade (máx.)	130	13
Proteína Bruta (mín.)	450	45
Extrato Etéreo (mín.)	90	9
Matéria Mineral (máx.)	160	16
Fibra Bruta (máx.)	36	3,6
Cálcio (mín.)	20	2
Fósforo (mín.)	10	1
Vitamina C (mín.)	1.500,00	0,15

Como fonte de astaxantina foram empregados dois produtos comerciais: CAROPHYLL[®] Pink 10% (Hoffmann - La Roche, Basel, Switzerland) como fonte de astaxantina sintética e Naturose[™] 1,5%

(Cyanotech Corporation, Hawaii, USA) como fonte de astaxantina natural.

Visando obter uma concentração de astaxantina na ordem de 18 mg. kg⁻¹ (18 ppm) nas dietas, foi empregado 0,18 g de CAROPHYLL Pink e 1,2 g de Naturose (em porções de 1 kg da ração base), respectivamente nas dietas contendo astaxantina sintética (D_{AS}) e natural (D_{AN}). Para a inclusão nas dietas, a astaxantina foi inicialmente dissolvida em 30 mL de óleo de soja e esta mistura foi aspergida sobre os grãos da ração base. A dieta controle (D_C) foi aspergida com o mesmo volume de óleo de soja. Para a secagem, as dietas experimentais foram submetidas à ventilação forçada em estufa a 25 °C por 24 h e, posteriormente, foram mantidas em ambiente escuro por mais 12 h (27 °C, temperatura ambiente) para que os pellets adquirissem a umidade relativa do ar. As dietas foram armazenadas em recipientes fechados hermeticamente e mantidas em freezer (-7 °C).

A concentração de astaxantina empregada neste trabalho para a elaboração das dietas (18 mg. kg⁻¹) foi determinada com base em valores encontrados na literatura (Tabela 2). A concentração de astaxantina nas dietas foi determinada conforme Soares et al. (2006) (ANEXO I).

Tabela 2. Concentrações de astaxantina empregada nas dietas de peixes.

Concentração (mg. kg ⁻¹)	Produto (% astaxantina)	Espécie alimentada	Referência
20, 50 e 100	Sintética (8%)	<i>A. ocellaris</i>	YASIR; QUIN (2010)
40, 60, 80 e 160	Naturose (1,5%)	<i>A. ocellaris</i>	HO; O'SHEA; POMEROY (2012)
23, 214 e 2350	Naturose (1,5%)	<i>Premnas biaculeatus</i>	HO; BERTRAN; LIN (2013)
90, 180 e 270	CAROPHYLL Pink (8%)	<i>A. ocellaris</i>	SEYEDI, et al. (2013)

As análises indicaram concentrações de 10,74 ± 2,3 mg. kg⁻¹ na dieta controle, 16,53 ± 9,3 mg. kg⁻¹ na dieta com astaxantina sintética e 14,82 ± 5,1 mg. kg⁻¹ na dieta com astaxantina natural. A presença de astaxantina na dieta controle provavelmente está relacionada à inclusão de farinha de salmão na fabricação da ração empregada como base. Nas dietas com a inclusão de astaxantina, foram observadas concentrações

mais elevadas e, apesar de serem valores menores do que o esperado, indicam que houve a incorporação de astaxantina às dietas experimentais.

Índice de coloração da pele de juvenis de *A. ocellaris*

Para a análise de coloração da pele dos juvenis de *A. ocellaris* foi utilizado o modelo HSB (Hue, Saturation e Brightness) ou (Matiz, Saturação e Brilho) (YASIR; QIN, 2009). Este método compreende uma avaliação matemática das cores, de uma forma objetiva e semelhante à percepção humana, através de uma fotografia digital pele dos peixes (GEORGIEVA; DIMITROVA; ANGELOV, 2005). A avaliação do matiz representa o quanto a cor é real e é expressa em graus, em uma escala que varia de 0° a 360°, (0 ou 360° = vermelho, 120° = verde e 240° = azul). A medida da saturação da cor indica o quanto a cor está presente em relação à proporção da quantidade de cinza médio e é apontada numa escala de 0% a 100%. Assim, quanto menos cinza médio, mais saturada é a cor. Para aferição do brilho da cor é utilizada outra escala, também expressa em percentual, sendo atribuído 0% para preto e 100% para a adição de branco na cor em análise (YASIR; QIN, 2009).

O registro fotográfico e as biometrias foram realizados em cinco etapas (n = 5 peixes/réplica). A primeira etapa foi realizada durante a separação dos juvenis para as unidades experimentais enquanto as demais etapas foram realizadas após 15, 30, 45 e 60 dias do início do experimento.

Após a anestesia para a biometria, os juvenis foram individualmente fotografados (em fundo branco) empregando uma câmera fotográfica semiprofissional (FUJIFILM FinePix s4250wm, 14MP). A câmera fotográfica foi fixada a um pedestal, posicionada a uma altura de 25 cm acima dos peixes, os quais foram iluminados com o emprego de 4 lâmpadas fluorescentes compactas (18 W, 6.500K) dispostas nos dois lados da mesa (75 por 75 cm). O registro das imagens foi feito em sala fechada, sem efeito da luz natural (YASIR; QIN, 2009).

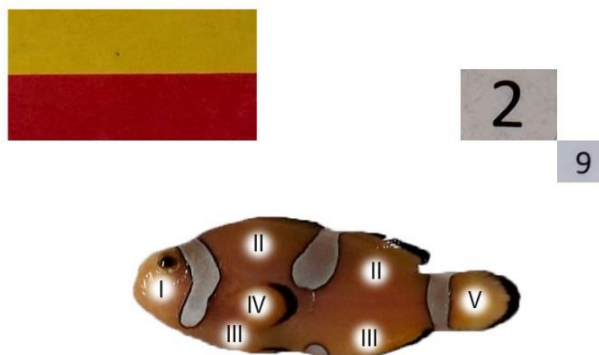
Antes de cada registro fotográfico, para a correção do balanço de branco, foi utilizado um cartão de referência cinza 18%, (YASIR; QIN, 2009), além de cartões de referência nas cores amarelo e vermelho para auxiliar durante a leitura da coloração dos peixes.

Para a análise da coloração do corpo dos peixes, foi realizada a divisão da amostra em cinco pontos de análises (Figura 3), sendo: 1 – Região da Cabeça (RC), 2 – Região Dorsal (RD), 3 – Região Ventral

(RV), 4 – Nadadeira peitoral (NP) e 5 – Nadadeira caudal (NC) e Corpo inteiro (CI) o qual foi calculado a partir das médias das regiões.

As fotografias foram analisadas com ajuda do software Adobe Photoshop CS6®, para obtenção dos valores de R (“red”) G (“green”) e B (“blue”). As fotos foram previamente tratadas com o balanço automático de cor e equilíbrio de branco [**Image - Adjustments - levels ...**]. Em cada região foi lida uma área de 5 pixels quadrados. Os valores obtidos no software (Adobe photoshop) foram apresentados nas coordenadas RGB. Sendo assim, foi desenvolvida uma rotina no software Matlab R2016a (APÊNDICE A), para a conversão dos valores das coordenadas de RGB em HSB, respectivamente. Trata-se de uma rotina com a programação de transformação dos dados, onde o cálculo para a transformação matemática encontra-se no software disponível on-line RGB to HSB Calculator(<www.ragsinteinc.com/PhotoTechStuff/AcrCalibration/RGB2HSB.html>) (Yasir & Qin, 2009).

Figura 3. Foto esquematizada das regiões do *Amphiprion ocellaris* para leitura da coloração (25 pixels / região), contendo os cartões de referência amarelo e vermelho e etiqueta de identificação (n° do tanque / n° amostral). Sendo I- Região da cabeça (RC), II- Região dorsal (RD), III- Região ventral (RV), IV- Nadadeira peitoral (NP) e V- Nadadeira caudal (NC).



Análise estatística

A análise estatística dos dados de peso e comprimento total entre os tratamentos (dietas) ao longo do tempo foi desenvolvida através do emprego de análise de variância com um fator (one-way ANOVA,

$p < 0,05$). A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram testadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Cochran, respectivamente. Quando a ANOVA apontou diferenças estatísticas significativas foi aplicado teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias (Tabelas 3 e 4).

Para a verificação da mudança de coloração na pele de *A. ocellaris* foi necessário avaliar cada componente da coloração separadamente: matiz (H), saturação (S) e brilho (B). A junção dessas três variáveis imprimiu o índice de coloração expressa na pele dos peixes. Como os dados de saturação (S) e brilho (B) apresentaram-se não-paramétricos (valores em percentual), foi necessária a conversão dos dados em radianos, tornando possível o tratamento dos dados pela Anova unifatorial. A conversão foi realizada pela fórmula: $S, B \text{ (rad)} = \arcsen. [S; B \text{ (%)} / 100] 0,5$. Foram comparados os índices de coloração de cada uma das cinco regiões dos peixes e do corpo inteiro, considerando as diferentes dietas em relação ao tempo de experimento (alimentação) e entre as dietas no último dia do experimento (60 dias).

RESULTADOS

Sobrevivência e crescimento de juvenis de *A. ocellaris*

A sobrevivência dos peixes foi de 100% em todas as dietas. A partir de um peso inicial médio de $0,70 \pm 0,28$ g e de um comprimento geral médio de $2,89 \pm 0,20$ cm, foi verificado o crescimento com a aplicação de todas as dietas. Os valores obtidos ao longo do experimento para o peso e para o comprimento estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Dados do peso (g) dos juvenis de *A. ocellaris* alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e astaxantina natural ao longo do tempo. Onde D_C = dieta controle, D_{AS} = dieta com astaxantina sintética e D_{AN} = dieta com astaxantina natural.

Dietas	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
D_C	$0,76 \pm 0,06^a$	$0,89 \pm 0,09^b$	$0,97 \pm 0,07^a$	$1,21 \pm 0,08^a$
D_{AS}	$0,80 \pm 0,10^a$	$0,93 \pm 0,07^{ab}$	$1,10 \pm 0,09^a$	$1,23 \pm 0,10^a$
D_{AN}	$1,01 \pm 0,09^a$	$1,06 \pm 0,09^a$	$1,15 \pm 0,07^a$	$1,36 \pm 0,09^a$

Dados médios \pm desvio padrão, $n = 15$. ANOVA unifatorial ($p < 0,05$). Letras diferentes nas colunas indicam diferença pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4. Dados do comprimento total (cm) dos juvenis de *A. ocellaris* alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e astaxantina natural ao longo do tempo. Onde D_C = dieta controle, D_{AS} = dieta com astaxantina sintética e D_{AN} = dieta com astaxantina natural.

Dietas	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
D_C	2,91±0,07 ^a	3,06±0,10 ^b	3,22±0,09 ^a cm	3,42±0,13 ^a
D_{AS}	3,02±0,15 ^a	3,22±0,10 ^{ab}	3,39±0,11 ^a cm	3,45±0,10 ^a
D_{AN}	3,25±0,10 ^a	3,37±0,10 ^a	3,45±0,08 ^a cm	3,61±0,10 ^a

Dados médios ± desvio padrão, n= 15. ANOVA unifatorial ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Os valores das médias finais de comprimento padrão (cm) e altura da cabeça (cm) não apresentaram diferenças significativas na comparação entre as dietas: comprimento padrão = $2,60 \pm 0,32$ cm; $2,63 \pm 0,46$ cm e $2,79 \pm 0,35$ cm e altura da cabeça = $0,51 \pm 0,04$ cm; $0,55 \pm 0,08$ cm e $0,57 \pm 0,09$ cm), respectivamente nos peixes alimentados com D_C , D_{AS} e D_{AN} .

Índices de coloração x tempo

Matiz

Os valores obtidos para o matiz (H, °) da coloração de cada região e do corpo inteiro dos juvenis em relação ao tempo de experimento estão apresentados na Tabela 5.

Para a região da cabeça (RC), foi observada diferença significativa no decréscimo do valor de H apenas para D_{AN} a partir de 45 dias de experimento, chegando a um valor de $23,3 \pm 0,6^\circ$, sendo assim, o menor valor encontrado para a primeira região. Na avaliação da região dorsal, notou-se diferença significativa para D_{AS} em 45 dias, porém, ao final do experimento esse valor retornou a um valor próximo ao valor inicial da coloração.

Considerando a região ventral (RV), apenas D_{AN} causou um valor menor de H a partir de 30 dias, enquanto que para as outras dietas (D_C e D_{AS}) não foram observadas diferenças significativas. Para a nadadeira peitoral (NP) o emprego da D_{AN} causou uma redução a partir de 30 dias, enquanto que essa redução ocorreu com D_{AS} apenas no final do experimento (60 dias) e, para a região da nadadeira caudal (NC), ambas as dietas contendo astaxantina natural e astaxantina sintética causaram

uma significativa redução no valor de H, porém a redução ocorreu em 30 dias para a dieta contendo astaxantina natural, enquanto que com a dieta contendo astaxantina sintética isto ocorreu no final do experimento. Considerando o corpo inteiro, as dietas D_{AN} e D_{AS} causaram redução no valor de matiz a partir de 45 dias, sendo que o menor valor encontrado para D_{AN} foi de $24,7 \pm 0,7$ °.

Tabela 5. Valores do Matiz (H, °) dos juvenis de *A. ocellaris* alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e natural em relação ao tempo.

H°	Dieta	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
RC	Controle	28,5 ± 0,1	26,7 ± 0,8	27,7 ± 0,1	23,9 ± 0,1	24,6 ± 0,1
	Natural	28,5 ± 0,1 ^a	27,0 ± 0,7 ^a	26,9 ± 0,9 ^{ab}	24,2 ± 0,4 ^b	23,3 ± 0,6 ^b
	Sintética	28,5 ± 0,1	29,2 ± 0,9	28,3 ± 0,1	26,5 ± 0,1	26,9 ± 0,4
RD	Controle	25,0 ± 0,5	23,6 ± 0,4	23,1 ± 0,8	24,1 ± 0,1	24,6 ± 0,4
	Natural	25,0 ± 0,5	24,9 ± 0,5	23,5 ± 0,8	23,1 ± 0,1	24,6 ± 0,6
	Sintética	25,0 ± 0,5 ^{ab}	25,4 ± 0,6 ^a	25,1 ± 0,6 ^{ab}	22,2 ± 0,9 ^b	25,4 ± 0,7 ^a
RV	Controle	28,7 ± 0,5	27,5 ± 0,5	29,6 ± 0,7	28,3 ± 0,8	27,8 ± 0,7
	Natural	28,7 ± 0,5 ^a	28,6 ± 0,7 ^a	32,1 ± 0,8 ^b	27,8 ± 0,5 ^a	27,0 ± 0,7 ^a
	Sintética	28,7 ± 0,5	30,4 ± 0,6	30,9 ± 1,3	27,9 ± 1,2	29,2 ± 1,1
NP	Controle	26,2 ± 0,7	26,4 ± 0,6	27,3 ± 0,5	27,0 ± 0,7	26,3 ± 1,3
	Natural	26,2 ± 0,7 ^a	27,2 ± 0,9 ^a	19,2 ± 1,6 ^{bc}	22,8 ± 0,8 ^{ab}	16,4 ± 1,2 ^c
	Sintética	26,2 ± 0,7 ^a	26,8 ± 0,8 ^a	25,2 ± 1,2 ^a	23,6 ± 1,3 ^a	18,8 ± 0,9 ^b
NC	Controle	35,9 ± 1,2	35,3 ± 1,0	35,4 ± 0,3	33,9 ± 1,2	35,1 ± 1,0
	Natural	35,9 ± 1,2 ^a	34,1 ± 1,3 ^a	31,8 ± 1,1 ^{ab}	29,7 ± 0,7 ^b	32,4 ± 0,8 ^{ab}
	Sintética	35,9 ± 1,2	34,6 ± 0,9	33,7 ± 0,9	33,2 ± 0,9	34,6 ± 0,9
CI	Controle	28,9 ± 0,6	27,7 ± 0,5	28,6 ± 0,6	27,5 ± 0,7	27,7 ± 0,6
	Natural	28,9 ± 0,6 ^a	28,4 ± 0,6 ^a	26,6 ± 0,8 ^{ab}	25,4 ± 0,4 ^b	24,7 ± 0,7 ^b
	Sintética	28,9 ± 0,6 ^{ab}	29,3 ± 0,5 ^a	28,0 ± 0,6 ^{ab}	26,0 ± 0,7 ^b	26,3 ± 0,7 ^b

Dados médios ± desvio padrão, n = 15. ANOVA unifatorial. Letras diferentes na mesma linha indica diferenças estatísticas pelo (Teste de Tukey, p<0,05), ausência de letras indicam que não há diferença significativa. Valores médios obtidos da leitura de 25 pixels por região, sendo: RC = região da cabeça, RD = região dorsal, RV = região ventral, ND = nadadeira peitoral e NC = nadadeira caudal.

Saturação

Quanto maior o valor da saturação (S, %) mais acentuada é a cor, ou seja, a coloração recebe menos adição de cinza média em sua composição. A dieta controle e a dieta contendo astaxantina natural apresentaram uma redução significativa na saturação entre o começo e o final do experimento para a região da cabeça (RC). Na região dorsal (RD) houve uma redução dos valores empregando D_C e D_{AS} , sendo melhor observada em 45 dias de experimento (Tabela 6).

A coloração na região ventral (RV) apresentou um decréscimo no valor da saturação (S) a partir de 45 dias para todas as dietas, porém essa diferença foi menor com D_{AS} e D_{AN} , as quais chegaram a um mesmo valor de $82,6 \pm 1,6\%$ em 60 dias de experimento.

Os valores de coloração na região da nadadeira peitoral (NP) apresentaram um comportamento de diminuição do valor de S para todas as dietas, sendo que para D_{AN} houve uma redução no valor a partir de 30 dias de experimento ($77,9 \pm 4,5\%$), mas este comportamento ocorreu inversamente até o final do experimento, tendo um acréscimo no valor para $80,0 \pm 1,8\%$. Na D_{AS} , também houve uma redução do valor de S em 30 dias, porém, em 60 dias, o comportamento continuou em decaimento, chegando a um valor de saturação de $77,5 \pm 1,1\%$. A D_C foi a única dieta que levou à redução de valor de S em 45 dias.

O emprego da D_{AS} causou mudanças em todas as regiões analisadas, entretanto, apenas gerou um maior valor de saturação do que a dieta contendo astaxantina natural na região da nadadeira caudal (NC).

Em quase todas as regiões e corpo inteiro foi possível observar a mudança significativa da saturação, em média após 60 dias. Sendo que a D_{AN} foi a que apresentou maiores valores de S (81% a 93%).

Em relação ao corpo inteiro (CI), o comportamento da saturação foi quase o mesmo com a utilização das três dietas, sendo que a D_{AN} apontou variações na saturação já em 15 dias, enquanto que com D_C e D_{AS} isto somente ocorreu a partir de 45 dias. Mesmo a D_{AN} tendo apresentado um menor valor em 15 dias, ao final do experimento o valor encontrado foi superior em comparação às demais dietas.

Tabela 6. Valores da Saturação (S, %) dos juvenis de *A. ocellaris* alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e natural.

S%	Dietas	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
RC	Controle	85,7 ± 1,7 ^a	83,2 ± 1,8 ^{ab}	81,2 ± 2,4 ^{ab}	75,5 ± 3,7 ^{ab}	74,7 ± 2,1 ^b
	Natural	85,7 ± 1,7	80,7 ± 2,1	83,6 ± 1,7	80,7 ± 1,8	77,5 ± 2,1
	Sintética	85,7 ± 1,7 ^a	84,9 ± 1,5 ^{ab}	86,2 ± 1,5 ^a	81,4 ± 2,2 ^{ab}	79,4 ± 1,8 ^b
RD	Controle	93,8 ± 1,5 ^a	91,5 ± 1,7 ^{ab}	90,0 ± 2,5 ^{ab}	82,2 ± 2,7 ^b	83,2 ± 3,5 ^b
	Natural	93,8 ± 1,5	88,5 ± 1,6	92,7 ± 1,7	91,7 ± 2,3	93,9 ± 1,6
	Sintética	93,8 ± 1,5 ^a	90,7 ± 1,6 ^{ab}	94,6 ± 1,4 ^a	82,7 ± 3,0 ^b	87,9 ± 1,9 ^{ab}
RV	Controle	88,6 ± 1,1 ^a	88,8 ± 1,5 ^a	83,1 ± 2,4 ^{ab}	74,4 ± 2,7 ^b	77,1 ± 1,8 ^b
	Natural	88,6 ± 1,1 ^a	82,9 ± 1,8 ^{ab}	85,3 ± 2,1 ^{ab}	82,4 ± 2,6 ^b	82,6 ± 1,6 ^b
	Sintética	88,6 ± 1,1 ^a	87,5 ± 1,3 ^{ab}	85,5 ± 1,8 ^{ab}	80,0 ± 3,2 ^b	82,6 ± 1,7 ^{ab}
NP	Controle	98,2 ± 1,8 ^a	99,7 ± 0,3 ^a	96,2 ± 1,5 ^{ab}	88,7 ± 2,4 ^b	89,9 ± 2,5 ^b
	Natural	98,2 ± 1,8 ^{ab}	97,5 ± 0,8 ^b	77,9 ± 4,5 ^c	89,4 ± 2,8 ^b	80,0 ± 1,8 ^c
	Sintética	98,2 ± 1,8 ^{ab}	98,8 ± 0,7 ^a	91,3 ± 2,5 ^b	90,4 ± 2,9 ^b	77,5 ± 1,1 ^c
NC	Controle	95,3 ± 1,8 ^a	92,8 ± 1,5 ^{ab}	89,6 ± 2,3 ^{ab}	84,9 ± 3,4 ^b	84,8 ± 3,6 ^b
	Natural	95,3 ± 1,8	90,5 ± 1,7	94,6 ± 2,2	92,8 ± 2,2	92,2 ± 2,4
	Sintética	95,3 ± 1,8	89,1 ± 2,4	91,5 ± 2,1	88,1 ± 2,3	93,1 ± 1,7
CI	Controle	92,3 ± 0,8 ^a	91,2 ± 0,9 ^a	88,0 ± 1,1 ^a	81,1 ± 1,5 ^b	81,9 ± 1,4 ^b
	Natural	92,3 ± 0,8 ^a	88,0 ± 1,0 ^b	86,8 ± 1,3 ^b	87,4 ± 1,2 ^b	85,2 ± 1,1 ^b
	Sintética	92,3 ± 0,8 ^a	90,2 ± 0,9 ^a	89,9 ± 0,8 ^a	84,5 ± 1,3 ^b	84,0 ± 1,0 ^b

Dados médios ± desvio padrão, n = 15. ANOVA unifatorial. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey, $p < 0,05$), ausência de letras indica que não há diferença significativa. Valores médios obtidos da leitura de 25 pixels por região, sendo: RC = região da cabeça, RD = região dorsal, RV = região ventral, ND = nadadeira peitoral e NC = nadadeira caudal. Acompanhamento dos valores em relação ao tempo.

Brilho

Houve alteração nos valores de brilho (B, %) nas regiões ventral e da nadadeira caudal (RV e NC), bem como, considerando o corpo inteiro (CI) com o emprego da D_{AN} , ocorrendo uma diminuição no valor do brilho a partir de 45 dias, tendo o valor de B para corpo inteiro variado entre 26% e 51% ao final do experimento. Essa variação no

brilho não apresentou diferença significativa na coloração das regiões (Tabela 7).

Tabela 7. Valores do brilho (B, %) dos juvenis de *A. ocellaris* alimentados com as dietas contendo astaxantina sintética e natural.

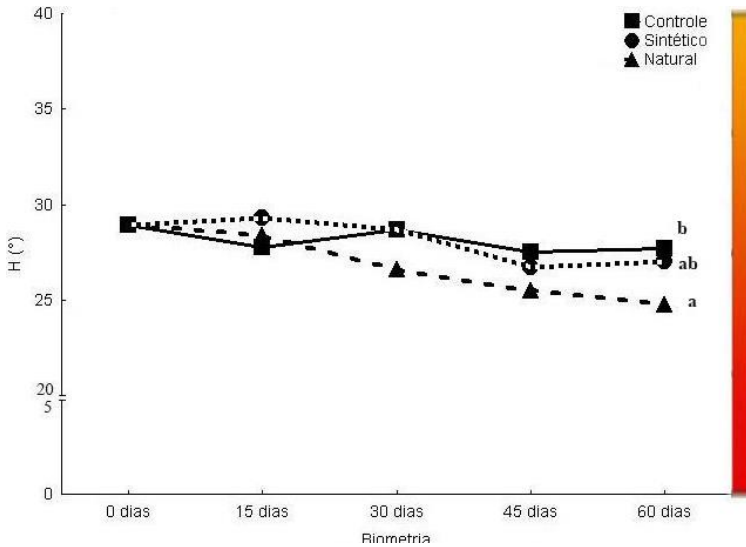
B%	Dietas	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
RC	Controle	51,1 ± 1,7	47,2 ± 1,0	49,8 ± 1,6	45,7 ± 1,8	50,2 ± 0,9
	Natural	51,1 ± 1,7	51,9 ± 1,0	49,0 ± 1,7	50,8 ± 1,1	48,2 ± 1,0
	Sintética	51,1 ± 1,7	51,5 ± 1,0	51,6 ± 1,7	50,3 ± 0,9	52,7 ± 1,0
RD	Controle	31,5 ± 2,5	26,2 ± 1,4	26,0 ± 1,6	30,0 ± 1,9	30,3 ± 2,5
	Natural	31,5 ± 2,5	29,1 ± 1,4	28,4 ± 1,5	26,0 ± 1,4	27,1 ± 1,3
	Sintética	31,5 ± 2,5	30,0 ± 1,2	29,5 ± 2,0	31,7 ± 1,5	31,5 ± 1,7
RV	Controle	44,5 ± 1,5	41,8 ± 0,8	45,0 ± 0,8	42,5 ± 1,1	44,3 ± 1,1
	Natural	44,5 ± 1,5 ^{ab}	43,9 ± 0,9 ^{ab}	48,1 ± 1,3 ^{ab}	42,6 ± 0,8 ^a	44,1 ± 0,7 ^b
	Sintética	44,5 ± 1,5	44,8 ± 0,9	47,0 ± 1,0	45,3 ± 0,7	44,3 ± 0,9
NP	Controle	42,9 ± 1,9	38,6 ± 1,3	40,6 ± 1,2	41,9 ± 1,1	42,5 ± 1,6
	Natural	42,9 ± 1,9	43,0 ± 1,1	41,2 ± 1,3	40,7 ± 0,9	41,6 ± 1,4
	Sintética	42,9 ± 1,9	41,9 ± 1,0	40,3 ± 1,4	42,4 ± 1,0	43,0 ± 1,2
NC	Controle	49,3 ± 2,5	43,5 ± 2,8	43,5 ± 3,3	38,5 ± 2,6	41,8 ± 3,4
	Natural	49,3 ± 2,5 ^a	44,3 ± 2,9 ^{ab}	38,5 ± 2,5 ^b	33,8 ± 2,4 ^b	38,4 ± 2,4 ^b
	Sintética	49,3 ± 2,5	43,0 ± 2,2	41,2 ± 2,6	41,8 ± 2,3	41,0 ± 2,7
CI	Controle	43,8 ± 1,2	39,5 ± 1,1	41,0 ± 1,2	39,9 ± 1,0	41,8 ± 1,2
	Natural	43,8 ± 1,2 ^a	42,5 ± 1,1 ^{ab}	41,0 ± 1,1 ^{ab}	38,8 ± 1,2 ^b	39,89 ± 1,0 ^{ab}
	Sintética	43,8 ± 1,2	42,2 ± 1,0	42,0 ± 1,1	42,3 ± 0,9	42,6 ± 1,1

Dados médios ± desvio padrão, n = 15. ANOVA unifatorial. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey, p<0,05) ausência de letras indica que não há diferença significativa. Valores médios obtidos da leitura de 25 pixels por região, sendo: RC = região da cabeça, RD = região dorsal, RV = região ventral, ND = nadadeira peitoral e NC = nadadeira caudal. Acompanhamento dos valores em relação ao tempo.

Comparação do índice de coloração do corpo inteiro entre D_C , D_{AS} e D_{AN} em relação ao tempo

Abaixo são apresentados os valores médios de coloração do corpo inteiro para o matiz (H , °) (Figura 4), para a saturação (S , %) (Figura 5) e para o brilho (B , %) (Figura 6) ao longo de 60 dias. As diferenças significativas do matiz, saturação e brilho são mostradas através da diferença de letras mostradas nos gráficos. Os tempos que não apresentaram diferença significativa não são mostradas nos gráficos.

Figura 4. Valores médios do matiz (H , °) para o corpo inteiro das dietas controle, astaxantina sintética e astaxantina natural ao longo de 60 dias.



Obs: Dados médios $n = 15$. ANOVA unifatorial ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença pelo Teste Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as dietas em relação ao tempo.

Figura 5. Valores médios da saturação (S, %) para o corpo inteiro das dietas, sendo a dieta controle, dieta com astaxantina sintética e dieta com astaxantina natural ao longo de 60 dias.

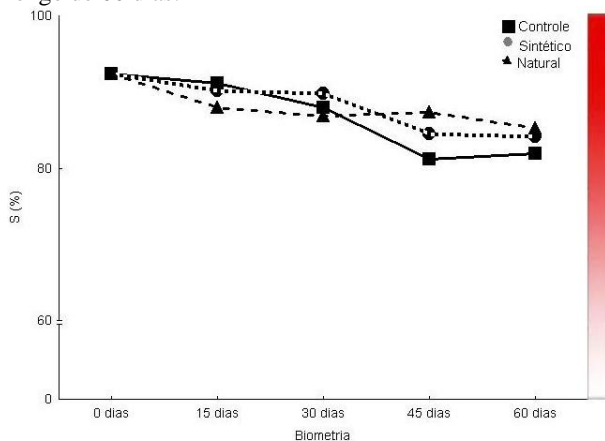
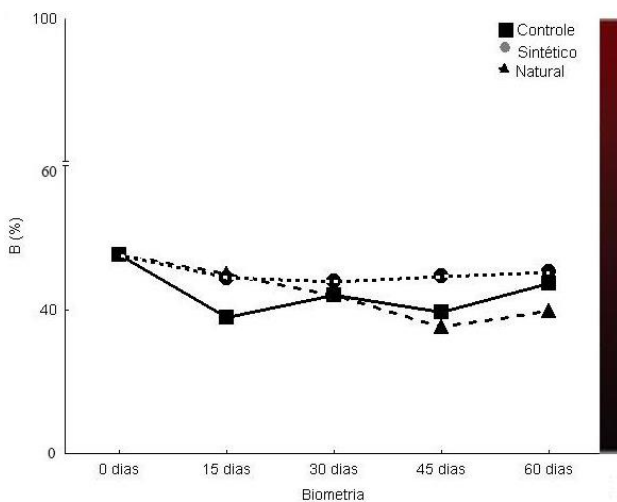


Figura 6. Valores médios do brilho (B, %) para o corpo inteiro das dietas, sendo a dieta controle, dieta com astaxantina sintética e dieta com astaxantina natural ao longo de 60 dias.



DISCUSSÃO

Crescimento e Sobrevivência

Os valores obtidos do peso e do comprimento com o emprego das dietas D_C e D_{AN} mostraram diferença estatística significativa em 30 dias de experimento, porém, a partir desse período até o final do experimento essa diferença não foi significativa (Tabela 3). Os resultados de crescimento foram similares aos encontrados por outros autores em estudos realizados com suplementação da dieta com astaxantina sintética para o peixe-palhaço *A. ocellaris* (SEYEDI et al. 2013), e para peixes de corte, como o salmão do Atlântico *Salmo salar* (WATHNE et al. 1998; BJERKENG et al. 1999; BELL et al. 2000) e para truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (THOMPSON et al. 1995; REHULKA, J. 2000) os quais, relataram não ter havido diferença significativa em relação ao crescimento.

De acordo com a literatura, para os parâmetros de ganho em peso e comprimento não há relatos de resultados utilizando astaxantina natural para peixes ornamentais. Em relação a peixes de corte, a suplementação da dieta com astaxantina natural não influenciou o crescimento e o ganho em peso do pargo-vermelho *Pagrus pagrus* (KALINOWSKI et al. 2004). A suplementação da dieta com biomassa de microalgas, ricas em carotenoides também não causou diferenças significativas para estes parâmetros em experimentos com o peixe-dourado *Carassius auratus* e com carpa-comum *Cyprinus carpio* (GOUVEIA et al. 2003). Uma vez que o crescimento está relacionado à relação de proteína/energia na dieta (SOUTO et al., 2005; ZUANON; SALARO; FURUYA, 2011) e, como os produtos Naturose e CAROPHYLL Pink não são fontes significativas de proteínas, ocorreu o esperado, ou seja, não houve influência nos parâmetros de crescimento.

Com relação à sobrevivência ter sido igual com todas as dietas, os resultados obtidos corroboram os encontrados por Yasir e Qin (2009; 2010), Ho, O'Shea e Pomeroy (2012) e Seyed et al. (2013), os quais também observaram um alto índice de sobrevivência dos peixes independentemente da suplementação das dietas com carotenoides.

Índice de coloração x tempo

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi observado que a suplementação da ração base com astaxantina natural (D_{AN}) foi efetiva na mudança de coloração da pele de juvenis de *A. ocellaris*. Resultados semelhantes foram observados por Yasir e Qin (2010) que empregaram concentrações entre 20, 50 e 100 mg. kg⁻¹ durante 37 dias na alimentação de juvenis de *A. ocellaris*. Estes autores relataram que a concentração de 100 mg. kg⁻¹ foi a que permitiu atingir coloração mais acentuada. Ho, O'Shea e Pomeroy (2012) ao suplementarem a ração com 40, 60, 80 e 160 mg. kg⁻¹ empregando Naturose, observaram que as concentrações de 80 e 160 mg.kg⁻¹ causaram uma coloração mais acentuada em indivíduos de *A. ocellaris* em 90 dias. Ho, Bertran e Lin (2013) reportaram a mudança de coloração de *Premnas biaculeatus* com dietas suplementadas com astaxantina esterificada nas concentrações de 23, 214 e 2350 mg. kg⁻¹ em peixes alimentados por 115 dias.

Ao analisar o matiz de cada dieta em relação ao tempo, observou-se uma redução significativa no valor de H das cinco regiões e do corpo inteiro com o emprego da dieta contendo astaxantina natural (Naturose), sendo que, o matiz variou entre 25° e 29°. Ho, O'Shea e Pomeroy (2012) encontraram valores de matiz de 16° a 28° para concentrações de 80 e 160 mg. kg⁻¹ de Naturose, enquanto Yasir e Qin (2010) reportaram valores entre 41° a 43° em dietas suplementadas com 100 mg. kg⁻¹ de astaxantina sintética. Já para *P. biaculeatus*, os valores do matiz variaram entre 0° e 30° em uma concentração de 214 mg. kg⁻¹ de Naturose na dieta (HO; BERTRAN; LIN, 2013).

A redução no valor do matiz da região ventral (RV) ocorreu mais rapidamente quando comparada a outras regiões, provavelmente devido à existência de maior concentração de gordura nesta região do corpo dos peixes. Sendo a astaxantina natural lipossolúvel (DORE; CYSEWSKI, 2003), isto favorece que este pigmento seja bioacumulado em maior quantidade nos cromatóforos da RV do que nas outras regiões dos peixes (HO; O'SHEA; POMEROY, 2012). Adicionalmente, os índices de coloração nas regiões dorsal e ventral de *A. ocellaris* não são manipulados ou influenciados pelo fotoperíodo ou intensidade de luz (YASIR; QIN, 2009) e nem pela cor de fundo do tanque (background) (YASIR; QIN, 2010), sendo assim, a variação de cor nas regiões ventral e dorsal é atribuída diretamente à alimentação suplementada com astaxantina, sendo importante tanto o tempo de alimentação quanto o o

número de cromatóforos encontrados em cada região (YASIR; QIN, 2009).

Por conta dos valores obtidos de saturação (S), é possível relacionar também a dieta com o emprego de astaxantina natural com a menor variação dos valores da saturação da cor ao longo do tempo, uma vez que os maiores valores encontrados em quatro das cinco regiões analisadas ocorreram com o emprego desta dieta. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram aqueles apresentados por Ho, O'Shea e Pomeroy (2012) e por Ho, Bertran e Lin (2013), nos quais os peixes das espécies *A. ocellaris* e *P. biaculeatus* apresentaram uma elevação nos valores de saturação com a suplementação de astaxantina esterificada natural em sua dieta.

A diminuição dos valores do matiz, a elevação da saturação e a diminuição dos valores do brilho após 60 dias de alimentação com dieta contendo astaxantina natural (D_{AN}) corroboram os dados de Ho, O'Shea e Pomeroy (2012) e Ho, Bertran e Lin (2013), que observaram o mesmo comportamento destas variáveis em *A. ocellaris* e *P. biaculeatus* alimentados com dietas suplementadas com teores mais elevados de astaxantina.

As alterações nos valores de matiz, saturação e brilho em relação aos dias de experimentos expressam um comportamento de adaptação às novas dietas, isso explica o porquê das oscilações das variáveis nos primeiros dias de experimento.

Na análise dos gráficos de H, S e B do presente estudo, foi possível perceber que houve uma intensificação da coloração, mais próxima ao vermelho para a dieta com astaxantina natural em relação ao controle, que gerou uma coloração mais próxima do laranja-amarelado (APÊNDICE B). Sendo que esta alteração foi mais evidente a partir de 45 dias de experimento.

CONCLUSÕES

A suplementação da ração base com astaxantina foi efetiva para que os peixes ficassem mais pigmentados. A dieta suplementada com Naturose foi a mais eficiente na pigmentação dos peixes.

A inclusão da astaxantina sintética e a astaxantina natural não fez com que os peixes tivessem um maior crescimento em termos de peso e de comprimento em relação aos peixes da dieta controle.

Após 45 dias de experimento foi possível visualizar mudanças mais significativas da pigmentação nas diferentes regiões com a

inclusão de astaxantina. Sendo as regiões ventral (RV) e da nadadeira peitoral (NP) as mais pigmentadas em menor tempo de alimentação.

Ao final dos 60 dias de experimento ficou demonstrado que os peixes alimentados com a dieta contendo astaxantina natural foram os que tiveram a coloração mais próximo ao vermelho, comprovando a relação da pigmentação com a suplementação de carotenoides na alimentação e com o tempo de alimentação.

REFERÊNCIAS

- Bergamaschi J M (2010) Terpenos. Jundiaí: Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Terpenoil Tecnologia Orgânica. 7 p.
- Bjerkeng B, et al (1999) Astaxanthin deposition in fillets of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed two dietary levels of astaxanthin in combination with three levels of α -tocopheryl acetate. *Aquaculture Research*, Norway, v. 30, n. 1, p.637-646, mar.
- Cardoso R S, et al (2012) Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da zona da mata mineira. *Bol. Inst. de Pesca*. São Paulo, p. 89-96. dez.
- Christiansen R., Lie O, Torrissen O J (1995) Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo solar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. First-feeding fry. *Aquaculture Nutrition*, [s.l.], v. 1, n. 3, p.189-198, set. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1365-2095.1995.tb00043. x.
- Derner R B, et al (2006) Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, dez. bimestral. Revisão Bibliográfica.
- Diler I, Dilek K (2002) Significance of Pigmentation and Use in Aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Antalya, Turkey, v. 2, n. 1, p.97-99, jan.
- Ghiggi V (2007) Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvisialis*. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnológicos, Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Parana, Curitiba.

Goodwin T W (1962) Carotenoids, their comparative biochemistry. 3. ed. New York: New York, chemical Pub. Co. 378 p.

Green E (2003) International Trade in Marine Aquarium Species: Using the Global Marine Aquarium Database. Marine Ornamental Species, [s.l.], p.29-48, 18 mar. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/9780470752722.ch3.

Ho A L F, O'shea S K, Pomeroy H F (2012) Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. *Aquaculture International*, [s.l.], v. 21, n. 2, p.361-374, 13 jul. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-012-9558-9>.

Ho A L F, Orlando N M, Lin J (2013) Dietary Esterified astaxanthin concentration effect on dermal coloration and chromatophore physiology in Spinecheek Anemonefish, *Premnas biaculeatus*. *Journal Of The World Aquaculture Society*, Florida, v. 44, n. 1, p.76-85, fev.

Lorenz R T, Cysewski G R (2000) Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *TIBTECH*, v. 18, p. 160-167, abr.

Pedrazzani, A S, Ostrensky, N A (2014) 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. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12535>.

Rezende F P (2010) Intensificação da coloração em peixes ornamentais com uso de rações enriquecidas com pigmentos naturais. 2010. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Rhyne, A L et al. (2012). Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The Volume and Biodiversity of Fish Imported into the United States. *Plos One*, [s.l.], v. 7, n. 5, 21 maio. Public Library of Science (PLoS).

Richmond, A. (2004) Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Negev, Israel: Wiley-blackwell. 588 p.

Seyedi M S, et al (2013) Effect of dietary astaxanthin on survival, growth, pigmentation clownfish, *Amphiprion ocellaris*, CUVIER. Indian Journal Of Fundamental And Applied Life Sciences. Iran, p. 391-395. jul.

Silva P C P V (2000) Efeito da utilização de pigmentos carotenoides de síntese na pigmentação da dourada (*Sparus aurata*). 2000. 16 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Instrumentos e Técnicas de Apoio Ao Desenvolvimento Rural, Gestão de Recursos Naturais, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real.

Tanaka Y A, Yamamoto T K, Simpson K L (1992) Biochemical study on the carotenoids in the anemonefish, *Amphiprion* spp. Memoirs of the faculty of fisheries – Kagoshima University, 41:1–8.

Yasir I, Qin J G (2009) Effect of light intensity on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier. J World Aqua Soc 40(3):337–350.

Yasir I, Qin J G (2010) Effect of Dietary Carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. Journal Of The World Aquaculture Society. Louisiana, p. 108-117. jun.

Wathne E, et al (1998) Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. Aquaculture, Norway, v. 159, n. 1, p.217-231, mar.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Associação Brasileira da Indústria Química. **Corantes e pigmentos**. São Paulo, 2011. Disponível em:

<www.abiquim.org.br/corantes/cor_industria.asp>. Acesso em: 16 jul. 2016.

BELL, J. G. et al. Depletion of tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. **The American Society For Nutritional Sciences**. Scotland, p. 1800-1809. 7 fev. 2000.

BERGAMASCHI, J. M. **Terpenos**. Jundiaí: Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Terpenoil Tecnologia Orgânica, 2010. 7 p.

BJERKENG, B. et al. Astaxanthin deposition in fillets of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed two dietary levels of astaxanthin in combination with three levels of α -tocopheryl acetate. **Aquaculture Research**, Norway, v. 30, n. 1, p.637-646, mar. 1999.

BOOTH, M. et al. Effects of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin colour of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.458-464, abr. 2004. Wiley-Blackwell.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01038.x>

CARDOSO, R. S. et al. Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da zona da mata mineira. **Boletim Instituto de Pesca**. São Paulo, p. 89-96. dez. 2012.

CHEN, H. M.; MEYERS, S. P. A rapid quantitative method for determination of Astaxanthin Pigment concentration in oil extracts. **Food Science and Center For Wetland Resources**, Louisiana, v. 61, n. 6, p.1045-1048, jun. 1984. Mensal.

CHRISTIANSEN, R.; LIE, O.; TORRISSEN, O. J. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. First-feeding fry. **Aquaculture Nutrition**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.189-198, set. 1995. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1365-2095.1995.tb00043. x.

CLOTFELTER, E. D.; ARDIA, D. R.; MCGRAW, K. J. Red fish, blue fish: trade-offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.1139-1145, 14 ago. 2007. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/beheco/arm090.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.173-289, maio 2000. Informa UK Limited. DOI: 10.1080/10408690091189257.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, dez. 2006. Bimestral. Revisão Bibliográfica.

DILER, I.; DILEK, K. Significance of Pigmentation and Use in Aquaculture. **Turkish Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences**, Antalya, Turkey, v. 2, n. 1, p.97-99, jan. 2002.

DORE, J.; CYSEWSKI, G. R. **Haematococcus algae meal as a source of natural astaxanthin for aquaculture feeds**: Cyanotech Corporation, 73-4460 Queen Kaahumanu Hwy. #102, Kailua-Kona, Hawaii 96740, USA. 2003. Disponível em: <<http://www.ruscom.com/cyan/web02/pdfs/naturese/nrtl09.pdf>>.

FEEDAP. Scientific Opinion on the safety and efficacy of astaxanthin (CAROPHYLL® Pink 10% CWS) for salmonids and ornamental fish. **Efsa Journal**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.3725-3758, jun. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3725>.

GEORGIEVA, L.; DIMITROVA, T.; ANGELOV, N. **RGB and HSV colour models in colour identification of digital traumas images**. 12. ed. Varna, Bulgaria: Technical University Press, 6 p. 2005. Disponível em: <<http://ecet.ecs.uni-ruse.bg/cst05/Docs/cp/sV/V.12.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2016. Acesso em: 30 jun. 2016.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnológicos, Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GOODWIN, T. W. **Carotenoids, their comparative biochemistry**. 3. ed. New York: New York, chemical Pub. Co., 1962. 378 p.

GREEN, E. International Trade in Marine Aquarium Species: Using the Global Marine Aquarium Database. **Marine Ornamental Species**, [s.l.], p.29-48, 18 mar. 2003. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/9780470752722.ch3.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **The Biomednet Magazine**, Kailua-kona, v. 21, n. 5, p.210-217, mar. 2003.

HO, A. L. F.; O'SHEA, S. K.; POMEROY, H. F. Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. **Aquaculture International**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.361-374, 13 jul. 2012. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-012-9558-9>

HO, A. L. F.; ORLANDO, N. M.; LIN, J. Dietary Esterified astaxanthin concentration effect on dermal coloration and chromatophore physiology in Spinecheek Anemonefish, *Premnas biaculeatus*. **Journal Of The World Aquaculture Society**, Florida, v. 44, n. 1, p.76-85, fev. 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**, [s.l.], v. 244, n. 1-4, p.223-231, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.001>.

KAMATH, S. B. **Biotechnological production of microalgal carotenoids with reference to astaxanthin and evaluation of its biological activity**. 2007. 208 f. Tese (Doutorado) - Curso de Philosophy, Departamento de Biotecnologia, University Od Mysore, Mysore, 2007.

LAIDLIEY, C. W. et al. Development of aquaculture technology for the flame angelfish: *Centropyge loriculus*. **Center For Tropical & Subtropical Aquaculture Regional Notes**. Hawaii, p. 1-7. Maio. 2008.

LA-ROCHE. **CAROPHYLL PINK**: Natural identical astaxanthin for aquaculture. 1999. Hoffmann La-Roche Ltd. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0236-11-Carophyll-Pink-vol170.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

LATSCHA, T. Carotenoids – Their nature and significance in animal feeds. **Basel: F. Hoffmann-LaRoche Ltd**, 1990.

LI, Y. et al. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 165, n. 17, p.1783-1797, nov. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.12.007. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0176161708000023?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **TIBTECH**, v. 18, p. 160-167, April, 2000.

LORENZ, T.; CYSEWSKI, G. R. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and secondary Products – Species of High Potential: *Haematococcus*. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, UK, 2004, p. 281 – 288, 2004.

MARGALITH, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, Israel, v. 1, n. 51, p.431-438, abr. 1999. Trimestral.

MEYES, S. P.; LATSCHA, T. Carotenoids. Crustacean nutrition. Baton Rouge: **World Aquaculture Society**, 1997. P. 164-193.

NGUYEN, K. D. Astaxanthin: A Comparative Case of Synthetic VS. Natural Production. **Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works**. 2013. http://trace.tennessee.edu/utk_chembiopubs/94.

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, 31 jul. 2014. Wiley-Blackwell.
<http://dx.doi.org/10.1111/are.12535>.

REZENDE, F. P. **Intensificação da coloração em peixes ornamentais com uso de rações enriquecidas com pigmentos naturais**. 2010. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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**, [s.l.], v. 7, n. 5, 21 maio 2012. Public Library of Science (PLoS).

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Negev, Israel: Wiley-blackwell, 2004. 588 p.

SEYEDI, M. S. et al. Effect of dietary astaxanthin on survival, growth, pigmentation clownfish, *Amphiprion ocellaris*, CUVIER. **Indian Journal Of Fundamental And Applied Life Sciences**. Iran, p. 391-395. jul. 2013.

SILVA, P. C. P. V. **Efeito da utilização de pigmentos carotenóides de síntese na pigmentação da dourada (*Sparus aurata*)**. 2000. 16 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Instrumentos e Técnicas de Apoio Ao Desenvolvimento Rural, Gestão de Recursos Naturais, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2000.

SOARES, A. T. et al. Improvement of the Extraction Process for High Commercial Value Pigments from *Desmodesmus sp.* Microalgae. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], p.1083-1093, 2016. GN1 Genesis Network.
<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20160004>.

SOUTO, C. N. et al. Relação Energia: Proteína em Dietas para alevinos de Kinguio (*Carassius auratus*). **Sociedade Brasileira Para O Progresso da Ciência**. Goiânia. 2005. p. 1-13. out. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pibic/trabalhos/CRISTIEL.PDF>>. Acesso em: 15 jul. 2016

TANAKA, Y. A.; YAMAMOTO, T. K.; SIMPSON, K. L. **Biochemical study on the carotenoids in the anemonefish, *Amphiprion spp.***

Memoirs of the faculty of fisheries – Kagoshima University. 1992. 41:1–8.

THOMPSON, I. et al. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. **Aquaculture**, Nivelles, v. 133, n. 1, p.91-102, 16 jan. 1995.

UTEX. **Algae Express UTEX 2505 *Haematococcus pluvialis***. 2016. Disponível em: <<https://utex.org/products/algae-express-utex-2505-haematococcus-pluvialis>>. Acesso em: 14 jul. 2016.

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

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

WATHNE, E. et al. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. **Aquaculture**, Norway, v. 159, n. 1, p.217-231, mar. 1998.

WITTENRICH, M. L. (2007) **The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes**, pp. 85. Plaza, Neptune City, New Jersey, USA.

YAMANAKA, Hélio Tadashi et al. **Guia técnico ambiental tintas e vernizes: Série P + L**. São Paulo: Cetesb; Fiesp, 2006. Disponível em: <www.crq4.org.br/downloads/tintas.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2016.

YASIR, I.; QIN, J. G. Effect of light intensity on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier. **Journal Of The World Aquaculture Society**. 2009. 40(3):337–350.

YASIR, I.; QIN, J. G. Effect of Dietary Carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. **Journal Of The World Aquaculture Society**. Louisiana. 2010. p. 108-117. jun.

APÊNDICE

A) Rotina desenvolvida para transformação dos valores de RGB em HSB no software MATLAB R2016a

```

%TANQUE BIOMETRIA TRATAMENTO REGIAO Na R G B
% 1 2 3 4 5 6 7 8
H S B
9 10 11

clear all
clc
close all

%ARRUMAR O ARQUIVO EM TXT - MATRIZ 8Xn SENDO QUE
AS 5 PRIMEIRAS COLUNAS DEVEM
%SER PREENCHIDAS COM 1;
%SALVAR O ARQUIVO COM O NOME E FORMATO:
"DADOS.TXT"
%COLOCAR A ROTINA E O ARQUIVO DENTRO DA MESMA
PASTA,
%ABRIR O MATLAB, CARREGAR A PASTA EM QUESTÃO E
RODAR A ROTINA
%OS VALORES DE HSB CORRESPONDEM AOS DA VARIÁVEL
HSB

%% CARREGAR DADOS
DADOSBRUTOS=load('DADOS.txt');

%% DIMENSIONAMENTO
[nl,nc]=size(DADOSBRUTOS);

%% IDENTIFICAÇÃO RGB
R=DADOSBRUTOS(:,6);
G=DADOSBRUTOS(:,7);
B=DADOSBRUTOS(:,8);

%DIVIDE POR 255 PARA DEIXAR NA ESCALA DE 0 A 1
Rd = R / 255;
Gd = G / 255;

```

Bd = B / 255;

DADOSBRUTOS(:,9) = Rd;

DADOSBRUTOS(:,10) = Gd;

DADOSBRUTOS(:,11) = Bd;

%TANQUE BIOMETRIA TRATAMENTO REGIAO Na R G

% 1 2 3 4 5 6 7

B Rd Gd Bd

8 9 10 11

%%

for i=1:nl

%IDENTIFICADO MÁXIMO MÍNIMO E DELTA DE RGB DA LINHA i

MIN = (min(DADOSBRUTOS(i,9:11)));

MAX = (max(DADOSBRUTOS(i,9:11)));

DELTA = MAX - MIN;

%CALCULAR L(%) DA LINHA i - SOMA DO MAX E MIN DIVIDO POR 2

L = MAX;

Lpercent = L*100;

DADOSBRUTOS(i,14) = Lpercent;

%CALCULAR S DA LINHA i

%If the min and max value are the same,

%it means that there is no saturation.

%if all RGB values are equal you have a shade of grey.

%Depending on how bright it's somewhere between black and white.

%If there is no Saturation, we don't need to calculate the Hue.

%So we set it to 0 degrees.

if DELTA==0

S=0;

H=0;

DADOSBRUTOS(i,12) = H;

DADOSBRUTOS(i,13) = S;

return

else DELTA ~= 0;


```

%DETERMINAÇÃO DO S - quem sabe tem que multiplicar por
100 depois
%CHECANDO NIVEL DE BRILHO
L=L/100;
if L < 0.5
    S=(MAX-MIN)/(MAX)*100;
    DADOSBRUTOS(i,13) = S;
else L > 0.5;
    S=(((MAX-MIN)/(2.0-MAX-MIN))*100);
    DADOSBRUTOS(i,13) = S;
end
%DETERMINAÇÃO DO H
%DEPENDE DE QUAL COR DO RGB TEM MAIOR VALOR

if Rd(i,1) == MAX
    H=(Gd-Bd)/DELTA
    H=H*60;
    DADOSBRUTOS(i,12) = H(i,1);

elseif Gd(i,1) == MAX
    H = (2.0 + ((Bd-Rd)/DELTA));
    H=H*60
    DADOSBRUTOS(i,12) = H(i,1);

elseif Bd(i,1) == MAX
    H = (4.0 + ((Rd-Gd)/DELTA));
    H=H*60;
    DADOSBRUTOS(i,12) = H(i,1);

end
end
L=0;
MAX=0;
MIN=0;
DELTA=0;
i=i+1;
end
HSL(:, :) = DADOSBRUTOS(:,12:14);
HSL

```

B) Fotografia de juvenis de *A. ocellaris* após 60 dias de experimento

Figura 7. Imagens dos peixes ao final do experimento que receberam as dietas: a) D_C, b) D_{AS} e c) D_{AN}.



ANEXO A – Descrição

Protocolo da análise do teor de astaxantinas nas amostras



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Química
Laboratório de Métodos de Extração e Separação

Análise do teor de astaxantina em amostras da UFSC

Fornecedor: Prof. Dr. Roberto Bianchini Denner (UFSC)

Roteiro Experimental

Os solventes de grau HPLC metanol, acetonitrila e diclorometano foram obtidos junto a J. T Backer (Tokyo, Japão). Foi usada água deionizada obtida pelo sistema de purificação de água Elix (Millipore, Billerica, MA, USA). Os padrões *trans* astaxantina e *trans*- β -apo-8'-caroteno (Padrão Interno) foram adquiridos junto a Sigma (St. Louis, MO, USA). A separação analítica foi feita usando a coluna NST C30 (250 mm x 4.6 mm I.D. 5 μ m) da NST (São Carlos, SP, Brasil) para o sistema HPLC-MS-MS

HPLC - Agilent modelo 1290 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), composto por bomba quartenária, autosampler (mantido a 10 °C) e controlador de temperatura de coluna (mantido a 40 °C) e função lavagem da agulha operada antes e depois da injeção por 15 segundos. Detector por espectrometria de massas Linear Ion Trap Quadrupolo (ABSciex 3200 QTRAP[®], modelo 1031491/K) com fonte de ionização APCI com detecção no modo positivo. Temperatura da fonte foi mantida a 450 °C. Curtain gás (CUR): 20; gás de colisão (CAD): alto; corrente nebulizador (NC): 4 μ A; Energia Potencial: 10; Fonte gasosa de íons (Ions source gas - GS1): 45 L.min⁻¹. Os íons

selecionados (Tabela 1) foram monitorados por MRM (multiple reaction monitoring) e o tempo de permanência de 150 ms foi usado para cada transição Q1-Q3. Usou o Software Analyst versão 1.5.2 para a aquisição de dados e Software MutiQuant versão 2.1 para a análise de dados. Os fragmentos monitorados para astaxantina foram em Q1: 597,6 e em Q3: 579,1[M-18]; 561,5[M-18-18]; 473,2; 379,2.

O sistema cromatográfico para ambos os detectores foi operado no modo gradiente, com uma vazão de fluxo de 1 ml. min⁻¹. A fase móvel do sistema HPLC-DAD foi metanol/acetonitrila/água (84:14:2, v/v/v) (A) e diclorometano (B) com o seguinte gradiente: 100% A e 0% B por 11 min, em seguida decresceu para 95% de A em 18 min, 90% de A em 21 min, 85% de A em 24 min, 80% de A em 27 min, 75% de A em 35 min, 50% de A em 40 min, 75% de A em 41 min, e retornou para 100% de A em 43 min, sendo mantida nesta proporção por 7 min, perfazendo um total de 50 min de análise. O volume de injeção foi de 20 µL.

O método de extração foi desenvolvido conforme metodologia proposta por Soares et al. (2006).