



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

Ana Carolina de Araujo Ricardo

***BLEND DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, NA  
HISTOMORFOLOGIA INTESTINAL E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS DE JUVENIS DE PEIXE-PALHAÇO *Amphiprion ocellaris* (CUVIER,  
1830)***

Florianópolis

2020

ANA CAROLINA DE ARAUJO RICARDO

***Blend* de ácidos orgânicos no desempenho zootécnico, na histomorfologia intestinal e na atividade de enzimas digestivas de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Mônica Yumi Tsuzuki, Dr.<sup>a</sup>  
Coorientadora: Kauana Santos de Lima Cipriano, Dr.<sup>a</sup>

Florianópolis

2020

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

Ricardo, Ana Carolina de Araujo

Blend de ácidos orgânicos no desempenho zootécnico, na histomorfologia intestinal e na atividade de enzimas digestivas de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830) / Ana Carolina de Araujo Ricardo ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki, coorientadora, Kauana Santos de Lima Cipriano, 2020.

47 p.

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

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Peixes ornamentais marinhos. 3. Acidificantes. 4. Enzimas digestivas. 5. Prega intestinal. I. Tsuzuki, Mônica Yumi. II. Cipriano, Kauana Santos de Lima. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

ANA CAROLINA DE ARAUJO RICARDO

***Blend* de ácidos orgânicos no desempenho zootécnico, na histomorfologia intestinal e na atividade de enzimas digestivas de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)**

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

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

Profa. Lucélia Hauptli, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Profa. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do Programa

---

Profa. Mônica Yumi Tsuzuki, Dra.  
Orientadora

Florianópolis

2020

Este trabalho é dedicado a todos que se empenham na criação de  
peixes ornamentais marinhos

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Amauri Ricardo e Maria Izabel, pela oportunidade, pelo patrocínio, por entenderem a minha ausência e todo o meu estresse, principalmente durante o experimento, e pelo apoio em mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À minha orientadora, professora Mônica Yumi Tsuzuki pela confiança e oportunidade em fazer parte do Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) por mais esses dois anos, contribuindo para o meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada pela orientação.

À minha coorientadora, Kauana Santos de Lima Cipriano pela ajuda durante o planejamento do experimento, pelas correções, considerações e por sempre estar disponível para esclarecer as minhas dúvidas e atender meus pedidos de socorro mesmo distante.

Aos colegas do LAPOM, Márcia, Danillo, Tânia, Sérgio, Elen, João, Jonathas, Rafinha, Paulinha e Rao pelas comilanças, risadas e parceria. Especialmente à técnica Renata Ozório sempre disposta a ajudar e a deixar meu coração quentinho quando tudo parecia estar dando errado, quando crescer quero ser igual a você, gratiluz. À Helen Rayane pelas contribuições, por sempre sanar as minhas dúvidas rapidamente, pelos bolos maravilhosos e pelo carinho. À Ksenia Skorupa pela ajuda nas rotinas do experimento. À Jeisa Castro pela ajuda nas análises enzimáticas. À querida Salete pelo seu carinho, abraços reconfortantes e pelos seus cafés. Ao Ilson pelas dicas e recomendações. E ao meu amigo Giovanni Busanello pelos memes, pelas manias bizarras, pela ajuda no experimento e pelo apoio nesses cinco anos, tanto no laboratório quanto na minha vida pessoal.

Ao Laboratório de Peixes Marinhos (LAPMAR), especialmente à Vanessa Rocha, João Vitor Manhães, Greice Freitas e Elenice Brasil por todo o apoio, esclarecimento e empréstimo de materiais e equipamentos.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS) por me acolherem tão bem durante as análises histológicas, apesar da minha passagem ter sido rápida foi muito bom trabalhar, almoçar no RU e confraternizar com vocês. Meu agradecimento especial a Tamiris Henrique pelo seu auxílio, tempo, paciência, gentileza e generosidade. És uma profissional na qual me inspiro, muito obrigada pelos seus ensinamentos. Ao professor José Luiz Pedreira Mouriño pelo apoio, recomendações e parceria na execução do experimento.

Ao Professor Carlos Peres pela oportunidade de realizar as análises enzimáticas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos e a Cristina Rios pela generosidade, paciência, ensinamentos e pelo auxílio nas análises enzimáticas durante as várias repetições e longas jornadas de trabalho.

Aos meus amigos e amigas pelos momentos de descontração e lanches, pelas palavras de apoio, por entenderem meus momentos de ausência e por sempre torcerem por mim.

As minhas amigas e professores da pedagogia pela compreensão, por todo o aprendizado, discussões, choros e brincadeiras, vocês foram muito importantes nessa etapa da minha vida acadêmica, tornaram minhas noites mais leves e alegres, acrescentaram em muitos aspectos da minha vida, sou grata a cada um.

Ao meu namorado Gabriel Santini por acreditar em mim, pelo incentivo, pela compreensão e companheirismo. Pela ajuda durante todo o experimento, por todas as biometrias, as dissecações, pelas madrugadas, finais de semana e feriados no laboratório. Por todo carinho e por todo o seu amor. Obrigada por tanto. Te amo.

Ao meu filho de quatro patas, Chico, por existir, me transmitir paz, tranquilidade e por me proporcionar inúmeras sessões de cãoterapia.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa da Pós-graduação em Aquicultura, especialmente ao Carlito, sempre solicito.

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

## RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de um *blend* de ácidos orgânicos comercial (126,5 g kg<sup>-1</sup> de formiato de amônio, 115,5 g kg<sup>-1</sup> de ácido fórmico, 82,5 g kg<sup>-1</sup> de ácidos graxos vegetais, 66,0 g kg<sup>-1</sup> de ácido propiônico e 55,0 g kg<sup>-1</sup> de ácido acético) na dieta de juvenis de 21 dias após a eclosão (DAE) (peso médio de 21 mg) do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* durante 77 dias. Foram testados, em triplicata, cinco tratamentos com diferentes concentrações do *blend* de ácidos orgânicos: 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15), 20 g kg<sup>-1</sup> (T20), e dieta sem suplementação (T0). Para o pH das dietas, assim como para as análises enzimáticas e histológicas foram realizadas duas coletas, no 49º dia de experimento (70 DAE) e no 77º dia de experimento (98 DAE). Os parâmetros de desempenho zootécnico (sobrevivência, ganho de peso, taxa de crescimento específico em peso, crescimento diário em comprimento, consumo de ração, taxa de conversão alimentar e fator de condição) foram avaliados após 15, 30, 45, 49, 65 e 77 dias de experimento. O pH da ração diminuiu proporcionalmente com o aumento da suplementação do *blend* de ácidos orgânicos na dieta ( $p < 0,05$ ). O desempenho zootécnico e a atividade das enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase) não foram influenciadas pela suplementação do *blend* de ácidos orgânicos na dieta. No entanto, após 77 dias de experimento, o tratamento com inclusão de 15 g kg<sup>-1</sup> apresentou alterações benéficas na morfologia intestinal, indicando um maior aproveitamento dos nutrientes da ração. Dessa forma, um período maior de suplementação pode melhorar o desempenho de crescimento e a saúde de juvenis de *A. ocellaris*.

**Palavras-chave:** Aquicultura. Peixes ornamentais marinhos. Acidificantes. Enzimas digestivas. Prega intestinal.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of a commercial organic acids blend (126,5 g kg<sup>-1</sup> of ammonium formate, 115,5 g kg<sup>-1</sup> of formic acid, 82,5 g kg<sup>-1</sup> of vegetables fatty acids, , 66,0 g kg<sup>-1</sup> of propionic acid and 55,0 g kg<sup>-1</sup> of acetic acid) in the diet for juveniles with 21 days after hatch (DAH) (initial mean weight of 21 mg) of clownfish *Amphiprion ocellaris* during 77 days. Five different levels of the organic acids blend were tested in triplicates: 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15), 20 g kg<sup>-1</sup> (T20), and the diet without supplementation (T0). For the pH of the diets, as well as the enzymatic and histological analyzes, two collects were realized, on the 49th day of experiment (70 DAH) and 77th day of experiment (98 DAH). The zoothechnical performance parameters (survival, weight gain, specific growth rate, daily growth in length, ration consumption, feed conversion rate and condition factor) were evaluated after 15, 30, 45, 49, 65 and 77 days of experimente. The pH of the diets decreased proporcionally with the increase of the supplementation of organic acids blend in the diet (p<0,05). The zoothechnical performance and activity of digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin and amylase) were not influenced by the supplementation of organic acids blend in the diet. However, after 77 days of experiment, the treatment with inclusion of 15 g kg<sup>-1</sup> showed beneficial changes in intestinal morphology, indicating a greater use of nutrients in the feed. Thus, a longer period of supplementation can improve the growth performance and health of *A. ocellaris* juveniles.

**Keywords:** Aquaculture. Marine Ornamental Fish. Acidifiers. Digestive enzymes. Intestinal villi.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Medidas morfométricas do intestino de *A. ocellaris*. A) Altura das pregas; B) Largura das pregas; C) Células caliciformes; D) Área. .... 27
- Figura 2 - Análise do pH das dietas experimentais dos grupos sem suplementação (T0), suplementada com *blend* de ácido orgânico 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20). Dados apresentados como média ± desvio padrão..... 29
- Figura 3 - Microfotografia da porção média intestinal de juvenis de *A. ocellaris* com 98 DAE alimentados com a dieta controle (sem suplementação- A) e com dieta contendo 5 g kg<sup>-1</sup>, 10 g kg<sup>-1</sup>, 15 g kg<sup>-1</sup> e 20 g kg<sup>-1</sup> de um *blend* de ácidos orgânicos (B, C, D e E, respectivamente). .... 32
- Figura 4 - Peso (g) e comprimento total (cm) de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com dietas suplementadas com o *blend* de ácidos orgânicos 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) e sem suplementação (T0) após, 15 (36 DAE), 30 (51 DAE), 45 (66 DAE), 49 (77 DAE), 65 (86 DAE) e 77 (98 DAE) dias de experimento. Dados apresentados como média ± desvio padrão. .... 33

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Morfometria da porção média intestinal de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com dietas suplementadas com *blend* de ácidos orgânicos 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) e sem suplementação (T0) aos 70 DAE e 98 DAE. Dados apresentados como média ± desvio padrão. .... 31
- Tabela 2 - Parâmetros de desempenho de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com dietas suplementadas com *blend* de ácidos orgânicos 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) e sem suplementação (T0) após 77 dias de experimento (98 DAE). Dados apresentados como média ± desvio padrão. .... 34
- Tabela 3 - Atividade enzimática específica de tripsina, quimotripsina e amilase (U mg de proteína<sup>-1</sup>) nos juvenis de *Amphiprion ocellaris* com 70 e 98 DAE alimentados com dieta suplementada com 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) de um *blend* de ácidos orgânicos e dieta controle, sem suplementação (T0). Dados apresentados como média ± desvio padrão. .... 35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
<b>1.1.1</b>	<b>Histórico e contexto do mercado de peixes ornamentais.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Os peixes-palhaço <i>Amphiprion ocellaris</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Aditivos alimentares .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Ácidos orgânicos .....</b>	<b>16</b>
1.2	OBJETIVOS.....	18
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>18</b>
1.3	ESTRUTURA DO TRABALHO .....	19
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>20</b>
2.1	INTRODUÇÃO.....	20
2.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
<b>2.2.1</b>	<b>Origem dos animais e condições gerais de manutenção .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Amostragem dos animais e análises laboratoriais .....</b>	<b>25</b>
<i>2.2.3.1</i>	<i>Análise do pH das dietas.....</i>	<i>25</i>
<i>2.2.3.2</i>	<i>Análise biométrica.....</i>	<i>25</i>
<i>2.2.3.3</i>	<i>Análise histológica.....</i>	<i>26</i>
<i>2.2.3.4</i>	<i>Análise enzimática.....</i>	<i>27</i>
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
2.4	RESULTADOS .....	29
<b>2.4.1</b>	<b>Parâmetros físico-químicos da água.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.2</b>	<b>pH das dietas experimentais.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Análise histológica .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Desempenho zootécnico .....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Atividade enzimática .....</b>	<b>34</b>
2.5	DISCUSSÃO.....	35
2.6	CONCLUSÃO.....	39
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIA DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>44</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Histórico e contexto do mercado de peixes ornamentais

A aquariofilia ou aquarismo consiste na manutenção de peixes, plantas ou outros organismos aquáticos com finalidade ornamental (CARRACA, 2016). Essa prática é um dos *hobbies* mais populares do mundo, com surgimento datado em 1596, quando Chang Chi'En-Tê escreveu um livro sobre peixes vermelhos criados em ambientes domésticos, forma de alimentação e cuidados com a temperatura (BOTELHO FILHO, 1990). Porém, já em 50 D.C, painéis de vidro foram levados à Roma para substituir as paredes de mármore dos tanques possibilitando visualizar os peixes pelas laterais. No século X, o peixe dourado (*Carassius auratus*) já desempenhava um papel significativo como animal de estimação na China, tornando-se muito popular entre as classes dominantes (BRUNNER, 2005).

Ao entrevistar proprietários de aquários, Kidd e Kidd (1999) relataram que os principais benefícios de possuir aquários em casa mencionados pelos aquaristas foram: efeitos calmantes, relaxantes e redutores de estresse e ansiedade. Cracknell *et al.* (2016) descobriram que o fato de observar peixes em aquário, principalmente aqueles com maior diversidade de espécies, resultaram em reduções na frequência cardíaca e no aumento do humor do espectador, resultando em saúde e bem-estar dos observadores. Quando pessoas com Alzheimer são expostas a aquários, os comportamentos disruptivos diminuem e há um aumento na ingestão de alimento durante as refeições, resultando em aumento no peso corporal e diminuição no uso de suplementos nutricionais (EDWARDS; BECK, 2002). Essas descobertas ajudam a explicar os benefícios e a popularidade dos aquários e dos organismos aquáticos ornamentais.

De acordo com dados da TechSci Research (2017), o mercado global de peixes ornamentais chegou a US\$ 4,2 bilhões em 2017 e deverá crescer em valor, entre 2019 e 2024, a uma taxa anual superior a 7,85%. A previsão é que alcance cerca de US\$ 6,2 bilhões até 2024. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Instituto Pet Brasil, foram contabilizados 139,3 milhões de animais de estimação em 2018, sendo os peixes o quarto segmento de animal de estimação mais prevalente nas residências brasileiras, 19,1 milhões de espécimes. Além disso, os peixes ornamentais tiveram um crescimento de 6,1% desde os últimos dados disponíveis de 2013, atrás apenas dos gatos que tiveram alta de 8,1% durante o mesmo período (INSTITUTO PET BRASIL, 2019).

O interesse crescente dos aquaristas acabou abrangendo o ambiente marinho, e assim impulsionando o comércio de espécies ornamentais marinhas. A partir da década de 60, algumas espécies de peixe-palhaço e donzelas (família Pomacentridae) já chegavam à casa dos aquaristas, e o desenvolvimento do sal marinho sintético proporcionou aos moradores do interior a possibilidade de manter aquários marinhos. Nos anos 70 e 80, com os avanços tecnológicos no controle de temperatura, iluminação, técnicas de filtragem, e na análise química da água, houve um aumento da acessibilidade e da popularidade do *hobby* (PALMTAG, 2017).

O comércio de peixes ornamentais marinhos é uma indústria mundial que tem como alvo uma quantidade e diversidade de espécies de peixes de recife, fornecendo uma importante fonte de receita para países exportadores, particularmente nações em desenvolvimento do Sudeste Asiático (LEAL *et al.*, 2016). O interesse crescente pelo aquarismo resultou na expansão do comércio em mais de 125 países, tornando-se uma indústria multimilionária estimada em US\$ 200 a 330 milhões de dólares. Cerca de 20 a 24 milhões de peixes marinhos ornamentais pertencentes a aproximadamente 1471 espécies diferentes são comercializados anualmente em todo o mundo (WABNITZ *et al.*, 2003; DEY, 2016).

Nos Estados Unidos da América e na Europa, à medida que os preços se tornaram mais acessíveis, o setor de aquários marinhos se expandiu rapidamente. As espécies de peixes marinhos constituem mais de 15% do valor de mercado, sendo aproximadamente 98% coletados na natureza enquanto o restante é criado em cativeiro (DEY, 2016). Apesar do crescimento e diversificação do comércio, ainda faltam informações sobre o volume e a diversidade de espécies extraídas do ambiente natural. Sem esses dados, a sustentabilidade do comércio é questionada (RHYNE *et al.*, 2012).

Com a expansão da aquariofilia, atrelado ao número elevado de animais selvagens capturados para suprir o mercado, a aquicultura é percebida como uma alternativa sustentável para a aquisição dos peixes ornamentais marinhos (POUIL *et al.*, 2019).

A piscicultura ornamental é a produção de peixes em cativeiro, envolvendo reprodução, larvicultura e engorda, com finalidade comercial. Com os avanços no transporte aéreo, a partir da década de 30, o desenvolvimento de tecnologia de manutenção e reprodução de ornamentais fortaleceu o comércio, facilitando a compra de equipamentos e espécies de diferentes lugares do mundo em lojas especializadas (RIBEIRO; LIMA; FERNANDES, 2010).

Em termos econômicos, o cultivo de peixes ornamentais marinhos é considerado um dos mais rentáveis na aquicultura, e o valor unitário do peixe ornamental é maior do que os peixes para alimentação humana (SATAM *et al.*, 2018). Para alcançar o equilíbrio econômico-

ambiental, a criação de ornamentais marinhos requer aprimoramento através de metodologias mais eficazes estabelecidas por meio de pesquisas científicas sólidas. Durante as últimas décadas, o esforço de cientistas, empresários do ramo, aquaristas profissionais e domésticos já resultaram no sucesso do cultivo de centenas de espécies ornamentais marinhas (PALMTAG, 2017).

### 1.1.2 Os peixes-palhaço *Amphiprion ocellaris*

Os peixes-palhaço, família Pomacentridae, subfamília Amphiprioninae, compreendem 30 espécies, todos do gênero *Amphiprion*, exceto o peixe-palhaço maroon *Premnas biaculeatus*, do gênero *Premnas* (WILKERSON, 2003). De acordo com Rhyne *et al.* (2012), mais de vinte milhões de peixes marinhos são comercializados atualmente e mais da metade de todo o volume é representado pela família Pomacentridae. *Amphiprion ocellaris*, popularmente denominado de peixe-palhaço comum, é uma das espécies mais populares no aquarismo marinho (KODAMA *et al.*, 2011). Distribui-se naturalmente nas Ilhas Andaman e Nicobar (mar de Andaman), arquipélago Indo-malaio, Filipinas, Noroeste da Austrália, costa do Sudeste da Ásia para o norte, até as ilhas Ryukyu (THORNHILL, 2012).

Embora o sucesso das espécies de peixes-palhaço no comércio de aquários se deva em parte à sua incrível diversidade de cores e simbiose com as anêmonas, elas também têm a vantagem de serem fáceis de criar em cativeiro (OLIVOTTO; GEFFROY, 2017). Um dos fatores que intensificou o desenvolvimento da indústria da aquicultura ornamental marinha foi o sucesso de Martin Moe na criação do peixe-palhaço *A. ocellaris* em laboratório no início dos anos 1970. Moe liderou a primeira produção comercial de peixes ornamentais marinhos com o início da Aqualife Research Corporation em Walkers Cay, Bahamas em 1972 (TELLOCK, 1996 *apud* PALMTAG, 2017).

Peixes-palhaço apresentam inúmeras vantagens biológicas pois desovam regularmente em condições de laboratório, as larvas podem ser facilmente alimentadas com zooplâncton convencional (rotíferos e *Artemia*), apresentam elevada taxa de crescimento e sobrevivência, atingindo o estágio de juvenil em pouco tempo de larvicultura, e exigem tanques pequenos. Estas vantagens são a base para a possível utilização dos peixe-palhaços como um novo modelo animal experimental. Devido a curta fase larval, é possível utilizá-los para testar novas dietas e elucidar importantes aspectos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento dos peixes marinhos (OLIVOTTO; GEFFROY, 2017).

Entretanto, para permitir uma produção mais eficiente e sustentável ainda é necessário aprimorar as técnicas de cultivo e aumentar a compreensão de muitos aspectos, como por exemplo, das necessidades nutricionais e doenças na produção intensiva (CALADO *et al.*, 2017).

### **1.1.3 Aditivos alimentares**

O crescimento da atividade aquícola veio acompanhado de práticas prejudiciais para os animais e para os humanos, como o uso generalizado e irrestrito de antibióticos para a prevenção de enfermidades e como promotor de crescimento. Essa prática resultou no surgimento de bactérias patogênicas resistentes, em bioacumulação de resíduos de antibióticos na carne e em alterações da flora bacteriana, nos sedimentos e na coluna de água (CABELLO, 2006).

Tendo em vista a proibição ou redução da utilização de antibióticos como promotor de crescimento em todo o mundo, esforços para promover o uso de aditivos zootécnicos ao uso dessas substâncias, que inibem o nível de bactérias patogênicas, prevenindo doenças, melhorando o bem-estar animal, promovendo o crescimento, melhorias no aproveitamento de nutrientes e economia no custo com a alimentação dos animais, vem sendo cada vez mais incentivado (DEFOIRDT *et al.*, 2009).

De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 30 de novembro de 2004, aditivo alimentar é “substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais” (BRASIL, 2004). Entre os mais estudados atualmente, estão os probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas exógenas, extratos vegetais e fitoterápicos. De forma geral, estes aditivos podem estimular o sistema imunológico dos peixes, tornando-os mais resistentes a patógenos, e melhorando o desempenho e o bem-estar animal. Estudos sobre o efeito desses aditivos na nutrição animal vem cada vez mais ganhando importância (RODRIGUES; MEURER; BOSCOLO, 2015).

### 1.1.4 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são considerados como quaisquer substâncias de estrutura geral R-COOH (KOH *et al.*, 2016). Normalmente encontrados na natureza como componentes de tecidos vegetais e animais, os ácidos orgânicos são formados por meio da fermentação microbiana no trato intestinal constituindo parte importante do suprimento energético dos animais hospedeiros (COLONI, 2008). De acordo com Rodrigues, Meurer e Boscolo (2015), os ácidos orgânicos são constituintes naturais de diversos alimentos, ocorrendo no trato digestivo e em produtos intermediários do metabolismo dos animais, agindo como aditivos promotores de crescimento na ração.

Os ácidos orgânicos, como o ácido propiônico, são utilizados há mais de 30 anos como aditivos para reduzir o crescimento bacteriano na ração animal e assim, preservar sua qualidade. Mas, se forem adicionados ao alimento em quantidades ideais, podem promover melhorias no desempenho e benefícios à mucosa intestinal, dessa forma, reduzindo os custos com alimentação e o tempo de produção (FREITAG, 2007; SILVA *et al.*, 2015).

Na nutrição animal, os acidificantes exercem seus efeitos sobre o desempenho por meio de três mecanismos diferentes: (a) no alimento, funcionam como agentes conservantes para prolongar a vida útil de ingredientes alimentares, reduzindo o pH do alimento, inibindo o crescimento microbiano; (b) no trato intestinal do animal através da liberação de íons H<sup>+</sup>, os ácidos orgânicos inibem o crescimento de bactérias gram-negativas. Os ácidos penetram na parede celular e liberam prótons no citoplasma, com isso, a bactéria consome grande quantidade de ATP para manter o pH intracelular e exportar o excesso de prótons. Esse alto gasto de ATP causa uma depleção energética e posteriormente a morte celular. (c) no metabolismo do animal: a maioria dos ácidos orgânicos possuem altos valores de energia bruta e são geralmente absorvidos pelos epitélios intestinais por difusão passiva e podem ser usados em várias vias metabólicas para geração de energia, podendo afetar a ação de enzimas digestivas através da redução do pH da dieta (LUCKSTADT, 2008; DEFOIRDT *et al.*, 2009).

Outra vantagem é que alguns ácidos orgânicos podem atuar como fonte energética preferencial para as células intestinais e assim estimular o crescimento e integridade da mucosa e promover a proteção das paredes intestinais e contra agentes patógenos, reduzindo sua presença no intestino. Alguns ácidos podem ainda, por meio da proliferação de enterócitos, melhorar a capacidade de absorção de nutrientes (SAKATA, 1987; MACHINSKY *et al.*, 2010).

Dentre os ácidos orgânicos mais utilizados comercialmente estão o ácido fórmico, o propiônico, o láctico, o butírico e o cítrico (SILVA *et al.*, 2015). Blank *et al.* (2012) verificaram

que a suplementação com ácido fórmico pode aumentar a eficiência da enzima exógena fitase e na absorção de fósforo em suínos. Vielma e Lall (1997) testaram a adição de ácido fórmico na dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e verificaram uma diminuição do pH intestinal e na digestibilidade aparente de fósforo, magnésio e cálcio. Mine e Boopathy (2011) observaram que o uso isolado de alguns ácidos orgânicos, como ácido fórmico, acético, propiônico e butírico, inibem o crescimento de vibrios patogênicos para camarões marinhos, sendo que o ácido fórmico apresentou o efeito inibitório mais forte, seguido pelo ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico. Sakata (1987) verificou que a inclusão dos ácidos acético, propiônico e butírico aumenta a superfície de absorção intestinal para ratos. Paul *et al.* (2007) concluíram que a utilização do formiato de amônio para frangos de corte melhorou a taxa de conversão alimentar e aumentou a altura das pregas intestinais e com isso, promoveu uma melhor utilização dos nutrientes.

Após as experiências em alimentação de suínos e aves, uma grande variedade de ácidos orgânicos e seus sais foram testados em dietas para aquicultura. Durante a última década, houve maior compreensão sobre a importância da microbiota intestinal de animais aquáticos em relação a sua nutrição e a saúde. A inibição da colonização de microrganismos patogênicos traz benefícios à mucosa intestinal, favorecendo a estrutura das pregas intestinais e, garantindo maior área de absorção de nutrientes e saúde aos animais (SILVA *et al.*, 2015).

Cada ácido orgânico possui propriedades físicas e químicas específicas, portanto, o uso de um *blend* de ácidos orgânicos pode ter um espectro mais amplo de atividade antimicrobiana, e efeitos sinérgicos no desempenho de crescimento e utilização de nutrientes. Além disso, o uso do *blend* de ácidos orgânicos constitui uma estratégia para superar a inconsistência das pesquisas com o uso de apenas um ácido orgânico na dieta de animais aquáticos (NG; KOH, 2017).

Estudos comprovaram que a inclusão de *blend* de ácidos orgânicos em dietas melhora os parâmetros do desempenho zootécnico, a digestibilidade, e aumenta as pregas intestinais em suínos e aves (FRANCO *et al.*, 2005; VIOLA *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2014; KOWALSKI *et al.*, 2015). Trabalhos com organismos aquáticos indicaram benefícios na suplementação com *blend* de ácidos orgânicos. Em juvenis de truta arco-íris, a suplementação da dieta com um *blend* comercial de ácidos orgânicos (BioAcid Ultra) melhorou o desempenho zootécnico, porém, não houve diferença significativa na atividade enzimática (SAEI *et al.*, 2016). A inclusão de ácidos orgânicos na dieta do “red drum” (*Sciaenops ocellatus*) melhorou o desempenho de crescimento devido a um incremento na atividade das enzimas digestivas (pepsina, tripsina, lipase, amilase, leucina-aminopeptidase e fosfatases) (CASTILLO *et al.*,

2014). Addam *et al.* (2019) avaliaram os efeitos da suplementação alimentar com um *blend* de ácidos orgânicos, associado ao óleo essencial de *Lippia origanoides* para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). A suplementação com um *blend* de ácidos orgânicos melhorou a saúde intestinal e a sobrevivência de juvenis de tilápia, assim como o *blend* de ácidos orgânicos associado ao óleo essencial aumentou a altura das pregas intestinais e as células caliciformes. A inclusão de um *blend* com ácido fórmico, ácido propiônico e propionato de cálcio melhorou o desempenho zootécnico (ganho em peso, taxa de crescimento e taxa de conversão alimentar) de tilápia-do-Nilo (REDA *et al.*, 2016).

A resposta do uso de ácidos orgânicos é espécie-específica e pode variar com a idade dos animais. Assim, resultados provenientes da experimentação com uma espécie não permite que sejam prontamente aplicados a outra. Torna-se então necessário desenvolver novos estudos, particularizando situações e adaptando os novos conhecimentos à cada espécie (CAVALHEIRO *et al.*, 2014).

Uma vez que, os resultados de estudos disponíveis na literatura indicam potencial promissor dos ácidos orgânicos como mitigador de infecções bacterianas, prevenindo doenças, bem como proporcionando um aumento das taxas de sobrevivência e de crescimento, este estudo visa aprimorar a tecnologia de cultivo de *A. ocellaris* através do uso de ácidos orgânicos como suplementos alimentares na fase de engorda deste peixe.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Contribuir com o aprimoramento da tecnologia de cultivo de peixes ornamentais marinhos por meio da avaliação da suplementação alimentar com um *blend* de ácidos orgânicos (formiato de amônio, ácido fórmico, ácidos graxos vegetais, ácido propiônico e ácido acético) em juvenis do peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*).

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Mensurar os índices zootécnicos (taxa de crescimento específico em peso, ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração diário, crescimento diário em comprimento e sobrevivência) de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com uma dieta suplementada com diferentes níveis de um *blend* de ácidos orgânicos.

- Avaliar o efeito de diferentes níveis do *blend* de ácidos orgânicos suplementados na dieta na atividade de enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase) de juvenis de *A. ocellaris*.
- Verificar os efeitos da suplementação dietética de diferentes níveis do *blend* de ácidos orgânicos na morfologia intestinal de juvenis de *A. ocellaris*.

### 1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

A dissertação está dividida em dois capítulos: o primeiro referente a introdução geral e o segundo refere-se ao artigo intitulado “*Blend* de ácidos orgânicos altera a histomorfologia intestinal de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)” que será submetido a revista científica Aquaculture Research.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### BLEND DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALTERA A HISTOMORFOLOGIA INTESTINAL DE JUVENIS DE PEIXE-PALHAÇO *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)

#### RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de um *blend* de ácidos orgânicos comercial (126,5 g kg<sup>-1</sup> de formiato de amônio, 115,5 g kg<sup>-1</sup> de ácido fórmico, 82,5 g kg<sup>-1</sup> de ácidos graxos vegetais, 66,0 g kg<sup>-1</sup> de ácido propiônico e 55,0 g kg<sup>-1</sup> de ácido acético) na dieta de juvenis de 21 dias após a eclosão (DAE) (peso médio de 21 mg) do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* durante 77 dias. Foram testados, em triplicata, cinco tratamentos com diferentes concentrações do *blend* de ácidos orgânicos: 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15), 20 g kg<sup>-1</sup> (T20), e dieta sem suplementação (T0). Para o pH das dietas, assim como para as análises enzimáticas e histológicas foram realizadas duas coletas, no 49º dia de experimento (70 DAE) e no 77º dia de experimento (98 DAE). Os parâmetros de desempenho zootécnico (sobrevivência, ganho de peso, taxa de crescimento específico em peso, crescimento diário em comprimento, consumo de ração, taxa de conversão alimentar e fator de condição) foram avaliados após 15, 30, 45, 49, 65 e 77 dias de experimento. O pH da ração diminuiu proporcionalmente com o aumento da suplementação do *blend* de ácidos orgânicos na dieta ( $p < 0,05$ ). O desempenho zootécnico e a atividade das enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase) não foram influenciadas pela suplementação do *blend* de ácidos orgânicos na dieta. No entanto, após 77 dias de experimento, o tratamento com inclusão de 15 g kg<sup>-1</sup> apresentou alterações benéficas na morfologia intestinal, indicando um maior aproveitamento dos nutrientes da ração. Dessa forma, um período maior de suplementação pode melhorar o desempenho de crescimento e a saúde de juvenis de *A. ocellaris*.

**Palavras-chave:** Peixes ornamentais marinhos. Acidificantes. Enzimas digestivas. Prega intestinal

#### 2.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de peixes ornamentais marinhos é considerado uma das atividades mais rentáveis na aquicultura (SATAM *et al.*, 2018). Para alcançar um equilíbrio entre viabilidade econômica e práticas ambientalmente saudáveis, a criação de ornamentais marinhos requer melhorias através de metodologias eficazes estabelecidas por meio de pesquisas científicas sólidas. Durante as últimas décadas, o esforço de cientistas, empresários do ramo, aquaristas profissionais e domésticos resultaram no sucesso do cultivo de centenas de espécies ornamentais marinhas (PALMTAG, 2017).

*Amphiprion ocellaris*, popularmente conhecido como peixe-palhaço comum, é uma das espécies mais populares no aquarismo marinho (KODAMA *et al.*, 2011). De forma geral, peixes-palhaço apresentam inúmeras vantagens biológicas pois desovam regularmente em condições de laboratório, as larvas podem ser facilmente alimentadas com zooplâncton convencional (rotíferos e *Artemia*), apresentam elevada taxa de crescimento e sobrevivência, atingindo o estágio de juvenil em pouco tempo de larvicultura, além do que, exigem tanques pequenos. Estas vantagens são a base para a possível utilização dos peixe-palhaços como um novo modelo animal experimental. Devido a curta fase larval, é possível utilizá-los para testar novas dietas e elucidar importantes aspectos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento dos peixes marinhos (OLIVOTTO; GEFFROY, 2017).

Entretanto, para permitir uma produção mais eficiente e sustentável de peixes ornamentais marinhos, incluindo os peixes-palhaço, ainda é necessário aprimorar as técnicas de cultivo e aumentar a compreensão de muitos aspectos, como por exemplo, das necessidades nutricionais e doenças na produção intensiva (CALADO *et al.*, 2017).

A fim de promover a saúde, o bem-estar animal, melhorias no aproveitamento de nutrientes e economia na alimentação dos animais, o uso de aditivos zootécnicos vem sendo incentivado, dentre elas, os ácidos orgânicos. Normalmente encontrados na natureza como componentes de tecidos vegetais e animais, os ácidos orgânicos são formados por meio da fermentação microbiana no trato intestinal constituindo parte importante do suprimento energético dos animais hospedeiros (COLONI, 2008).

Na nutrição animal, os acidificantes exercem seus efeitos sobre o desempenho por meio de três mecanismos diferentes: (a) no alimento, funcionam como agentes conservantes para prolongar a vida útil de ingredientes alimentares, reduzindo o pH do alimento, inibindo o crescimento microbiano; (b) no trato intestinal do animal através da liberação de íons H<sup>+</sup>, os ácidos orgânicos inibem o crescimento de bactérias gram-negativas. Os ácidos penetram na parede celular e liberam prótons no citoplasma, com isso, a bactéria consome grande quantidade de ATP para manter o pH intracelular e exportar o excesso de prótons. Esse alto gasto de ATP causa uma depleção energética e posteriormente a morte celular. (c) no metabolismo do animal: a maioria dos ácidos orgânicos possuem altos valores de energia bruta e são geralmente absorvidos pelos epitélios intestinais por difusão passiva e podem ser usados em várias vias metabólicas para geração de energia, podendo afetar a ação de enzimas digestivas através da redução do pH da dieta (LUCKSTADT, 2008; DEFOIRDT *et al.*, 2009).

Outra vantagem é que alguns ácidos orgânicos podem atuar como fonte energética preferencial para as células intestinais e assim estimular o crescimento e integridade da mucosa

e promover a proteção das paredes intestinais contra agentes patógenos. Alguns ácidos podem ainda, por meio da proliferação de enterócitos, melhorar a capacidade de absorção de nutrientes (SAKATA *et al.*, 1987; MACHINSKY *et al.*, 2010).

Dentre os ácidos orgânicos mais utilizados comercialmente estão o ácido fórmico, propiônico, láctico, butírico e cítrico (SILVA *et al.*, 2015). Cada ácido orgânico possui propriedades físicas e químicas específicas, portanto, o uso do *blend* de ácidos orgânicos pode ter um espectro mais amplo de atividade antimicrobiana e efeitos sinérgicos no desempenho de crescimento e utilização de nutrientes, permitindo dessa forma, uma redução dos gastos com ração e consequentemente redução dos custos de produção.

Foi demonstrado que as suplementações dietéticas de ácidos ou mistura de ácidos orgânicos apresentaram resultados positivos para organismos aquáticos. A suplementação do ácido fórmico na dieta melhorou a digestibilidade aparente de fósforo, magnésio e cálcio em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (VIELMA; LALL, 1997). O uso do *blend* de ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido propiônico e propionato de cálcio) melhorou o desempenho zootécnico (ganho em peso, taxa de crescimento e taxa de conversão alimentar) de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (REDA *et al.*, 2016). Mine e Boopathy (2011) observaram que o uso isolado de alguns ácidos orgânicos, como o ácido fórmico, o acético, o propiônico e o butírico, inibem o crescimento de vibrios patogênicos para camarões marinhos, sendo que o ácido fórmico apresentou o efeito inibitório mais forte, seguido pelo ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico. Addam *et al.*, (2019), ao utilizar um *blend* semelhante ao do presente trabalho contendo ácido fórmico, ácido propiônico, ácido acético, formiato de amônio e ácidos graxos vegetais, verificaram melhora da saúde intestinal e a sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo.

Uma vez que, pesquisas com o uso de ácidos orgânicos em peixes ornamentais marinhos são escassos, e podem auxiliar na maximização do desempenho zootécnico e no aproveitamento dos nutrientes, melhorando assim a eficiência produtiva, este estudo objetivou avaliar o efeito de um *blend* de ácidos orgânicos compostos por formiato de amônio, ácido fórmico, ácidos graxos vegetais, ácido propiônico e ácido acético, em parâmetros do desempenho zootécnico, na atividade de enzimas digestivas e na morfologia intestinal no cultivo de *A. ocellaris*.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob autorização do Comitê de Ética e Uso de Animais CEUA – UFSC N° 1158250220

### 2.2.1 Origem dos animais e condições gerais de manutenção

Um casal de peixe-palhaço *A. ocellaris* oriundo do plantel de reprodutores do LAPOM foi mantido em um aquário de vidro de 80 litros úteis conectado a um sistema de recirculação de água equipado com um filtro de bolsa de *nylon* de 100 µm para retenção de partículas maiores, um *skimmer*, filtro biológico (mídias biológicas ensacadas e rochas artificiais) e aeração constante. A temperatura foi mantida entre 25 – 27 °C e salinidade 32 – 35. O casal era alimentado até a saciedade aparente, duas vezes ao dia, com ração comercial para peixes ornamentais marinhos (Tetra Marine, Alemanha) e com patê composto por mexilhão, lula, peixe, algas e camarão frescos.

O aquário continha um vaso de barro para esconderijo e para a desova. Após a desova, os ovos eram incubados por 7 dias no aquário dos reprodutores. Posteriormente o vaso era transferido para o setor de larvicultura para uma taça de fibra-de-vidro tampada (50 litros de volume útil), e após 3 horas de escuridão total ocorreu a eclosão das larvas. A temperatura foi mantida em 26 °C e a salinidade foi diminuída para 29.

As larvas foram mantidas em água verde (microalga *Nannochloropsis oculata*) e alimentadas 3 vezes ao dia seguindo o seguinte protocolo: do 0 até o 8° dia após a eclosão (DAE) alimentadas com o rotífero *Brachionus rotundiformis*, do 6° até o 13° DAE com náuplio de *Artemia* sp., do 10° até o 19° DAE com metanáuplio de *Artemia* sp. e do 15° até o 20° DAE, com ração de desmame da marca Tropical (Polônia) (proteína bruta 60%, umidade 10%, extrato etéreo 5% e matéria fibrosa 3,7%).

As culturas de rotífero utilizadas no experimento foram mantidas em tanques de 24 litros a 26-28 °C de temperatura e 25 de salinidade, alimentados com microalga *N. oculata* (100.000 a 150.000 cel mL<sup>-1</sup>) e fermento biológico comercial (aproximadamente 0,3 g por milhão de rotífero). Para eclosão dos náuplios de *Artemia* sp., em torno de 2 g de cistos (*Artemia salina* do RN®, Brasil) foram incubados diariamente em 5 litros de água diariamente a 25-30 de salinidade sob luz e forte aeração. Os metanáuplios foram enriquecidos com microalga

*Isochrysis galbana* e o enriquecedor para alimento vivo comercial Algamac 3050 flake (AquafaunaBiomarine Inc., Hawthorne, CA, USA) por 12 horas.

### 2.2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 270 juvenis de *A. ocellaris* com 21 DAE, peso inicial de  $21,0 \pm 4,00$  mg (média  $\pm$  desvio padrão) e comprimento total de  $7,9 \pm 0,58$  mm. Nesta idade os peixes já estavam aptos a consumir ração.

Ao longo do experimento foram utilizadas duas rações comerciais. No início (peixes com 21 DAE) até o 49º dia de experimento (70 DAE), os peixes foram alimentados com a ração de desmame da marca INVE Aquaculture (partícula de aproximadamente 700  $\mu$ m - proteína bruta 53%, óleos e gordura bruta 12%, matéria fibrosa 1%, cálcio 1,5% e fósforo 1,3%). Com o crescimento dos peixes, do 50º dia de experimento (71 DAE) até o 77º dia de experimento (98 DAE), foi fornecida a ração da marca Tropical, com pelete de 2 mm de comprimento (proteína bruta 41%, matéria gorda bruta 9%, fibra bruta 3% e umidade 10,5%).

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 15 aquários de vidro com volume útil de 18 litros em sistema estático. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, e foram testados os seguintes tratamentos em triplicata: **T0**- tratamento sem adição do *blend* de ácidos orgânicos na ração; **T5**- tratamento com adição de 5 g kg<sup>-1</sup> do *blend* de ácidos orgânicos; **T10**- tratamento com adição de 10 g kg<sup>-1</sup> de ácidos orgânicos; **T15**- tratamento com adição de 15 g kg<sup>-1</sup>; **T20**- tratamento com adição de 20 g kg<sup>-1</sup> na ração.

O *blend* de ácidos orgânicos comercial (AcidCM Dry – Nuscience Nutrientes do Brasil Ltda) apresenta em sua composição os seguintes ácidos e sais orgânicos: formiato de amônio (126,5 g kg<sup>-1</sup>), ácido fórmico (115,5 g kg<sup>-1</sup>), ácidos graxos vegetais (82,5 g kg<sup>-1</sup>), ácido propiônico (66,0 g kg<sup>-1</sup>) e ácido acético (55,0 g kg<sup>-1</sup>).

Para a incorporação na dieta, cada nível de ácido orgânico foi diluído em álcool etílico comercial, na proporção de 250 ml kg<sup>-1</sup> de ração, e borrifado sobre as rações. As rações foram secas em estufa a 50 °C por 2 horas e armazenadas em recipientes no freezer a -18 °C (adaptado de YAMASURU, 2007).

As dietas foram oferecidas três vezes ao dia às 9:00 h, 12:30 h e 16:00 h até a saciedade aparente. Os aquários eram sifonados duas vezes ao dia após uma hora da primeira e da última alimentação. O fotoperíodo foi mantido em 12 h Luz: 12 h Escuro. A temperatura da água nas unidades experimentais foi mantida em  $26,8 \pm 0,28$  °C com auxílio de aquecedores acoplados a termostatos (Modelo MT 511Ri Full Gauge precisão de 0,01 °C) e a salinidade medida com um

refratômetro óptico (INSTRUTHERM, precisão de 0,1 g L<sup>-1</sup>). O pH, a amônia não ionizada, nitrito, nitrato e o oxigênio dissolvido foram medidos duas vezes na semana com testes colorimétricos (LabconTest).

### 2.2.3 Amostragem dos animais e análises laboratoriais

#### 2.2.3.1 Análise do pH das dietas

Amostras de 0,5 g das dietas foram maceradas e diluídas em 4,5 ml de água destilada em triplicata para análise de pH (ADDAM *et al.*, 2019). O pH das dietas foi mensurado com um pHmetro digital (K39-003PHC, KASVI, BRASIL).

#### 2.2.3.2 Análise biométrica

Durante o experimento foram realizadas sete biometrias (aos 0, 15, 30, 45, 49, 65 e 77 dias de experimento). Para a biometria inicial, 30 peixes foram amostrados aleatoriamente. Para a biometria de 15, 30, 45 e 65 dias, 5 peixes de cada unidade experimental foram amostrados (15 por tratamento). Para a biometria, no 49º dia de experimento (70 DAE) e no 77º dia de experimento (98 DAE), todos os peixes das unidades experimentais foram pesados e medidos. Os indivíduos foram pesados (peso úmido) com uma balança analítica e medidos com o auxílio de uma lupa conectada ao programa DinoCapture 2.0, ou com o paquímetro manual quando os peixes ficaram maiores. Foram mensurados: o comprimento total, comprimento padrão e altura dos juvenis de peixe-palhaço.

Para a biometria, os peixes permaneceram em jejum por 16 horas e foram anestesiados através de imersão em água com 27 µL L<sup>-1</sup> de eugenol (PEDRAZZANI; OSTRENSKY NETO, 2016). Após a biometria, os peixes foram transferidos para recipientes com água limpa e aerada, onde permaneceram até a total recuperação, sendo então devolvidos aos aquários de origem.

A partir dos dados biométricos foram calculados:

-Sobrevivência (S%) =  $100 \times \frac{[(\text{população inicial}) - (\text{número de indivíduos mortos})]}{(\text{população inicial})}$ .

-Ganho de Peso: GP = peso final (g) - peso inicial (g)

-Taxa de Crescimento Específico em peso (TCE, % dia<sup>-1</sup>):  $TCE=100x [\ln^* (\text{peso final}) - \ln (\text{peso inicial})] / \text{tempo de experimento}$ .

\*ln= logaritmo natural

-Crescimento diário em comprimento (mm dia<sup>-1</sup>):  $(\text{comprimento final} - \text{comprimento inicial}) / \text{período experimental em dias}$ .

-Consumo de ração (CR) = total do alimento consumido (mg) / período experimental (dias)

-Taxa de conversão alimentar = ração ofertada (g) /ganho de peso (g).

- Coeficiente de Variação do peso =  $100 \times (\text{desvio padrão peso}/\text{média do peso})$ .

- Fator de Condição (FC):  $FC = 100 \times (\text{Peso (g)}/\text{Comprimento}^3 \text{ (cm)})$ .

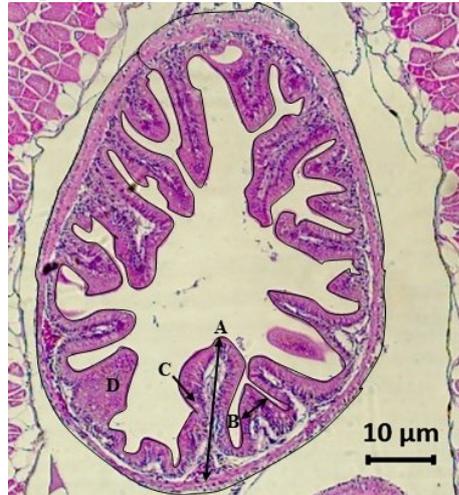
### 2.2.3.3 Análise histológica

As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS/UFSC). Para a análise foram utilizados quatro peixes por unidade experimental, de 70 DAE e 98 DAE. Os peixes foram anestesiados com eugenol (1 mL L<sup>-1</sup>) e posteriormente eutanasiados. Fragmentos da região média do intestino foram fixados em formalina tamponada 10% por 48 h e posteriormente transferidos para álcool 70% até o início do processamento histológico. As amostras foram desidratadas serialmente com banhos em álcool etílico (80%, 95%, 100%). Posteriormente houve a diafanização, em Álcool e Xilol e dois banhos de Xilol, e a parafinização com três banhos de parafina. Cada banho durou 30 minutos tendo em vista o pequeno tamanho das amostras. Após esse tempo, as amostras foram emblocadas em parafina, descansaram por 24 h e os blocos foram cortados com o auxílio de um micrótomo manual na espessura de 3 µm.

Em seguida, os cortes foram colocados em banho maria, coletados com lâmina e corados com hematoxilina de Harris e eosina (HHE). Posteriormente à coloração, as lâminas foram montadas em meio Entellan® e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase (DIC) Axio Imager A.2 (Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Para avaliação da histomorfometria dos intestinos foram realizadas as medidas (µm), dos seguintes parâmetros: área, perímetro, largura e altura das pregas - medida entre a base da vilosidade e o ápice da vilosidade; além da contagem das células caliciformes e das pregas intestinais (Figura 1).

Figura 1 - Medidas morfométricas do intestino de *A. ocellaris*. A) Altura das pregas; B) Largura das pregas; C) Células caliciformes; D) Área.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

#### 2.2.3.4 Análise enzimática

As análises enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Insetos (LBI/BQA) da UFSC. Foram coletados 12 intestinos de juvenis de peixe-palhaço por tratamento (4 por unidade experimental) nas idades 70 DAE e 98 DAE. Todos os animais foram anestesiados e eutanasiados com 1 mL L<sup>-1</sup> de eugenol e imediatamente congelados para posterior análise.

Para obtenção do extrato enzimático, o intestino de cada animal foi colocado individualmente em tubos de Eppendorf com 1 mL de água Mili-Q e homogeneizados em homogeneizador Potter-Ekvehjem. Durante o processo o material foi mantido sob refrigeração em banho de gelo, posteriormente centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para microtubos. A atividade de tripsina e quimotripsina foram determinadas de acordo com Erlanger, Kokowsky e Cohen (1961) e DelMar *et al.* (1979) utilizando os substratos NBenzoil-DL-Arginil p-nitroanilida (bz-R-pNA) e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilida (suc-AAPL4-pNA), respectivamente. Ambos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2 mM e diluídos 1:1 (v/v) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5 (concentração final 1 mM). Para análise da atividade enzimática da tripsina e quimotripsina foram misturados 50 µL de extrato enzimático e 50 µL de substrato tampão (1:1, v/v) em microplacas de 96 poços (fundo chato). As leituras de absorvância (410 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., California, USA) a cada 15 minutos de incubação a 30 °C por 1 h. A unidade de atividade (U) de enzima foi definida como a

quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato<sup>-min</sup>, determinadas a partir da curva padrão de *p*-nitroanilida. No controle negativo, o extrato enzimático foi substituído por água bidestilada.

A atividade amilásica foi determinada através da detecção da presença de grupos redutores na reação com o ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS) seguindo metodologia proposta por Dos Santos *et al* (2017). O substrato foi preparado contendo 1 mL de solução de amido 1% em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,5). Nos ensaios foram utilizados 25  $\mu\text{L}$  do substrato-tampão e 25  $\mu\text{L}$  do homogeneizado. As amostras foram incubadas em banho-maria a 30 °C, e testadas em quatro tempos (15, 30, 45 e 60 min). A interrupção da reação foi realizada adicionando 100  $\mu\text{L}$  de DNS. Após a última interrupção, as microplacas com as amostras foram seladas com filme plástico e levadas a banho de 100 °C por 5 minutos, em seguida o filme plástico foi retirado, resfriadas em gelo e adicionado 200  $\mu\text{L}$  de água. As microplacas foram, por fim, levadas ao Leitor de Microplacas TECAN (Infinite Pro., California, USA) e as amostras foram lidas a 550 nm. A atividade da amilase foi calculada em mili unidades (mU), que equivale a 1  $\mu\text{mol}$  de glicose formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de glicose.

### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para avaliar a normalidade e homoscedasticidade, respectivamente. Quando considerados paramétricos, os dados foram submetidos a análise de variância unifatorial (ANOVA one way). Os dados da análise enzimática foram submetidos a análise de variância two way. Apresentando diferença significativa, os dados foram submetidos ao teste de Tukey para separação de médias. As análises foram realizadas ao nível de significância de 5% no programa estatístico SAS (Statistical software; versão 7.0).

Quando considerados não-paramétricos, como nos resultados da análise histológica, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e apresentando diferença, utilizou-se o teste de Dunn. Essas análises foram realizadas no programa estatístico R ao nível de significância de 5%. Os dados foram representados em valores de média  $\pm$  desvio padrão.

## 2.4 RESULTADOS

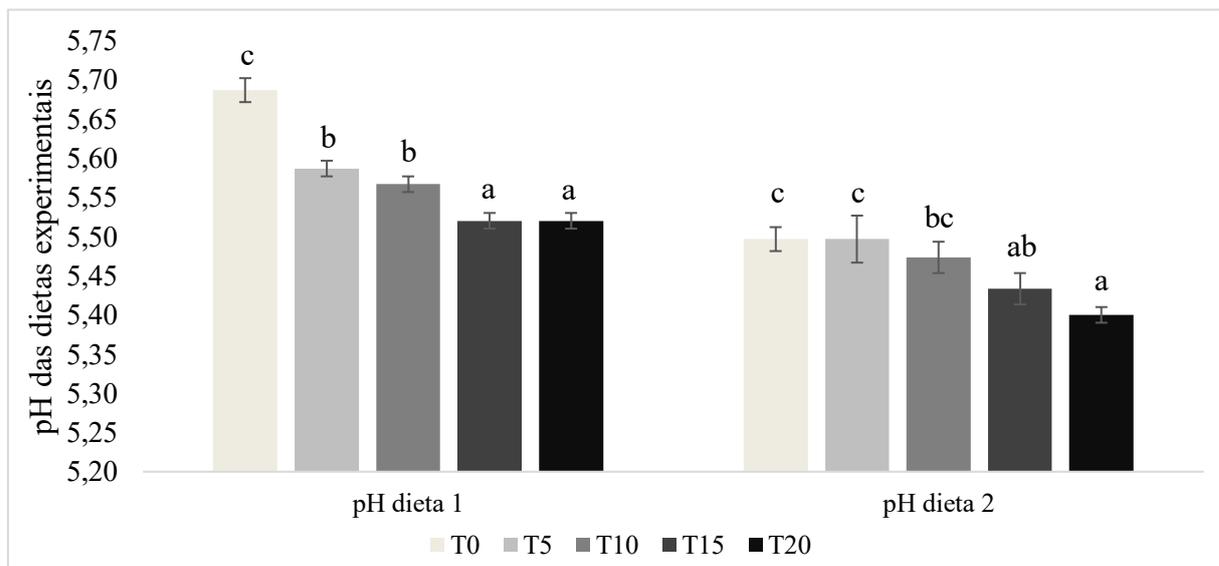
### 2.4.1 Parâmetros físico-químicos da água

Durante todo o período experimental, a temperatura da água nas unidades experimentais foi de  $26,8 \pm 0,28^\circ\text{C}$  e a salinidade  $29,18 \pm 1,3$ . A amônia não ionizada ( $0,022 \pm 0,004 \text{ mg L}^{-1}$ ), nitrito ( $0,76 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$ ), nitrato ( $4,71 \pm 1,78 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o oxigênio dissolvido ( $5,23 \pm 1,31 \text{ ppm}$ ) não diferiram entre os tratamentos. O pH da água variou de 7,92 (T15) a 7,95 (T0), e não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Esses dados de qualidade de água mantiveram-se dentro dos padrões para o cultivo de peixe-palhaço do gênero *Amphiprion* (MOORHEAD; ZENG, 2010).

### 2.4.2 pH das dietas experimentais

Os tratamentos suplementados com o *blend* de ácidos orgânicos apresentaram redução do pH em comparação ao grupo controle, tanto na primeira como na segunda dieta. Na primeira dieta houve redução do pH conforme o aumento dos níveis de inclusão, variando de  $5,69 \pm 0,02$  (T0) a  $5,52 \pm 0,01$  (T20). Da mesma forma, na segunda dieta, o pH diminuiu de  $5,50 \pm 0,02$  (T0) a  $5,40 \pm 0,01$  (T20) com o aumento dos níveis do *blend* de ácidos orgânicos (Figura 2).

Figura 2 - Análise do pH das dietas experimentais dos grupos sem suplementação (T0), suplementada com *blend* de ácido orgânico  $5 \text{ g kg}^{-1}$  (T5),  $10 \text{ g kg}^{-1}$  (T10),  $15 \text{ g kg}^{-1}$  (T15) e  $20 \text{ g kg}^{-1}$  (T20). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

### 2.4.3 Análise histológica

Os parâmetros histomorfométricos estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 3. É possível observar de maneira geral que, os valores para número, altura, largura e área das pregas intestinais apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Na sétima semana de experimento (70 DAE), não foi possível observar diferença para o número de pregas intestinais nos diferentes tratamentos, porém no final do experimento, quando os peixes apresentavam 98 DAE, foi possível verificar que este número foi superior nos tratamentos T15 e T20 diferindo do tratamento controle (Tabela 4).

Em relação à altura das pregas intestinais, houve diferença significativa entre os tratamentos tanto no 70 DAE como no 98 DAE. No 70 DAE, o valor da altura do tratamento controle foi superior e diferiu do tratamento T10, porém os tratamentos T5, T15 e T20 foram iguais aos tratamentos T0 e T10. No 98 DAE foi possível notar que os tratamentos T10 e T15 apresentaram valores maiores, diferindo significativamente do tratamento T20, porém igual ao T0, T5 e T10, que não diferiram do T20 (Tabela 4; Figura 3).

As microfotografias do intestino de juvenis de *A. ocellaris* de 98 DAE nos diferentes tratamentos mostram alterações significativas das vilosidades intestinais. A Figura 3 mostra alterações visíveis no número e na altura das pregas intestinais dos juvenis de peixe-palhaço nos tratamentos T10 e T15, corroborando com os dados encontrados na Tabela 4.

Para largura das pregas intestinais, no 70 DAE foi verificado que o resultado do tratamento controle foi maior que os resultados dos tratamentos com o *blend* de ácidos orgânicos, exceto para o tratamento T5 que foi igual a todos os tratamentos e para o tratamento T10 que apresentou resultados iguais aos tratamentos T0 e T15. No 98 DAE, os tratamentos T15 e T20 apresentaram valores maiores que o tratamento T5 para largura e estes não diferiram dos tratamentos T10 e T0.

Seguindo essa tendência, no 98 DAE, o valor da área das pregas intestinais no tratamento T15 foi superior ao tratamento controle, não havendo diferença entre os demais tratamentos. Entretanto, no 70 DAE não foram encontradas diferenças significativas. Para os resultados do perímetro e número de células calciformes não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Tabela 1; Figura 3).

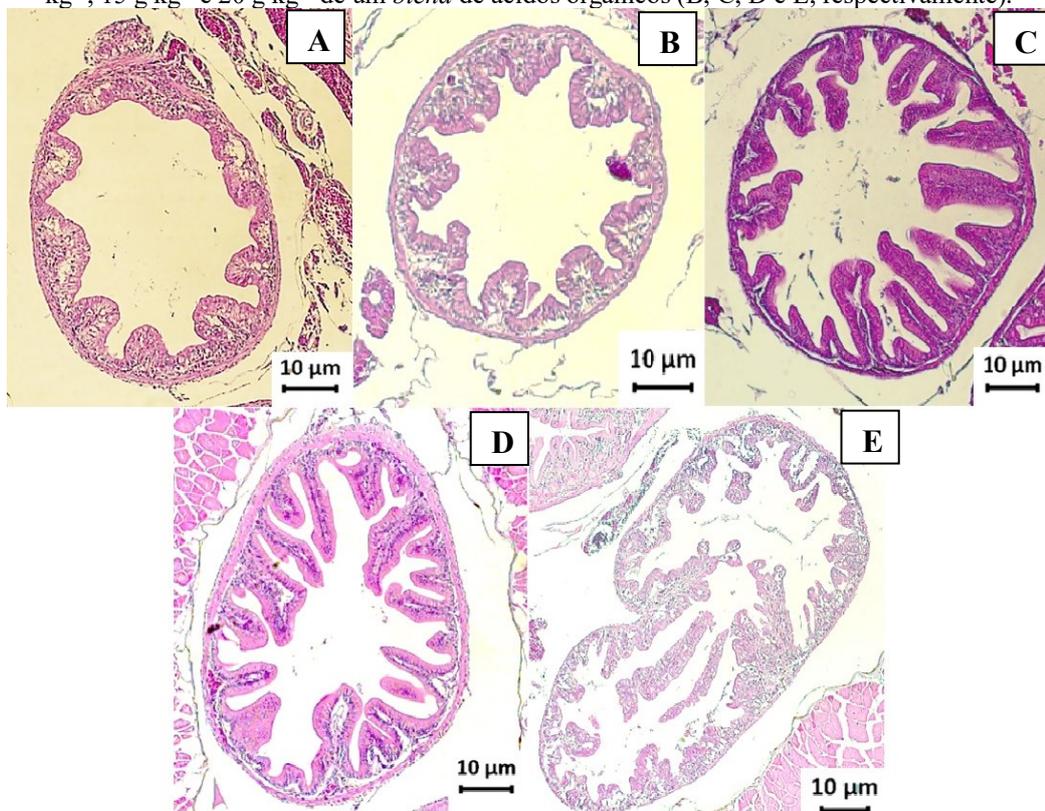
Tabela 1 - Morfometria da porção média intestinal de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com dietas suplementadas com *blend* de ácidos orgânicos 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) e sem suplementação (T0) aos 70 DAE e 98 DAE. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Níveis de inclusão do <i>blend</i> de ácidos orgânicos (g kg <sup>-1</sup> )						
DAE	T0	T5	T10	T15	T20	Valor p
<i>Número de pregas intestinais</i>						
70	15,67 $\pm$ 0,58	13,00 $\pm$ 2,65	19,33 $\pm$ 1,15	15,20 $\pm$ 3,63	19,00 $\pm$ 2,58	0,06
98	12,29 $\pm$ 2,06 <sup>b</sup>	16,63 $\pm$ 4,75 <sup>ab</sup>	15,11 $\pm$ 3,14 <sup>ab</sup>	17,90 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup>	17,78 $\pm$ 5,40 <sup>a</sup>	0,03
<i>Altura das pregas intestinais</i>						
70	11,33 $\pm$ 4,88 <sup>a</sup>	9,91 $\pm$ 3,83 <sup>ab</sup>	7,99 $\pm$ 3,43 <sup>b</sup>	8,63 $\pm$ 3,43 <sup>ab</sup>	10,95 $\pm$ 5,50 <sup>ab</sup>	0,02
98	11,81 $\pm$ 7,22 <sup>ab</sup>	10,82 $\pm$ 3,25 <sup>ab</sup>	12,16 $\pm$ 4,86 <sup>a</sup>	12,70 $\pm$ 5,44 <sup>a</sup>	10,44 $\pm$ 4,57 <sup>b</sup>	0,01
<i>Largura das pregas intestinais</i>						
70	6,15 $\pm$ 2,50 <sup>a</sup>	4,72 $\pm$ 1,38 <sup>abc</sup>	5,22 $\pm$ 2,25 <sup>ab</sup>	4,74 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>	3,93 $\pm$ 2,05 <sup>c</sup>	0,00
98	5,39 $\pm$ 2,53 <sup>ab</sup>	4,94 $\pm$ 2,12 <sup>b</sup>	5,62 $\pm$ 2,47 <sup>ab</sup>	5,75 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>	5,85 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>	0,05
<i>Área</i>						
70	1146,90 $\pm$ 371,88	1093,37 $\pm$ 346,93	1064,46 $\pm$ 392,20	830,26 $\pm$ 132,49	1030,85 $\pm$ 274,21	0,56
98	1030,89 $\pm$ 256,99 <sup>b</sup>	1337,56 $\pm$ 429,34 <sup>ab</sup>	1354,54 $\pm$ 554,58 <sup>ab</sup>	1956,48 $\pm$ 712,29 <sup>a</sup>	1447,08 $\pm$ 609,32 <sup>ab</sup>	0,02
<i>Perímetro</i>						
70	433,02 $\pm$ 144,03	507,35 $\pm$ 64,64	470,69 $\pm$ 86,66	350,74 $\pm$ 69,02	475,33 $\pm$ 77,74	0,23
98	437,43 $\pm$ 227,20	426,44 $\pm$ 264,79	430,39 $\pm$ 143,00	517,83 $\pm$ 314,55	478,56 $\pm$ 331,83	0,97
<i>Número de células calciformes</i>						
70	39,33 $\pm$ 18,58	36,67 $\pm$ 13,01	56,00 $\pm$ 21,17	38,00 $\pm$ 16,00	43,75 $\pm$ 9,74	0,66
98	26,50 $\pm$ 19,28	45,75 $\pm$ 23,41	35,44 $\pm$ 12,64	43,40 $\pm$ 15,02	50,13 $\pm$ 17,49	0,15

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

\*Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ) na mesma idade.

Figura 3 - Microfotografia da porção média intestinal de juvenis de *A. ocellaris* com 98 DAE alimentados com a dieta controle (sem suplementação- A) e com dieta contendo 5 g kg<sup>-1</sup>, 10 g kg<sup>-1</sup>, 15 g kg<sup>-1</sup> e 20 g kg<sup>-1</sup> de um *blend* de ácidos orgânicos (B, C, D e E, respectivamente).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

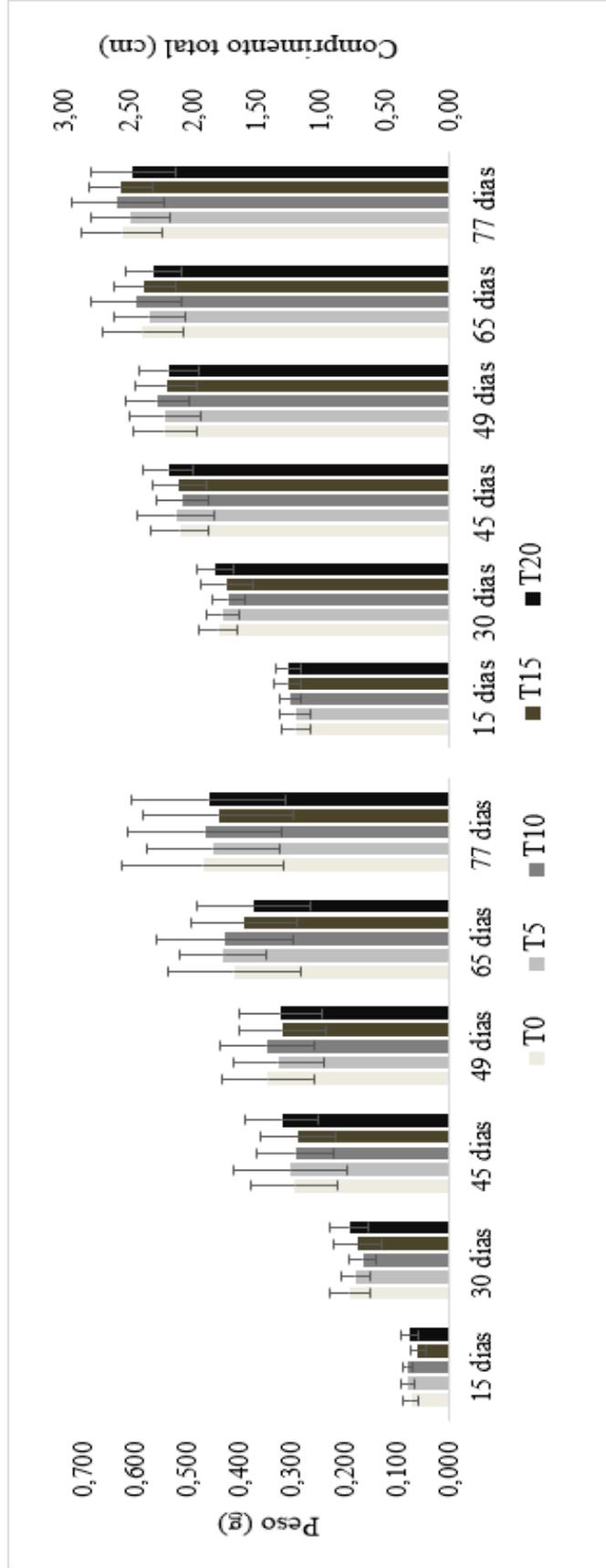
#### 2.4.4 Desempenho zootécnico

A sobrevivência durante todo o período experimental foi de 100% em todas as unidades experimentais, exceto em uma repetição do aquário do grupo controle em que todos os peixes morreram. Esta mortalidade foi atribuída a um inseto (centopéia) encontrado morto dentro do aquário junto aos peixes. Desta forma, esta repetição foi eliminada da análise dos dados.

A partir de um peso inicial de 21,0±4,0 mg (n=30) e de um comprimento total de 7,88±0,58 mm (n=30), foi verificado o crescimento para todos os tratamentos. Conforme apresentado na figura 4, não houve diferença significativa para os valores de peso e comprimento dos peixes ao longo do experimento (77 dias).

Da mesma forma, 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 = 2,02±0,28 cm; 1,94±0,28 cm, 2,02±0,31 cm, 1,91±0,30 cm, 1,92±0,29 cm e altura da cabeça = 0,21±0,08 cm; 0,21±0,07 cm, 0,22±0,08 cm, 0,22±0,08 cm e 0,21±0,09 cm), respectivamente para os tratamentos T0, T5, T10, T15 e T20.

Figura 4 - Peso (g) e comprimento total (cm) de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com dietas suplementadas com o *blend* de ácidos orgânicos 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) e sem suplementação (T0) após, 15 (36 DAE), 30 (51 DAE), 45 (66 DAE), 49 (77 DAE), 65 (86 DAE) e 77 (98 DAE) dias de experimento. Dados apresentados como média ± desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020

Também, os resultados das variáveis: peso final, comprimento total final, ganho de peso, consumo de ração, taxa de crescimento específico, taxa de crescimento diário em comprimento não apresentaram diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos. Apesar de numericamente menor nos tratamentos de T10 a T20, especialmente em T15, não foi detectada diferença estatística entre os tratamentos para a conversão alimentar (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros de desempenho de juvenis de *A. ocellaris* alimentados com dietas suplementadas com *blend* de ácidos orgânicos 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) e sem suplementação (T0) após 77 dias de experimento (98 DAE). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Parâmetros	Níveis de inclusão do <i>blend</i> de ácidos orgânicos (g kg <sup>-1</sup> )					valor de p
	T0	T5	T10	T15	T20	
GP (mg)	440,90 $\pm$ 158,66	437,21 $\pm$ 122,99	476,21 $\pm$ 148,33	419,73 $\pm$ 143,13	427,93 $\pm$ 146,21	0,63
CR (mg/dia)	123,72 $\pm$ 22,37	120,57 $\pm$ 18,72	108,83 $\pm$ 18,12	95,29 $\pm$ 5,64	107,51 $\pm$ 16,49	0,44
CA	1,82 $\pm$ 0,12	1,77 $\pm$ 0,47	1,46 $\pm$ 0,44	1,31 $\pm$ 0,12	1,52 $\pm$ 0,54	0,66
TCE (%/dia)	3,97 $\pm$ 0,46	3,92 $\pm$ 0,43	4,03 $\pm$ 0,50	3,88 $\pm$ 0,46	3,90 $\pm$ 0,49	0,56
CDC (mm/dia)	0,23 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,04	0,34
K	2,73 $\pm$ 0,17	2,88 $\pm$ 0,35	2,80 $\pm$ 0,35	2,84 $\pm$ 0,28	2,93 $\pm$ 0,45	0,34
CV (%)	29,59 $\pm$ 5,69	28,00 $\pm$ 3,55	29,57 $\pm$ 1,83	29,75 $\pm$ 5,32	31,28 $\pm$ 9,34	0,98

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE), crescimento diário em comprimento (CDC), fator de condição (K), coeficiente de variação em peso (CV).

#### 2.4.5 Atividade enzimática

A atividade enzimática específica da tripsina, quimotripsina e amilase (Tabela 3) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e entre a interação idade e tratamentos com a inclusão do *blend* de ácidos orgânicos para juvenis de *A. ocellaris*. No entanto, houve aumento significativo da atividade da tripsina com o desenvolvimento dos juvenis.

Tabela 3 - Atividade enzimática específica de tripsina, quimotripsina e amilase (U mg de proteína<sup>-1</sup>) nos juvenis de *Amphiprion ocellaris* com 70 e 98 DAE alimentados com dieta suplementada com 5 g kg<sup>-1</sup> (T5), 10 g kg<sup>-1</sup> (T10), 15 g kg<sup>-1</sup> (T15) e 20 g kg<sup>-1</sup> (T20) de um *blend* de ácidos orgânicos e dieta controle, sem suplementação (T0). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

DAE	Níveis de inclusão do <i>blend</i> de ácidos orgânicos (g kg <sup>-1</sup> )				
	T0	T5	T10	T15	T20
	<i>Tripsina</i>				
70	22,47 $\pm$ 8,92 <sup>A</sup>	24,41 $\pm$ 5,49 <sup>A</sup>	24,03 $\pm$ 9,09 <sup>A</sup>	20,79 $\pm$ 6,51 <sup>A</sup>	27,37 $\pm$ 6,99 <sup>A</sup>
98	42,56 $\pm$ 9,01 <sup>B</sup>	55,33 $\pm$ 8,34 <sup>B</sup>	49,28 $\pm$ 20,91 <sup>B</sup>	66,51 $\pm$ 1,23 <sup>B</sup>	39,72 $\pm$ 13,60 <sup>B</sup>
	<i>Quimotripsina</i>				
70	307,21 $\pm$ 175,03	365,50 $\pm$ 92,37	335,25 $\pm$ 71,07	217,80 $\pm$ 101,43	272,93 $\pm$ 151,13
98	187,17 $\pm$ 165,91	210,51 $\pm$ 110,57	272,08 $\pm$ 136,05	300,49 $\pm$ 152,81	227,72 $\pm$ 160,14
	<i>Amilase</i>				
70	1693,38 $\pm$ 1039,53	2164,91 $\pm$ 1141,53	1947,38 $\pm$ 1128,48	1583,39 $\pm$ 728,66	2295,78 $\pm$ 969,59
98	1523,25 $\pm$ 863,27	2211,99 $\pm$ 1129,16	1692,64 $\pm$ 326,22	2774,97 $\pm$ 771,31	3326,37 $\pm$ 1352,58

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

\*Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre as idades no mesmo tratamento

## 2.5 DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se uma diminuição dos valores de pH das dietas com o aumento da inclusão do *blend* de ácidos orgânicos. Esta tendência também foi observada por outros autores (NG *et al.*, 2009; CASTILLO *et al.*, 2014; ADDAM *et al.*, 2019). A redução do pH da dieta é a principal resposta da ação dos ácidos orgânicos na mesma, seus efeitos variam dependendo do *status* de dissociação (pK de dissociação). Quanto menor o valor do pK, mais forte é o ácido e maior a capacidade de diminuir o pH (FREITAG, 2007).

Além de diminuir o pH das dietas, dependendo do seu odor e sabor, os ácidos orgânicos podem provocar a rejeição do alimento por parte dos animais (SANTOS, 2010). Xie, Zhang e Wang (2003) investigaram o comportamento alimentar de tilápia nilótica usando diferentes ácidos orgânicos, e mostraram que os ácidos cítrico e láctico têm efeitos estimuladores de consumo, enquanto o ácido acético e metacetônico promoveram efeitos repulsivos. No presente trabalho, a inclusão do *blend* de ácidos orgânicos mostrou uma tendência numérica na diminuição do consumo de ração com níveis mais elevados de inclusão destes ácidos. Em relação a conversão alimentar, os tratamentos T10 e T15 apresentaram os melhores resultados de conversão alimentar, 1,46 e 1,31, respectivamente, especialmente em relação ao T0 (1,84). Uma vez que os parâmetros zootécnicos não foram afetados, e a conversão alimentar também apontou uma redução deste parâmetro com a inclusão dos ácidos, supõem-se que, o *blend* não afetou a palatabilidade e promoveu o melhor aproveitamento dos nutrientes da ração pela

melhora da conversão alimentar. Esta melhora pode ser economicamente importante durante a engorda de *A. ocellaris*.

Além disso, no presente trabalho, a conversão alimentar apresentou melhores valores (1,31 a 1,82) quando comparado com outros trabalhos para juvenis do gênero *Amphiprion*, que variaram de 1,83 a 5,2 (BALAMURUGAN *et al.*, 2017; HEKIMOGLU *et al.*, 2017; VARGAS – ABÚNDEZ *et al.*, 2019).

O ganho em peso e a taxa de crescimento específico não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, no entanto, a inclusão de 10 g kg<sup>-1</sup> do *blend* de ácidos orgânicos na dieta resultou em cerca de 7% de aumento no ganho de peso quando comparado com os peixes alimentados com a dieta controle, e maior taxa de crescimento específico entre os tratamentos. Petkam *et al.* (2008) também não detectaram diferença significativa para o ganho em peso, comprimento total e a conversão alimentar em tilápia-do-Nilo alimentada com um *blend* de ácido e sais orgânicos (formiato de cálcio, propionato de cálcio, lactato de cálcio, fosfato de cálcio e ácido cítrico) em diferentes níveis (0,5, 1,0 e 1,5%) por 8 semanas. Porém, neste mesmo trabalho, na inclusão de 1,5% houve um aumento numérico de 11% no peso corporal quando comparado com o tratamento controle.

Bjerkeng, Storebakken e Wathne (1999) relataram que o salmão-do-Atlântico *Salmo salar* alimentado com dietas suplementadas com 0, 5 ou 20 g kg<sup>-1</sup> de um *blend* de sais de ácidos orgânicos (sais de sódio dos ácidos acético, propiônico e butírico) não mostraram efeitos significativos no crescimento. Porém, Saei *et al.* (2016) ao testar diferentes níveis de um *blend* de ácidos orgânicos para alevinos de truta-arco-íris por 60 dias verificaram que as dietas suplementadas com 0,1% e 0,2% de Bio Acid Ultra (Biochem, Alemanha) apresentaram melhor desempenho de crescimento ( $p < 0,05$ ), incluindo ganho de peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar.

Desta forma, os diferentes resultados relatados podem ocorrer pois, os efeitos promotores de crescimento dos ácidos orgânicos da dieta parecem depender das espécies, fisiologia, idade e/ou tipo e dosagem do ácido orgânico utilizado (NG; KOH, 2017).

A morfologia do intestino reflete o estado de saúde dos peixes, estando ligada à capacidade de assimilação de nutrientes e às funções imunológicas (FIGUEIREDO, 2017). A suplementação com o *blend* de ácidos orgânicos na dieta de *A. ocellaris* apresentou diferenças significativas em alguns parâmetros histomorfométricos. O número de pregas intestinais permaneceu inalterado após os animais completarem 70 DAE. Após 98 DAE houve um aumento significativo nos tratamentos T15 e T20 quando comparado com o tratamento controle. A altura das pregas intestinais após 70 DAE foi maior no tratamento controle,

entretanto, após 98 DAE, os tratamentos T10 e T15 apresentaram maiores valores para este parâmetro.

Seguindo essa tendência, a área no 70 DAE não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, porém, no 98 DAE, o tratamento T15 apresentou a maior área das pregas intestinais e foi significativamente diferente do tratamento controle. É possível notar que, os resultados dos tratamentos com a inclusão do *blend* de ácidos apareceram após 77 dias de experimento (98 DAE) para número, altura, largura e área das pregas intestinais, ou seja, devido a um tempo maior de inclusão do *blend* de ácidos orgânicos. Dessa forma, os resultados indicam que os efeitos na histomorfologia intestinal de *A. ocellaris* começaram no 77º dia de experimento da inclusão do *blend* de ácidos orgânicos, principalmente na concentração de 15 g kg<sup>-1</sup>.

O número de pregas intestinais assim como a altura das mesmas, fornece mais área de superfície para absorção de nutrientes e melhorias na saúde intestinal, refletindo no efeito positivo da suplementação do *blend* de ácidos orgânicos (Mohamed *et al.*, 2014). De acordo com Schwarz *et al.* (2010), o aumento da altura das vilosidades intestinais pode favorecer a absorção de nutrientes da dieta, melhorando a taxa de conversão alimentar. Este fato confirma a tendência observada e discutida anteriormente, especialmente no tratamento T15, que apresentaram menor valor numérico de conversão alimentar, e maior valor para altura das pregas intestinais.

Após 77 dias de experimento, o número de células caliciformes nos tratamentos com o *blend* de ácidos orgânicos foi maior, porém sem apresentar diferença significativa. As células caliciformes têm a função produtora de muco e são secretoras de glicoproteínas. Sua presença no intestino de peixes tem relação com as condições alimentares, barreira contra patógenos intestinais, proteção do epitélio da ação de enzimas digestivas e na presença de pH acentuadamente ácido, como é o caso das dietas suplementadas com o *blend* de ácidos orgânicos (MACARI; FURLAN; GONZALES, 1994; HONORATO *et al.*, 2011). Porém, no presente estudo não foram encontradas diferenças significativas para células caliciformes e perímetro em ambos os tempos. Addam *et al.* (2019) constataram que a suplementação de um *blend* de ácidos orgânicos e óleo essencial *Lippia origanoides* na dieta de tilápia-do-Nilo aumentou a altura das pregas intestinais e o número de células caliciformes da porção anterior do intestino, no entanto, na porção posterior não foi encontrada diferença significativa para as células caliciformes. Também não houve diferença significativa no número de pregas, área, perímetro e largura das pregas intestinais da porção anterior e posterior.

No entanto, houve uma tendência a melhora na conversão alimentar, que juntamente com o aumento efetivo da área, número e largura das pregas após 77 dias de experimento (98 DAE), especialmente no tratamento com inclusão de 15 g kg<sup>-1</sup> dos ácidos orgânicos na dieta, indicam um maior aproveitamento dos nutrientes da ração. Estes fatos podem ser economicamente importantes durante a engorda de *A. ocellaris*.

Dados sobre os efeitos dos ácidos orgânicos sobre a morfologia intestinal em animais aquáticos são escassos (NG; KOH, 2017) e dose e espécie-dependentes. Devido a isso, as respostas na histomorfologia intestinal de peixes alimentados com *blend* de ácido orgânicos podem ser diversas.

Pouco se sabe sobre as mudanças nas atividades das enzimas digestivas quando ácidos orgânicos são suplementados à dieta dos peixes. A melhora no desempenho do crescimento e na utilização de alimentos devido aos acidificantes pode ocorrer devido a disponibilidade de diferentes minerais e o aumento da secreção de algumas enzimas, como proteases (AGOUZ; SOLTAN; MESHRAF, 2015).

Li, Li e Wu (2009) indicaram que a suplementação das dietas de tilápia híbrida (*O. niloticus* × *O. aureus*) com o ácido cítrico (10 g kg<sup>-1</sup>) reduziu as atividades da protease no intestino em 35,1%. Su *et al.* (2014) ao avaliarem a suplementação de ácido cítrico (0, 1, 2, 3, 4 e 5 g kg<sup>-1</sup>) na dieta do camarão-branco-do-Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) não observaram diferença significativa na atividade da amilase intestinal entre os tratamentos. Porém, o tratamento com a inclusão de 2 g kg<sup>-1</sup> de ácido cítrico apresentou atividade de protease intestinal superior ao tratamento controle (sem inclusão).

No presente trabalho, não foi encontrado diferença significativa entre os tratamentos para atividade da amilase entre os tratamentos, também não houve aumento da atividade em relação ao tempo. Kuz'mina (1996) detectou diminuição da atividade amilásica durante a ontogenia de peixes (*Esox lucius*; *Perca fluviatilis*; *Rutilus rutilus*). De forma similar, Infante e Cahu (2001) observaram no robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e no red drum que a expressão da amilase diminuiu com a idade (a partir da terceira semana após eclosão), enquanto para tripsina foi observado um aumento na atividade. Essa diminuição da amilase sugere que o desenvolvimento dos peixes é geneticamente programado e sutilmente modificado pela composição da dieta (INFANTE; CAHU, 2001).

A atividade específica da quimotripsina não apresentou diferença entre os tratamentos, assim como não foi observado aumento da atividade durante o desenvolvimento dos peixes. De acordo Applebaum e Holt (2003) a expressão aumentada de quimotripsina está associada a um

período em que há uma redução na taxa de crescimento. No presente trabalho a redução da atividade da quimotripsina pode ser explicada pelo desenvolvimento dos juvenis.

Nos peixes, a atividade de proteases intestinal ocorre em pH alcalino. A tripsina pancreática, por exemplo, é ativada entre o pH 7,0 a 11,0 dependendo de fatores como substrato, morfometria do tubo digestório e o arranjo das pregas intestinais (SEIXAS-FILHO, 2003). A tripsina é uma enzima pancreática que indica um índice útil e significativo do estado nutricional, bem como da capacidade de crescimento e da qualidade da dieta, sugerindo que a baixa atividade da tripsina indica que o alimento possui baixa qualidade ou não foi digerido pelo animal (HJELMELAND *et al.*, 1984; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN *et al.*, 2006). Com isso, observa-se que no presente trabalho, houve uma maior atividade ( $p < 0,05$ ) da tripsina nos juvenis de 98 DAE quando comparados com os de 70 DAE em todos os tratamentos, indicando que houve a boa qualidade da dieta em todos os tratamentos e o desenvolvimento do trato digestório dos juvenis.

## 2.6 CONCLUSÃO

A suplementação da ração com o *blend* de ácidos orgânicos comercial (126,5 g kg<sup>-1</sup> de formiato de amônio, 115,5 g kg<sup>-1</sup> de ácido fórmico, 82,5 g kg<sup>-1</sup> de ácidos graxos vegetais, 66,0 g kg<sup>-1</sup> de ácido propiônico e 55,0 g kg<sup>-1</sup> de ácido acético) ofertada para juvenis (21 DAE: peso 21,0 mg; comprimento total 7,9±0,58 mm) do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*, por 77 dias de experimento, diminui proporcionalmente o pH das dietas de acordo com o aumento do nível do *blend* de ácidos orgânicos. Após 77 dias de experimento (98 DAE) o tratamento com inclusão de 15 g kg<sup>-1</sup> do *blend* de ácidos orgânicos apresentou alterações benéficas da morfologia intestinal, indicando um maior aproveitamento dos nutrientes da ração. No entanto, os parâmetros zootécnicos (sobrevivência, ganho de peso, taxa de crescimento específico em peso, crescimento diário em comprimento, consumo de ração, taxa de conversão alimentar e fator de condição) e a atividade das enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase) não foram influenciados estatisticamente com a inclusão do *blend* de ácidos orgânicos.

É importante realizar estudos futuros com um período maior de suplementação a fim de entender o efeito do *blend* de ácidos no desempenho zootécnico de juvenis de *A. ocellaris*.

## REFERÊNCIAS

- ADDAM, K. G. S. *et al.* Dietary organic acids blend alone or in combination with an essential oil on the survival, growth, gut/liver structure and de hemato-immunological in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. 2960-2971, 2019.
- ADIL, S. *et al.* Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. **Veterinary Medicine International**, [s. l.], v. 2010, p. 7, 2010.
- AGOUZ, H. M.; SOLTAN, M. A.; MESHRAF, R. N. Effect of some organic acids and organic salt blends on growth performance and feed utilization of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*). **Egyptian. J. Nutrition and Feeds**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 443-450, Autumn 2015.
- APPLEBAUM, S. L.; HOLT, G. J. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Marine Biology**, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 1159-1167, 2003.
- BALAMURUGAN, J. *et al.* Determination of growth, colour and other traits in F1 hybrid of *Amphiprion percula* (male) × *A. ocellaris* (female). **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 2989-3003, 2017.
- BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; WATHNE, E. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. **Aquaculture Nutrition**, Bergen, v. 5, n. 3, p. 181-191, 1999.
- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, London, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.
- CARDOSO, I. L. Ácido cítrico em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, 2016.
- CASTILLO, S. *et al.* Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 433, p. 6-12, 2014.
- CAVALHEIRO, A. C. R. *et al.* Microingredientes utilizados em alimentação de peixes em cativeiro–Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, p. 1-20, 2014.
- DA SILVA, R. F. *et al.* Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 4, p. 352-355, 2008.
- DEFOIRDT, T. *et al.* Short-chain fatty acids and poly-β-hydroxyalkanoates:(New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 680-685, 2009.
- DELMAR, E. G. *et al.* A sensitive new substrate for chymotrypsin. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 99, p. 316-320, 1979.
- DOS SANTOS, A. A. *et al.* Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 20, p. 9, 2017.

- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, E. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 95, p. 271-278, 1961.
- FIGUEIREDO, A. B. **Suplementação com óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum gratissimum* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) na dieta de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.)**. 2017. 171f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2017.
- FREITAG, M. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: LÜCKSTÄDT, C. **Acidifiers in animal nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, 2007. p. 131–139.
- HEKIMOGLU, M. A. *et al.* Effect of Supplemented Algal Carotenoid Diets on Skin Color of Tomato Clownfish, *Amphiprion frenatus*. **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v. 49, n. 2, 2017.
- HJELMELAND, K. *et al.* Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. In: THE PROPAGATION of cod *Gadus morhua* L.: an international symposium. Arendal: Institute of Marine Research, 1984. p. 14-17.
- HONORATO, C. A. *et al.* Histology and histochemical of the medium intestine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets with fish silage. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 281-288, 2011.
- INFANTE, J. L. Z.; CAHU, C. L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 477-487, 2001.
- KODAMA, G. *et al.* Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 61-72, 2011.
- KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. **Aquaculture**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 25-37, 1996.
- LI, J. S.; LI, J. L.; WU, T. T. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). **Aquaculture Nutrition**, Bergen, v. 15, n. 4, p. 415-420, 2009.
- LUCKSTADT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, [s. l.], v. 3, n. 044, p. 1-8, 2008.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994. p. 246.
- MACHINSKY, T. G. *et al.* Digestibilidade de nutrientes e balanço de Ca e P em suínos recebendo dietas com ácido butírico, fitase e diferentes níveis de cálcio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2350-2355, 2010.
- MINE, S.; BOOPATHY, R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **Current microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 1-7, 2011.

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

NG, WK; KOH, CB. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 342-368, 2017.

OLIVOTTO, I.; GEFFROY, B. Clownfish. In: CALADO, R. *et al.* (ed.). **Marine Ornamental Species Aquaculture**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017. p. 177-199.

PALMTAG, M. R. The marine ornamental species trade. In: CALADO, R. *et al.* (ed.). **Marine ornamental species aquaculture**. Chichester: Wiley Blackwell, 2017. p. 3-14.

PEDRAZZANI, A. S.; OSTRENSKY NETO, 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, 2016.

PETKAM, R. *et al.* Evaluation of a dietary organic acid blend on tilapia *Oreochromis niloticus* growth performance. In: LÜCKSTÄDT, C. **Dr. sc. agr. Christian Lückstädt, Fisheries Engineer (M.Sc. in Pisciculture)**. [Busan: s. n., 2008].

REDA, R. M. *et al.* Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 50, p. 255-262, 2016.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. *et al.* Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 7, 2006.

SAEI, M. M. *et al.* Effects of different levels of BioAcid Ultra on growth performance, survival, hematological and biochemical parameters of fingerlings rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Aquaculture Research & Development**, Barcelona, v. 7, n. 2, 2016.

SAKATA, T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 58, n. 1, p. 95-103, 1987.

SANTOS, C. M. R. **Efeito da utilização de óleos essenciais e ácidos orgânicos microencapsulados na alimentação do leitão**. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

SATAM, S. B. *et al.* Ornamental fisheries: a new avenue to supplement farm income. **Advanced Agricultural Research & Technology Journal**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 193-197, July 2018.

SCHWARZ, K. K. *et al.* Mannanooligosaccharides in diets for Nile tilapia, juveniles. **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 197-203, 2010.

SEIXAS-FILHO, J. T. Revisão sobre as enzimas digestivas nos peixes teleósteos e seus métodos de determinação. **Augustus**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 17, jul./dez. 2003.

SILVA, B. C. *et al.* Ácidos e sais orgânicos na aquicultura: seus efeitos na nutrição e saúde de organismos aquáticos. *In*: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W.S. (org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos: Pedro & João, 2015.

SU, X. *et al.* The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid. **Aquaculture international**, Oostende, v. 22, n. 6, p. 1823-1835, 2014.

VARGAS-ABÚNDEZ, A. J. *et al.* Insect meal based diets for clownfish: Biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. **Aquaculture**, [s. l.], v. 498, p. 1-11, 2019.

XIE, S.; ZHANG, L.; WANG, D. Effects of several organic acids on the feeding behavior of *Tilapia nilotica*. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 19, n. 4, p. 255-257, 2003.

YASUMARU, F. A. **Influência do ácido caprílico suplementado na ração de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* no controle de *Ichthyophthirius multifiliis***. 2007. 41f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

## REFERÊNCIA DA INTRODUÇÃO GERAL

- ADDAM, K. G. S. *et al.* Dietary organic acids blend alone or in combination with an essential oil on the survival, growth, gut/liver structure and de hemato-immunological in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. 2960-2971, 2019.
- AHMAD, H. Y. *et al.* Comparative effects of organic acids fed diet on morphometry of visceral organs and intestinal histology of two broiler strains. **Global Veterinaria**, Pakistan, v. 13, n. 2, p. 221-226, 2014.
- BLANK, R. *et al.* Effects of formic acid and phytase supplementation on digestibility and use of phosphorus and zinc in growing pigs. **Journal of animal science**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 212-214, 2012.
- BOTELHO-FILHO, G. F. **O Aquário Ornamental**. São Paulo: Nobel, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Mapa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 dez. 2004.
- BRUNNER, B. **The ocean at home: an illustrated history of the aquarium**. New York: Princeton Architectural Press, 2005.
- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, London, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.
- CALADO, R. *et al.* (ed.). **Marine ornamental species aquaculture**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017. p. 647-649.
- CARRACA, S. I. S. **Estágio no Oceanário de Lisboa Técnicas de aquariofilia em aquários públicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos) - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2016.
- CASTILLO, S. *et al.* Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 433, p. 6-12, 2014.
- CAVALHEIRO, A. C. R. *et al.* Microingredientes utilizados em alimentação de peixes em cativeiro—Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, p.1-20, 2014.
- COLONI, R. D. Utilização dos Ácidos Orgânicos nas Dietas de Frangos de Corte. **PUBVET**, Maringá, v. 2, n. 41, 2008.
- CRACKNELL, D. *et al.* Marine biota and psychological well-being: a preliminary examination of dose–response effects in an aquarium setting. **Environment and Behavior**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 1242-1269, 2016.
- DEFOIRDT, T. *et al.* Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **Biotechnology Advances**, [sl l.], v. 27, n. 6, p. 680-685, 2009.

DEY, V. K. The global trade in ornamental fish. **Infofish International**, [s. l.], v. 2016, p. 52-5, 2016.

EDWARDS, Nancy E.; BECK, Alan M. Animal-assisted therapy and nutrition in Alzheimer's disease. **Western journal of nursing research**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 697-712, 2002.

FRANCO, L. D. *et al.* Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l.], v. 89, n. 3/6, p. 88-93, 2005.

FREITAG, M. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: LÜCKSTÄDT, C. **Acidifiers in animal nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, 2007. p. 131– 139.

INSTITUTO PET BRASIL. Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil (2018). Disponível em: <http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>. Acesso em: 13 nov. 2019.

KIDD, A. H.; KIDD, R. M. Benefits, problems, and characteristics of home aquarium owners. **Psychological Reports**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 998-1004, 1999.

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

KOH, C. B. *et al.* Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and resistance to *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 357-369, 2016.

KOWALSKI, L. H. *et al.* Efeito de um blend de ácidos orgânicos (acidal® cal) sobre o desempenho de leitões recém desmamados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2.; CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 1., 2015, Curitiba. **Resumos [...]**. Curitiba: UFPR, 2015.

LUCKSTADT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, [s. l.], v. 3, n. 44, p. 1-8, 2008.

MACHINSKY, T. G. *et al.* Digestibilidade de nutrientes e balanço de Ca e P em suínos recebendo dietas com ácido butírico, fitase e diferentes níveis de cálcio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2350-2355, 2010.

MINE, S.; BOOPATHY, R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **Current microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 1-7, 2011.

NG, W. K.; KOH, C. B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 342-368, 2017.

OLIVOTTO, I.; GEFFROY, B. Clownfish. In: CALADO, R. *et al.* (ed.). **Marine Ornamental Species Aquaculture**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017. p. 177-199.

PALMTAG, M. R. The marine ornamental species trade. *In*: CALADO, R. (ed.). **Marine ornamental species aquaculture**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017. p. 3-14.

PAUL, S. K. *et al.* Effect of organic acid salt on the performance and gut health of broiler chicken. **The Journal of Poultry Science**, Ibaraki, v. 44, n. 4, p. 389-395, 2007.

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**, [s. l.], p. 1-14, 2019.

REDA, R. M. *et al.* Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 50, p. 255-262, 2016.

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**, California, v. 7, n. 5, [não paginado], 21 May 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035808>. Acesso em: 5 ago. 2020.

RIBEIRO, F. A. S.; LIMA, M. T.; FERNANDES, C. J. B. K. Panorama do mercado de organismos aquáticos ornamentais. **Boletim Sociedade Brasileira de Limnologia**, Rio Claro, v. 38, n. 2, p. 15, 2010.

RODRIGUES, R.; MEURER, F.; BOSCOLO, W. R. Aditivos en la nutrición de peces. **Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA**, Sincelejo, p. 228-236, 2015.

SAEI, M. M. *et al.* Effects of different levels of BioAcid Ultra on growth performance, survival, hematological and biochemical parameters of fingerlings rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Aquaculture Research & Development**, Barcelona, v. 7, n. 455, p. 2, 2016.

SAKATA, T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 58, n. 1, p. 95-103, 1987.

SATAM, S. B. *et al.* Ornamental fisheries: a new avenue to supplement farm income. **Advanced Agricultural Research & Technology Journal**, [s. l.], v. 2, p. 193-197, 2018.

SILVA, B. C. *et al.* Ácidos e sais orgânicos na aquicultura: seus efeitos na nutrição e saúde de organismos aquáticos. *In*: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W.S. (org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos: Pedro & João, 2015. p. 579-620.

TECHSCI RESEARCH. **Global Ornamental Fish Market By Type (Tropical Fresh Water, Temperate Fresh Water & Marine Ornamentals), By Point of Sale (Dedicated Stores, Multi-Specialty stores, Online and Others) Competition Forecast & Opportunities**. New York, [2017]. Disponível em: <https://www.techsciresearch.com/report/ornamental-fish-market/4751.html>. Acesso em: 5 ago. 2020.

THORNHILL, D. J. Ecological impacts and practices of the coral reef wildlife trade. **Defenders of Wildlife**, Washington, v. 187, p. 179, 2012.

VAZQUEZ, J.A.; GONZALEZ, M. P.; MURADO, M. A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, [s. l.], 245:149-161, 2005.

VIELMA, J.; LALL, S. P. Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, Bergen, v. 3, n. 4, p. 265-268, 1997.

VIOLA, E. S. *et al.* Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos láctico, fórmico, acético e fosfórico no alimento ou na água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 37, n. 2, p. 296-302, 2008.

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