



**Efeito da incorporação de microalgas e copépodes em
alimentos para peixe-palhaço, *Amphiprion percula***

Marcela Domingues França

[2015]



Efeito da incorporação de microalgas e copépodes em alimentos para peixe-palhaço, *Amphiprion percula*

Marcela Domingues França

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Projeto de Mestrado realizado sob a orientação da Especialista Teresa Maria Coelho Baptista e Doutor Jorge Dias

[2015]

Efeito da incorporação de microalgas e copépodes em alimentos para peixe-palhaço, *Amphiprion percula*

Copyright © Marcela Domingues França

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2015

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Não podia perder a oportunidade de deixar aqui um enorme agradecimento a todos os que me orientaram, tiveram paciência e me ajudaram a ultrapassar todos os obstáculos.

Todos os OBRIGADAS são muito poucos para agradecer toda a paciência e confiança por parte da grande orientadora, Teresa Baptista. Sem si, nada deste trabalho teria sido possível. Ajudou-me a levantar a cabeça nos momentos mais complicados, e a festejar naqueles de enorme felicidade. Não foi apenas uma orientadora, foi sim uma grande amiga na qual deposito enorme confiança. MUITO OBRIGADA pela oportunidade de trabalhar consigo, sem dúvida que foi a melhor decisão tomada.

Também à professora Ana Pombo, deixo um agradecimento. Apesar de não estar diretamente ligada ao trabalho, não deixou de demonstrar preocupação e aconselhar quando necessário. Ao Doutor Jorge Dias, pela proposta de tema que me deu oportunidade de trabalhar com uma espécie que desde sempre sonhei, e trouxe oportunidade de alargar horizontes.

Sem ti, Ana Margarida, o início deste trabalho não teria sido possível. Foste uma luz ao fundo do túnel quando mais precisei, e nunca vou conseguir agradecer toda a disponibilidade, paciência e conselhos, que tanto contribuíram para que este trabalho seguisse em frente.

Minha Mafaldinha, minha companheira de todas as horas. Apareceste na melhor altura. Muito obrigada por todas as conversas e enormes desabafos. Por cuidares dos meus bebés quando necessário e por tudo o resto. Tenho muito orgulho em ti, e espero que a vida nos mantenha juntas. Sem ti, não seria a mesma coisa ;)

Mónica, também a ti te agradeço pelo companheirismo e amizade construída, e pela ajuda prestada quando necessário ☺

Rodolfo, através do trabalho que fizemos juntos, muitas ideias tivemos, muito sonhámos, e muito nos ajudámos mutuamente. Agradeço-te por teres confiado em mim para te dar uma pequena orientação e ajudar a concluir uma fase da tua vida ;)

À minha Carmen, que tanto me atura todas as manhãs com um “Olá mããããããeee” :D Dizes que não contribuíste para o meu trabalho, mas estás enganada. Toda a tua paciência para nos aguentar e guiar-nos na melhor direção não tem preço. E por isso, aqui fica um “OBRIGADA MÃÃEEE” que tu tanto conheces :p

Madrinhaaaa, Marina Machado, tu que me aturas há tanto tempo e mesmo assim foste capaz de me aguentar ainda mais nesta altura :D Obrigada por dispensares horas do teu tempo para me ajudar a conseguir avançar, pelas insistências diárias e empurrões quando necessário. Mesmo longe continuas a cuidar de mim a toda a hora, e continuas a ser o meu maior exemplo de superação e sucesso. Veneras-me :p Mas o facto de seres o meu orgulho faz com que sinta o mesmo por ti ☺ MUITO OBRIGADA!!!

A ti, Ricardo Passos, por seres muito mais que um namorado. Por seres o melhor amigo que poderia ter, a pessoa com mais paciência e que nunca perdeu a esperança em mim. Por me abrires os olhos e levantares a cabeça, por partilhares todos os pequenos momentos, e confiares em mim. Este trabalho não teria sido o mesmo se não o tivesse partilhado contigo. OBRIGADAAA!!! ☺

Por fim, às duas pessoas que tornaram tudo isto possível. Que fizeram de tudo para eu chegar até aqui, ultrapassando todas as dificuldades, só para me ver sorrir e seguir os meus sonhos. Não há palavras que cheguem para agradecer.

*ESTA TESE É DEDICADA A VOCÊS, DOLORES SILVA E MÁRCIO FRANÇA,
OS MELHORES PAIS DO MUNDO.*

Resumo

O *hobby* da aquariofilia é uma das atrações mais populares, representando uma grande oportunidade de crescimento económico para a aquacultura ornamental, bem como uma contribuição para a sustentabilidade dos stocks naturais das várias espécies cultivadas (Wabnitz *et al.*, 2003). O peixe-palhaço, *Amphiprion percula*, é uma espécie de elevado valor comercial, devido à sua coloração laranja intensa e comportamento de simbiose interessante com várias espécies de anémonas, sendo uma espécie chave para a aquacultura ornamental (Madhu *et al.*, 2006).

Juvenis de *A. percula* foram expostos a três novas formulações de dietas, contendo diferentes suplementos, com o objetivo de avaliar o seu efeito no crescimento, sobrevivência e alterações na pigmentação dos indivíduos. As dietas eram suplementadas com copépodes, *Chlorella* e uma mistura das duas anteriores, sendo usada como controlo uma formulação comercial.

Peixes-palhaço com peso médio de $0,13 \pm 0,06$ g foram mantidos em sistema RAS, composto por 12 aquários de 40L e foram alimentados com as dietas experimentais até à saciedade, três vezes ao dia, durante 93 dias. No final do ensaio foram expostos a pesagem e medição para avaliação do seu crescimento. Três indivíduos de cada aquário foram retirados para análise da pigmentação da pele através de espectrofotometria, e fotografias tiradas ao longo do ensaio foram analisadas através do modelo HSB (Matiz-Saturação-Brilho).

Embora todas as dietas tenham demonstrado eficácia em promover crescimento e sobrevivência nos juvenis de *A. percula*, a suplementação com copépodes parece ser a mais eficaz para um rápido crescimento e aumento da pigmentação laranja na pele dos peixes. A melhoria destes aspetos é bastante importante, não só porque permite acelerar a produção em larga escala de indivíduos em cativeiro, nunca esquecendo o seu bem-estar, bem como a melhoria da pigmentação que os torna mais desejados, evitando a sobre exploração dos *stocks* de indivíduos selvagens.

Palavras-chave: Aquacultura ornamental, Copépodes, *Chlorella*, Crescimento, Pigmentação

Abstract

The marine aquarium hobby is one of the most popular, representing a great opportunity of business for the ornamental aquaculture, as well as contributing to the sustainability of the natural stocks of the various species cultivated (Wabnitz *et al.*, 2003). Clownfish, *Amphiprion percula*, is a specie with a high commercial value associated, which is caused by its intense orange coloration and symbiosis behaviour with some anemones. This factors turn *A. percula* into a key specie for the ornamental aquaculture (Madhu *et al.*, 2006).

Juvenile *A. percula* were exposed to three new diet formula, with different supplements, intending to evaluate the effects on growth, survival and pigmentation of the individuals. Diets contained copepods, *Chlorella* and a mix of both. Control diet was a commercial formula.

Clownfish weighting 0.13 ± 0.06 g were kept in a RAS system, with twelve 40L aquaria and were fed with the experimental diets *ad libitum*, three times a day for 93 days. At the end of the assay fish were weighted and measured to evaluate the growth. Three individuals of each aquarium were used for skin pigmentation analysis, by means of spectrophotometry and photography's taken along the experiment were analysed, using the HSB (Hue-Saturation-Brightness) model.

Despite every diet showed efficiency promoting growth and survival in juvenile *A. percula*, supplementation with copepods seemed to be the most efficient for a faster growth and a more intense orange skin pigmentation. The development of this aspects is of high importance, not only for the mass production acceleration in captivity, keeping in mind the fish well-being, but to improve the pigmentation which makes them more desirable, avoiding the wild stocks depletion.

Key-words: Ornamental aquaculture, Copepods, *Chlorella*, Growth, Pigmentation

Índice de matérias

1. Introdução	1
2. Materiais e Métodos	13
2.1. Desenho experimental	13
2.2. Dietas experimentais	14
2.3. Determinação de parâmetros morfométricos	16
2.4. Determinação de parâmetros zootécnicos	17
2.5. Análise de carotenoides por espectrofotometria	17
2.6. Modelo HSB (Matiz-Saturação-Brilho)	18
2.7. Análise estatística	19
3. Resultados	21
3.1. Parâmetros morfométricos	21
3.2. Parâmetros zootécnicos	22
3.3. Análise de carotenoides por espectrofotometria	23
3.4. Análise visual da coloração da pele	24
3.4.1. Modelo HSB (Matiz - Saturação - Brilho)	26
4. Discussão	31
5. Conclusão	37
6. Referências Bibliográficas	39
Anexos	45

Índice de figuras

- Figura 1.1** - Exemplos de peixe-palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em cativeiro. Autor: Sanjay Joshi (a) e Asawin Lekprathum (National Geographic) (b). 3
- Figura 1.2** - Exemplo de juvenil de *Amphiprion percula*, utilizado no trabalho experimental. Autor: Ivan Freitas. 4
- Figura 1.3** - Exemplos de *Amphiprion percula*, selvagem (a) vs cativeiro (b). Autores: Francesco Ricciardi e desconhecido..... 6
- Figura 2.1** - Sistema de recirculação utilizado para a realização do trabalho experimental (a) e respectivo sistema RAS (b). Autor: Marcela França. 13
- Figura 2.2** - Diagrama representativo da distribuição das três dietas experimentais. . 14
- Figura 2.3** - Processo realizado nas amostragens iniciais e finais do ensaio experimental. Nas figuras encontram-se representados os passos de anestesia (a), medição (b), pesagem (c) e recuperação (d). Autor: Marcela França. 16
- Figura 2.4** - Processo de conservação dos organismos recolhidos para posterior análise de carotenoides por espectrofotometria. Nas figuras encontram-se representados os passos de anestesia (a), colocação em sacos de congelação individuais (b), embrulho em papel de alumínio (c) e colocação em congelador a -20°C (d). Autor: Marcela França. 18
- Figura 2.5** - Exemplo de análise de valores de HSB, numa fotografia capturada durante o ensaio, com auxílio do programa Adobe Illustrator CC 2015..... 19
- Figura 2.6** - Ilustração do modelo HSB (Matiz-Saturação-Brilho) mostrando a relação entre matiz, saturação e brilho como um cone, com visão lateral (a) e visão superficial (b). 19
- Figura 3.1** - Peso inicial e final em gramas (a) e comprimento inicial e final em centímetros (b) observado em todas as dietas. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP. Asterisco assinala diferenças estatisticamente significativas entre tempos para a mesma dieta. Letras indicam diferenças entre dietas para o mesmo tempo (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$). 22

Figura 3.2 - Concentração de carotenoides observada na pele dos peixes expostos às diferentes dietas experimentais, através de espectrofotometria. Os valores encontram-se expressos como média ± DP. Letras indicam as diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos (ANOVA de um fator, $p \leq 0,05$).	23
Figura 3.3 - Análise visual da coloração dos indivíduos alimentados com as diferentes dietas experimentais em Fevereiro (a), Março (b) e Abril (c).....	25
Figura 3.4 - Matiz (°) da zona dorsal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Os valores encontram-se expressos como média ± DP. Letras maiúsculas indicam as diferenças estatisticamente significativas entre dietas independentemente do tempo (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).	27
Figura 3.5 - Brilho (%) da zona dorsal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Os valores encontram-se expressos como média ± DP. Letras maiúsculas indicam as diferenças estatisticamente significativas entre dietas independentemente do tempo. Símbolos indicam diferenças entre tempos, para a mesma dieta (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).	27
Figura 3.6 - Saturação da zona dorsal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Símbolos indicam diferenças entre tempos, para a mesma dieta. Os valores encontram-se expressos como média ± DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).	28
Figura 3.7 - Matiz (°) da barbatana caudal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas independentemente do tempo. Símbolos indicam diferenças entre tempos, para a mesma dieta. Os valores encontram-se expressos como média ± DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).	28
Figura 3.8 - Saturação (%) da barbatana caudal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas independentemente do tempo. Os valores encontram-se expressos como média ± DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).	29
Figura 3.9 - Brilho da barbatana caudal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas independentemente do tempo. Os valores encontram-se expressos como média ± DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).	29

Índice de tabelas

Tabela I - Composição basal das dietas formuladas pela empresa SPAROS, Lda..... 15

Tabela II - Parâmetros morfométricos (K) e zootécnicos (SGR, DGI, AGR) de juvenis de *Amphiprion percula* alimentados com diferentes dietas experimentais. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP. Letras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes parâmetros (ANOVA de uma via, $p \leq 0,05$)..... 23

Tabela III - Carotenoides observados na pele dos peixes expostos às diferentes dietas experimentais. Valores obtidos através da comparação do $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) encontrados, com valores base (Rodriguez-Amaya., 2001). 24

Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

AGR – Taxa de crescimento absoluto

COP+CHL – Copépodes+ *Chlorella*

DGI – Índice de crescimento diário

DP – Desvio padrão

HSB – Modelo Matiz-Saturação-Brilho (Siglas em Inglês)

K – Índice de condição

nm – Nanómetros

RAS – Sistema de Recirculação

Rpm – Rotações por minuto

SGR – Taxa de crescimento específico

1. Introdução

A aquacultura contribui para o abastecimento dos mercados com organismos aquáticos sem que haja esgotamento dos recursos naturais, respondendo à intensa procura que se verifica nos dias de hoje (Tlusty, 2002). Apesar da maior parte da produção mundial deste setor, ter como finalidade a produção de alimento, contribuindo para o bem-estar e prosperidade da população, a aquacultura ornamental é, também, um mercado importante desta indústria (Tlusty, 2002).

O *hobby* da aquariofilia tem-se tornado cada vez mais lucrativo. O aumento do número de aquaristas interessados neste negócio tem vindo a crescer ao longo dos anos (Dhaneesh *et al.*, 2012), fazendo com que, hoje em dia, o número de peixes ornamentais disponíveis no mercado atinja as 1800 espécies (Rhyne *et al.*, 2012). Estima-se que apenas o negócio da venda de espécies ornamentais esteja avaliado em mais de 8 biliões de dólares. Enquanto indústria global, incluindo aquários, plantas, acessórios, alimentação, medicação, etc., este negócio ronda os 20 biliões de dólares de acordo com Kumar *et al.* (2015).

A crescente procura por estes organismos tem tido impactos negativos, sendo que a maioria dos ornamentais de água salgada são capturados no ambiente selvagem, causando grande preocupação com a depleção dos *stocks* devido à sua sobre-exploração, bem como a destruição e a danificação dos recifes pela ação dos métodos de captura (Madhu *et al.*, 2006). As técnicas de captura passam pelo uso de cianeto para anestesiar as espécies de elevado valor. O uso deste composto químico é conhecido por ser não seletivo, chegando a atingir várias espécies de invertebrados, apresentando uma ação altamente destrutiva (Mak *et al.*, 2005). O branqueamento de corais, depois da sua exposição a cianeto, é um dos efeitos mais graves observados (Cervino *et al.*, 2003). Embora os recifes cubram menos de 1% no ambiente marinho, são considerados os ecossistemas mais produtivos e ricos da terra. Suportam mais de 4000 espécies de peixes, cerca de 800 espécies de corais que compõem os recifes e outros milhares de invertebrados. As últimas décadas têm sido caracterizadas por efeitos antropogénicos negativos nos recifes de coral. A sedimentação, o enriquecimento de nutrientes por detritos humanos e produtos de agricultura, sobre pesca e aquecimento global, juntamente com a pesca intensiva como resposta à demanda do *hobby* da aquariofilia apresenta um impacto muito importante no desaparecimento dos recifes.

É estimado que, desde os oceanos até aos aquários, o número de peixes que chegam aos mercados ainda vivos não atinjam os 20% (Gordon e Hecht, 2002), acabando por morrer durante a captura, transporte, devido ao uso de compostos químicos durante a captura, práticas de manuseamento desadequadas e doenças (Wabnitz *et al.*, 2003). Os fracos números de sobrevivência observados nos indivíduos capturados, devido à dependência da indústria da captura de espécimes selvagens para suprir as necessidades do crescente negócio, incentivou todos os intervenientes envolvidos a iniciar um esforço a nível mundial para minimizar a pressão nas populações naturais das espécies ornamentais marinhas, com o intuito de promover a sustentabilidade destes valiosos recursos (Corbin, 2001; Olivotto *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015). Tlusty (2002) afirmou que o cultivo de peixes e invertebrados ornamentais é atualmente reconhecido como uma possível alternativa à recolha de animais do seu ambiente selvagem mas, ainda assim, a maioria das espécies cultivadas não são produzidas em volume suficiente para sustentar o mercado da aquariofilia (Ho *et al.*, 2013).

Há cerca de uma década atrás, apenas 100 das 800 espécies marinhas ativamente comercializadas para o *hobby* da aquariofilia eram provenientes de cultivo, e apenas 1,4% eram disponibilizadas ao consumidor (Tlusty, 2002; Wabnitz *et al.*, 2003). Contrariamente, em relação a espécies de água doce, mais de 90% são conseguidas em cativeiro (Gordon e Hecht, 2002; Kumar *et al.*, 2015). Mas, graças aos esforços referidos para o desenvolvimento da aquacultura ornamental, hoje em dia o número de peixes ornamentais marinhos cultivados ultrapassa as 84 espécies, incluindo peixes-palhaço, donzelas, góbios, cardinais e *pseudochromis* (Gopakumar, 2006).

É de esperar que a grande maioria do mercado interessado nas espécies mais populares fique satisfeito com peixes provenientes de aquacultura mas, ainda assim, existem certos entraves inerentes a este tipo de produções, como a falta de conhecimento acerca da alimentação e reprodução e necessidades nutricionais das larvas, sendo que as deficiências apresentadas pelos indivíduos podem ser um fator limitante para o sucesso deste tipo de produção (Önal *et al.*, 2008; Olivotto *et al.*, 2011). Contudo, tem-se observado uma melhoria das tecnologias de cultivo, estando a família Pomacentridae, à qual fazem parte os peixes-palhaço, envolvida da maioria das experiências reprodutivas (Olivotto *et al.*, 2003).

Para além de ajudar no suprimento das necessidades do mercado da aquariofilia, a aquacultura ornamental poderá colaborar com investigações por forma a resolver as dificuldades ainda verificadas. Aspectos como a possibilidade de recolha de informação importante acerca do ciclo de vida das diferentes espécies (idade de maturação, fecundidade), aumento da sobrevivência e adaptação a cativeiro das espécies mais sensíveis, melhor gestão dos *stocks* naturais e a forma como estes organismos respondem aos impactos pelo ser humano poderão ser resolvidos com a ajuda de diversos estudos, contribuindo para melhorias do cultivo de diversas espécies (Wittenrich, 2007; Olivotto *et al.*, 2011).

Dentro das diferentes espécies ornamentais marinhas, o género *Amphiprion* e *Premnas* pertencentes à família anteriormente descrita, e à subfamília Amphiprioninae, comumente conhecidos por peixes-palhaço, são uma das maiores atrações em todo o mundo. Esta fama deve-se a aspetos físicos como pequeno tamanho, robustez e coloração atrativa, e aspetos comportamentais como fácil adaptabilidade à vida em cativeiro, aceitabilidade de dietas artificiais, fascinante comportamento e relação simbiótica com anémonas (Madhu *et al.*, 2006; Avella *et al.*, 2007; Wittenrich, 2007).

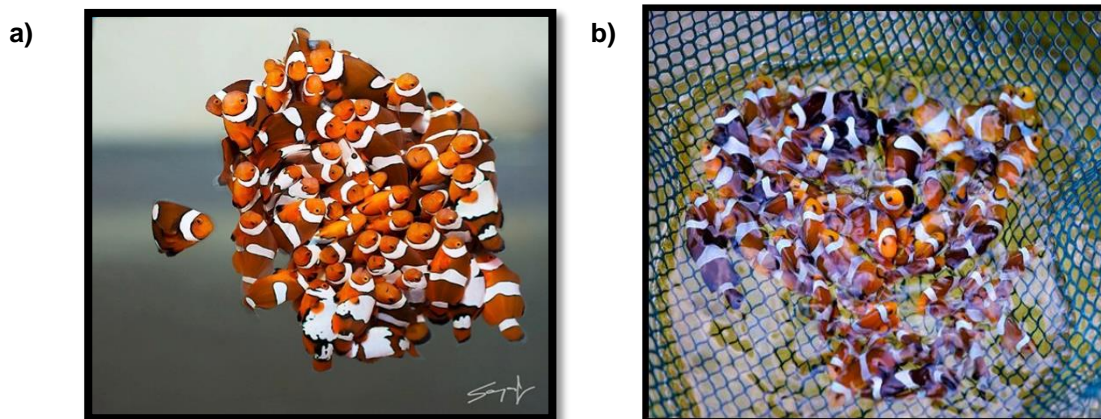


Figura 1.1 - Exemplos de peixe-palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em cativeiro. Autor: Sanjay Joshi (a) e Asawin Lekprathum (National Geographic) (b).

Amphiprion percula é uma das 32 espécies pertencentes à família Pomacentridae. Tipicamente, os indivíduos desta espécie possuem uma cor laranja brilhante, com três linhas laterais brancas verticais, sendo que a central possui uma protuberância na zona anterior. Estas linhas são delineadas com grossas margens pretas, que podem preencher a zona anterior do indivíduo. Também as barbatanas apresentam pigmentação preta ao longo das margens. O tamanho máximo atingido pelos indivíduos é de 110mm.

Vivem em lagoas costeiras ou recifes de coral do Pacífico Oeste, na zona geográfica da Grande Barreira de Coral Australiana (Lieske e Myers, 1994), formando pequenos grupos entre 2 e 6 membros, no qual o indivíduo maior é a fêmea reprodutora, o 2º indivíduo da hierarquia de tamanho é o macho reprodutor e os restantes são não reprodutores (Fautin, 1992; Buston, 2003). A diferença de tamanhos mantém a ordem no grupo e apenas quando um dos peixes mais acima na hierarquia morre é que os restantes sobem no grupo. Caso a fêmea dominante morra ou desapareça é o macho reprodutor que a substitui, sofrendo inversão sexual (hermafroditismo protândrico). Normalmente o laço entre fêmea-macho apenas é quebrado quando um dos membros é perdido. Numa população a conversão de um macho funcional para fêmea, ou de um macho imaturo para macho reprodutor pode demorar desde alguns meses até um ano (Hoff, 1996; Yasir e Qin, 2007).

Em termos de reprodução, os indivíduos desta espécie são reprodutores bentônicos, fixando os ovos numa rocha protegida pela anêmona com a qual possuem relação simbiótica, previamente limpa pelo macho reprodutor. Os ovos são altamente pigmentados e contêm carotenoides no saco vitelino, resultando em ovos com coloração laranja. Depois da postura, ambos os reprodutores se mantêm por perto até as larvas eclodirem, remexendo o ninho com as barbatanas para fornecer oxigénio e removendo ovos mortos (Green e McCormick, 2004).



Figura 1.2 - Exemplar de juvenil de *Amphiprion percula*, utilizado no trabalho experimental. Autor: Ivan Freitas.

Devido às suas características fisiológicas, morfológicas e comportamentais, os peixes-palhaço são dos ornamentais marinhos mais populares e desejados em todo o mundo (Yasir e Qin, 2007, 2009a; Rhyne *et al.*, 2013). Estima-se que cerca de 400 000 indivíduos das espécies *Amphiprion percula* e *Amphiprion ocellaris* sejam anualmente importados para os Estados Unidos (Rhyne *et al.*, 2012). Segundo Wabnitz *et al.* (2003), entre 1997-2002, o peixe-palhaço, mais conhecido como *Nemo* devido ao famoso filme “*À procura de Nemo*”, foi a espécie ornamental marinha mais exportada, totalizando 15,6% do número total de peixes enviados para todo o mundo e mais de 25% para países europeus. Assim, o peixe-palhaço foi considerado o peixe-dourado da aquariofilia marinha, sendo que o seu valor é julgado através da coloração da pele (Hoff, 1996). Para além disto, os indivíduos do género *Amphiprion* são uma boa referência para pesquisas científicas, especialmente em estudos nutricionais e de biologia reprodutiva (Fernando *et al.*, 2006; Vinoth *et al.*, 2010; Madhu *et al.*, 2012). Nos dias de hoje já se verifica um grande sucesso no cultivo de várias espécies de peixes-palhaço de diferentes locais do mundo (Hoff, 1996; Ignatius *et al.*, 2001; Kumar e Balasubramanian, 2009; Dhaneesh *et al.*, 2011, 2012).

Mas, apesar da sua fama no mundo da aquariofilia, a produção de *A. percula* enfrenta ainda diversas dificuldades devido às taxas de mortalidade observadas nas primeiras fases do ciclo de vida e mal formações devido ao *stress*, mas o principal problema continua a ser a desvalorização devido à diferença de cor em relação aos seus congéneres selvagens (Dhaneesh, 2012) que apresentam um laranja avermelhado ou rosado, enquanto os de cativeiro exibem um laranja amarelado ou brilhante. Segundo Tanaka *et al.* (1992) a composição de carotenoides no tegumento possui potencial de modificação da cor do peixe-palhaço de amarelo-alaranjado para laranja-rosado quando os indivíduos são transportados do meio natural para tanques de cultivo, mas as condições não foram ainda analisadas.

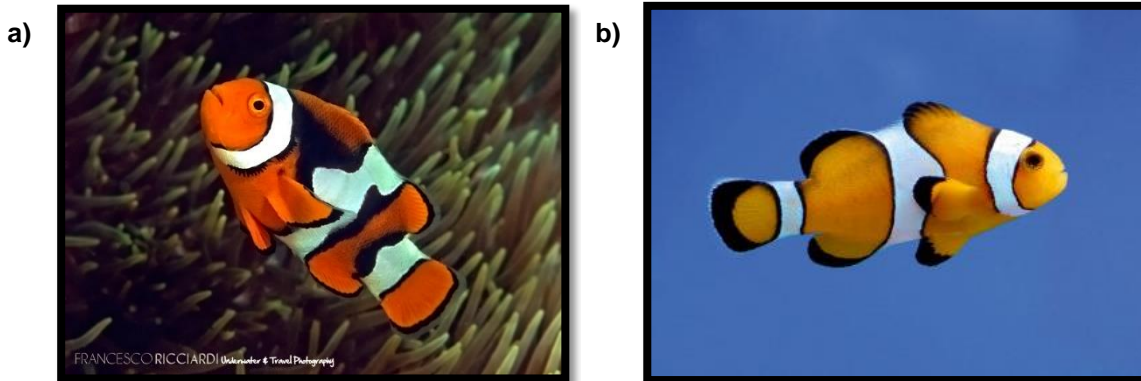


Figura 1.3 - Exemplares de *Amphiprion percula*, selvagem (a) vs cativo (b). Autores: Francesco Ricciardi e desconhecido.

Os peixes ornamentais são caracterizados pela grande diversidade de cores e seus padrões. O sucesso do comércio da aquarioria, bem como o marketing do produto estão muito dependentes da intensidade e colorações vibrantes dos peixes, forma e tamanho corporal e forma das barbatanas. Todos estes fatores são determinantes para o preço dos indivíduos no mercado mundial (Gouveia *et al.*, 2003; Gouveia e Rema, 2005), e o peixe-palhaço não é exceção (Tanaka *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 2013).

Na natureza, os peixes possuem cores vivas e intensas mas, em condições de cultivo intensivas, essa coloração desvanece, tornando-os menos apreciados no mercado. Ao longo do tempo foram encontradas soluções para este problema, verificando-se que a cor dos indivíduos pode ser alterada por fatores ambientais, através de arranjos de cromatóforos presentes na pele (Sugimoto, 1993; Yasir e Qin, 2009b). De acordo com os autores, a mudança da cor de fundo pode provocar adaptações fisiológicas, comumente conhecidas como camuflagem de forma a diminuir as interações predador-presa. Este fator pode não só ter impacto no sucesso alimentar de larvas de peixe, conseguindo também afetar a performance de cor dos indivíduos. Yasir e Qin (2009a) afirmam que, dentro dos fatores que induzem alterações de cor estão os fatores de *stress* ambientais e verificaram que a baixa intensidade luminosa ou a coloração de fundo azul podem tornar a pele dos peixes-palhaço mais brilhante, tornando-os desejados, valorizando o seu preço a nível comercial. Mas, a manipulação ambiental encontra-se longe de alterar permanentemente a composição de pigmentos na pele dos peixes, sendo que a alternativa poderá passar por explorar a resposta dos peixes-palhaço à manipulação através da dieta (Ramamoorthy *et al.*, 2010; Yasir e Qin, 2010; Ho *et al.*, 2013, 2014).

Os carotenoides são sintetizados por plantas, algas e certas bactérias (McGraw e Ardia, 2003; van Nieuwerburgh *et al.*, 2005), sendo responsáveis pela coloração vermelha, laranja e amarela dos peixes e crustáceos (Hill *et al.*, 2002). Sabe-se que a coloração laranja da pele da espécie *Amphiprion ocellaris*, parente próximo de *A. percula*, depende dos carotenoides ingeridos (Tanaka *et al.*, 1992; Hoff, 1996). Possuem um importante papel na regulação da cor destes organismos uma vez que, tal como em outros animais, os peixes não são capazes de sintetizar carotenoides (Goodwin, 1984; Ho *et al.*, 2013), estando dependentes da sua presença na dieta (McGraw e Ardia, 2003; van Nieuwerburgh *et al.*, 2005). Para além da pigmentação, as microalgas presentes contêm outros nutrientes essenciais que determinam a qualidade, sobrevivência, crescimento e resistência a doenças por parte dos peixes de aquário. Através da ingestão de carotenoides, os peixes são capazes de modificar os carotenoides alimentares e armazená-los no tegumento e outros tecidos (Yasir e Qin, 2010). Parece então existir uma relação direta entre carotenoides e a coloração existente nos peixes (Ramamoorthy *et al.*, 2010). Uma vez que os indivíduos de cultivo, contrariamente aos selvagens, não têm acesso a carotenoides naturalmente, torna-se necessária a adição destes em dietas de modo a manter a coloração brilhante. Levanta-se a hipótese que através da adição desses carotenoides seja possível modular uma coloração laranja mais intensa e atrativa nos exemplares de *A. percula* em cativeiro.

A ingestão de carotenoides através da dieta, tais como β , β - caroteno, zeaxantina (β , β -caroteno – 3,3' – diol) e astaxantina (3 – 3' – di-hidroxi - β , β – caroteno – 4, 4' – diona) leva a uma deposição direta destes componentes na pele sem modificações ou como metabolitos (Blount *et al.*, 2002; Hudon *et al.*, 2003, Ho *et al.*, 2013). Para além de promoverem coloração, foi já demonstrado que os carotenoides, especialmente astaxantina, possuem fortes propriedades antioxidantes através da ação como coletores de radicais de oxigénio livre. Com esta característica parecem capazes de remover potenciais espécies de oxigénio ativo danificadoras, radicais livres orgânicos, oxigénio atómico (1O_2) e radicais de hidróxido ($\bullet OH$) dos sistemas metabólicos (Goto *et al.*, 2001). Contudo, o aspeto mais importante da astaxantina em termos de aquacultura da espécie *A. ocellaris* é o facto de esta ser o elemento chave dos pigmentos na dieta destes organismos (Tanaka *et al.*, 1992, Hoff, 1996).

A astaxantina, um carotenoide classificado como xantofila, tem sido vulgarmente usada em aquacultura de modo a proporcionar coloração em carne de salmão (Wathne *et al.*, 1998; Bjerkgeng *et al.*, 1999) e em pele de pargo (Booth *et al.*, 2004; Kalinowski *et al.*,

2005). Demonstrou também capacidade de promover coloração em vários peixes ornamentais como espadas (*Xiphophorus hellerii*), carpas koi (*Cyprinus carpio*) e peixe-dourado (*Carassius auratus*) (Ako *et al.*, 2000; Gouveia *et al.*, 2003; Wallat *et al.*, 2005). No que respeita a peixes-palhaço, foi verificado que quando alimentados com diferentes concentrações de carotenoides, incluindo astaxantina, a sua concentração na pele foi significativamente alterada (Hoff, 1996). Contudo, a deposição de carotenoides na pele dos peixes depende do seu tipo e da sua dose nas dietas, enquanto a sua eficácia em termos de deposição e a pigmentação parece variar de espécie para espécie. Como exemplo, os peixes dourados convertem o pigmento amarelo zeaxantina em astaxantina, e a truta arco-íris reage de forma contrária convertendo a astaxantina em zeaxantina (Schiedt *et al.*, 1985).

No peixe-palhaço, a sua capacidade para converter pigmentos numa dieta e modificar a cor da pele ainda é pouco conhecida (Yasir e Qin, 2010). Para além disso, o carotenoide astaxantina é extramente caro para utilização em massa na alimentação, sendo necessário utilizar com moderação de modo a diminuir os custos de alimentação numa aquacultura. As formulações exatas e concentrações mínimas a serem usadas numa dieta de peixe-palhaço para obtenção de uma coloração desejada não são ainda bem conhecidas, apesar de já ter sido verificado que uma concentração de 80-160mg kg⁻¹ de astaxantina para *Amphiprion* e 214mg kg⁻¹ para *Premnas* é essencial para atingir uma coloração apelativa (Ho *et al.*, 2013). Contudo, os peixes-palhaço parecem não possuir capacidade para reter a cor apelativa que os caracteriza a longo prazo, caso a fonte de pigmentos essencial seja eliminada (Ho *et al.*, 2014). Assim, torna-se necessário realizar estudos de modo a determinar a concentração mínima de astaxantina numa dieta capaz de ajudar no desenvolvimento de alimentações adequadas para fornecer e manter a coloração adequada no peixe em questão, reduzindo os custos na produção, manutenção em casa e em aquários públicos e aumentar o seu valor comercial (Wallat *et al.*, 2005). Esta pesquisa necessita ter em conta que a expressão de uma coloração escura pode ser resultado de níveis elevados de *stress* devido à manipulação durante o cultivo, e a baixa dose de carotenoides pode aumentar a produção de melatonina uma vez que estes são conhecidos por prevenir o *stress* oxidativo (Chatzifotis *et al.*, 2005). Por outro lado, observar que existe um nível de saturação de carotenoides e o excesso pode ser metabolicamente transferido e excretado (Page e Davies, 2006).

Caso o melhoramento da coloração possa ser realizado através do alimento ingerido, administrando pigmentos enriquecidos, certamente a qualidade e preço de cada indivíduo

irá aumentar. Desta forma, os produtores de peixes ornamentais testam constantemente métodos que tornem a coloração da pele mais intensa. Apesar disso, os esforços recentes têm-se focado em componentes naturais como uma alternativa a carotenoides sintéticos visto que, como referido anteriormente, estes são uma preocupação devido ao seu elevado custo (Ramamoorthy *et al.*, 2010).

Foi já avaliado o potencial de vários componentes naturais como a coloração da levedura *Phaffia rhodozyma*, as bactérias marinhas *Agrobacterium aurantiacum*, *Chlorococcum* sp., e as algas verdes *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* e *Chlorella vulgaris* como fontes de carotenoides em dietas (Gouveia *et al.*, 2003). Em termos de sucesso, esta última microalga demonstrou ser a mais eficiente no aumento da intensidade da coloração da pele em peixes ornamentais, uma vez que a sua grande biodisponibilidade e a membrana celular fina são fatores que contribuem para o seu êxito. Ainda assim, existe diferença em termos de pigmentação entre fontes naturais e sintéticas. Uma suplementação com *C. vulgaris* demonstrou uma boa pigmentação em peixes-dourados mas, a maior taxa de carotenoides presentes na pele foi observada em peixes alimentados com dietas que continham astaxantina (Gouveia e Rema, 2005). Segundo Sinha e Asimi (2007), uma comparação entre 4 componentes naturais nestes peixes (spirulina, pétalas de rosa chinesa, pétalas de malmequer e lactobacilos a) demonstrou que as pétalas de rosa chinesas são uma boa fonte para destacar a pigmentação da pele e aumento o desenvolvimento das gónadas. No caso de espadas (*Xiphophorus helleri*), esta demonstrou ser uma boa fonte de pigmentos (Ezhil *et al.*, 2008). Contudo, a suplementação com carotenoides sintéticos ou naturais em algumas espécies não estimula crescimento, eficiência alimentar ou sobrevivência tornando-se necessário suplementar a alimentação com proteína (Gouveia *et al.*, 2003; Gouveia e Rema, 2005).

Um dos maiores entraves do crescimento do *hobby* da aquarofilia nos últimos 50 anos tem sido o desenvolvimento de alimentos comerciais, uma vez que é necessário ter em atenção a necessidade de quantificar os requerimentos nutricionais para a grande diversidade de espécies mantidas em aquários em casa ou em aquários públicos e a forma de disponibilizar dietas adequadas para cada indivíduo presente (Sales e Janssens, 2003; Lupatsch *et al.*, 2012). Ao contrário dos peixes dourados, carpas koi e espécies tropicais carnívoras de água doce (Ciclídeos), várias espécies de ornamentais são mantidas num ambiente conjunto, tornando difícil alimentar cada organismo com um alimento específico suprimindo as suas necessidades. Cada habitante deve ser presenteado com uma dieta própria, conforme os seus requisitos nutricionais, tamanho da boca, local de alimentação

(superfície, coluna de água ou fundo), regime alimentar, entre outros (Sales e Janssens, 2003). As rações encontradas no mercado são ainda generalizadas, isto é, um alimento é identificado como sendo ideal para várias espécies ornamentais fornecendo uma mistura flocos/pellets para carnívoros, herbívoros e omnívoros. Mas isto não indica que todos os indivíduos presentes no mesmo ambiente fiquem satisfeitos nutricionalmente de igual forma, estando o peixe-palhaço incluído neste leque de espécies. Assim sendo, torna-se necessário realizar estudos de modo a tentar produzir uma alimentação essencial para as várias espécies existentes no mercado, nomeadamente para peixe-palhaço, garantido a sua boa nutrição, sobrevivência, bem-estar, crescimento, pigmentação e boa manutenção da qualidade da água.

Referenciada anteriormente, a microalga de água doce, *Chlorella*, possui grande qualidade nutritiva e é largamente utilizada em aquacultura. Sendo um dos produtores primários de PUFA's (Hamilton *et al.*, 2014), possui na sua constituição cerca de 48 – 58% de proteína, 8 – 17% de hidratos de carbono e 14 – 22% de lípidos tornando-a num alimento vivo ideal para larvas de peixes marinhos (Spolaore *et al.*, 2006 e Postma *et al.*, 2015).

Entre as suas várias aplicações, *C. vulgaris* tem sido frequentemente utilizada de forma a aumentar as taxas de pigmentação em várias espécies de peixes, entre eles a truta arco-íris, a dourada, carpas koi e peixes-dourados (Gouveia *et al.*, 1998, 2002, 2003). Foi já verificado que esta microalga apresenta uma concentração de pigmentos que ronda os 0,4% de matéria seca, onde 80% são pigmentos que induzem a coloração avermelhada, sendo o caso da cantaxantina e astaxantina, que são acumuladas na sua maioria quando esta microalga se encontra em condições de *stress* (Gouveia *et al.*, 1998). Devido a estas características, torna-se interessante testar a sua suplementação em alimentações para *A. percula* de forma a perceber se *C. vulgaris* possui impacto sobre a pigmentação destes organismos, ajudando no seu aperfeiçoamento.

Os copépodes são considerados os organismos dominantes do zooplâncton de águas costeiras e tropicais, representando um importante elo de ligação entre o fitoplâncton e níveis tróficos superiores de muitos ecossistemas aquáticos. Atualmente, este grupo tem sido estudado para uso em atividades de aquacultura, como alimento na fase larval de peixes e camarões. Foi já demonstrado que, no ambiente selvagem, as larvas de peixes marinhos ingerem na sua maioria náuplios de copépodes e copepoditos, sendo a presa preferencial entre várias espécies. Estes demonstram uma grande escala de tamanhos entre náuplios e adultos, movimentos típicos que estimulam a atividade predatória das

larvas, e são compostos por uma elevada quantidade de ácidos gordos insaturados (HUFAs) (Olivotto *et al.*, 2010, 2012). Estes ácidos gordos, nomeadamente ácido araquidónico 20:4n-6 (AA), ácido eicosapentaenóico 20:5n-3 (EPA) e ácido docosahexaenóico 22:6n-3 (DHA) são essenciais para a sobrevivência e crescimento das larvas, tornando-se necessários numa dieta nas primeiras fases de vida dos indivíduos. A ausência destes pode ser a causa de fraca resistência a doenças, fraco crescimento, redução da eficiência alimentar, anemia e elevada mortalidade. Devido a estas composições a indústria da aquacultura considera importante suplementar dietas tradicionais com copépodes, obtendo dessa forma uma fonte de ácidos gordos essenciais. Avella *et al.* (2007, 2010) afirmam que, dentro dos modelos dos peixes marinhos, os peixes-palhaço (*Amphiprion* spp.) podem ser considerados bons candidatos a estudos uma vez que são hermafroditas protândricos, reproduzem regularmente em condições de laboratório, possuem desenvolvimento larvar curto (Olivotto *et al.*, 2010) e não são capazes de sintetizar HUFAs *de novo* (Olivotto *et al.*, 2012).

Em diferentes espécies já se verificou que os HUFAs aumentam o desenvolvimento de uma boa pigmentação, como é o caso do halibute (Bell *et al.*, 2003) sendo que, desta forma, alguns autores afirmam que é plausível supor uma possível relação entre dietas enriquecidas com HUFAs presentes em copépodes e uma redução significativa do número de *A. ocellaris* com *miss-bar*. Ainda assim, muitos estudos indicam que a utilização de copépodes, como presa viva, aumenta a pigmentação em muitas espécies comerciais (Stottrup, 2000; Knuckey *et al.*, 2005). Com isto, torna-se necessária a realização de testes de modo a entender o impacto que estes organismos possuem sobre a pigmentação de juvenis de peixe-palhaço. Desta forma, poderá tentar-se reduzir problemas com a desvalorização de *A. percula* no mercado devido à fraca coloração (Avella *et al.*, 2007).

Assim sendo, este trabalho experimental teve como objetivo a engorda de juvenis de peixe-palhaço, *Amphiprion percula*, com rações de diferentes composições, nomeadamente Copépodes e *Chlorella* individualmente e em combinação, avaliando o seu efeito na sobrevivência, comprimento, peso e alterações na pigmentação dos indivíduos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Desenho experimental

O trabalho experimental foi realizado no laboratório de aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (Peniche, Portugal). Trezentos juvenis de peixe-palhaço com dois meses de idade e peso médio de $0,13 \pm 0,06$ g foram obtidos numa empresa de criação de peixes ornamentais. Um sistema de recirculação, devidamente arejado, foi utilizado e os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em 12 aquários de vidro (50x30x30cm) com fundo azul, ambientalmente enriquecidos com tubos de PVC para abrigos, com 40 litros de capacidade, totalizando 530 litros (Figura 2.1). O número de organismos por aquário foi 25, totalizando uma densidade de $0,5 \text{ ind L}^{-1}$, por forma a evitar comportamentos agressivos entre indivíduos, melhorando a sobrevivência, crescimento e bem-estar dos mesmos (Saoud *et al.*, 2008; McKenzie *et al.*, 2012). Um fotoperíodo de 12h luz:12h escuro foi adotado, o oxigénio dissolvido foi mantido a $6,0 \text{ mg L}^{-1}$, temperatura a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e a salinidade mantida a 33. Os níveis de amónia e nitritos foram analisados semanalmente e mantidos entre 0 mg L^{-1} e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, sendo ajustados quando necessário através de trocas de água.

a)



b)



Figura 2.1 - Sistema de recirculação utilizado para a realização do trabalho experimental (a) e respetivo sistema RAS (b). Autor: Marcela França.

2.2. Dietas experimentais

Três dietas experimentais que suprimem os requisitos para a espécie utilizada, formuladas pela empresa SPAROS, Lda, foram testadas. Cada alimentação continha uma suplementação distinta, sendo a dieta A suplementada com copépodes, a dieta B suplementada com *Chlorella*, e a dieta C suplementada com um mix de copépodes e *Chlorella*. Como controlo (CT), foi utilizada uma dieta comercial para peixe-palhaço (Tabela I). A sua distribuição foi realizada em triplicado (Figura 2.2) e os organismos foram alimentados *ad libitum*, três vezes ao dia (9:30h + 13:00h + 17:30h), por um período de 93 dias (Fevereiro a Abril de 2015).

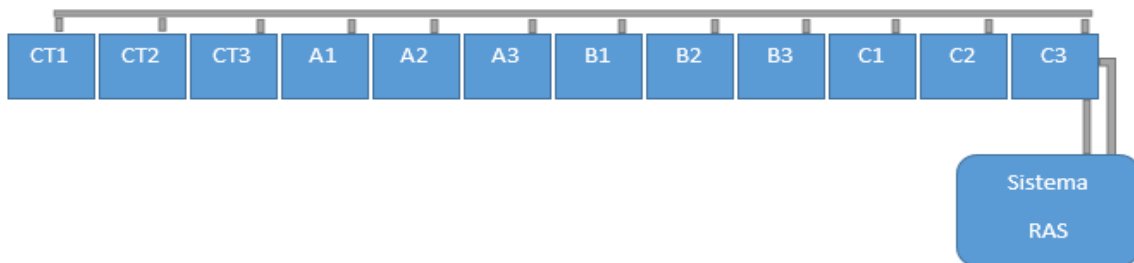


Figura 2.2 - Diagrama representativo da distribuição das três dietas experimentais.

Tabela I - Composição basal das dietas formuladas pela empresa SPAROS, Lda.

Ingredientes (%)	Controlo	A	B	C
Farinha de peixe 70	48,000	10,000	7,300	8,000
Concentrado de proteína de peixe	12,000	12,500	12,000	12,000
Farinha de lula	5,500	12,500	14,000	5,000
Farinha de Krill	5,000	0,000	0,000	5,000
Biomassa de Copépodes (Frescos)	0,000	40,000	0,000	20,000
Biomassa de <i>Chlorella</i> (Seca)	0,000	0,000	40,000	20,000
Glúten de Trigo	6,550	5,900	6,500	6,550
Semente de Trigo	3,000	5,000	0,000	2,500
Óleo de Peixe	1,000	0,000	0,550	1,000
Pré-mistura de Vitaminas e Minerais	2,000	2,000	2,000	2,000
Lecitina de Soja	6,500	0,000	7,200	6,500
Ligante e Polioli	9,500	9,500	9,500	9,500
Antioxidante em pó	0,200	0,400	0,400	0,400
Antioxidante líquido	0,200	0,000	0,000	0,000
MCP	1,000	0,000	0,000	0,000
Astaxantina	0,050	0,000	0,000	0,000
Fosfato monocálcico	0,000	2,200	0,550	1,550

2.3. Determinação de parâmetros morfométricos

O peso e comprimento de cada indivíduo foram registados no início e no final do ensaio experimental. Para a realização das amostragens, os indivíduos foram anestesiados individualmente com $0,7\text{ml L}^{-1}$ de 2-fenoxietanol (Johnston *et al.*, 2003). Quando se verificou falta de reação por parte dos organismos, foram retirados com um camaroeiro, e foi determinado o comprimento (cm) com o auxílio de uma régua (Figura 2.3b) e o peso (g) através de uma balança com quatro casas decimais, retirando-se a maior quantidade de água possível (Figura 2.3c). A sobrevivência foi avaliada ao longo de todo o ensaio através de observação e registos diários de mortalidade.

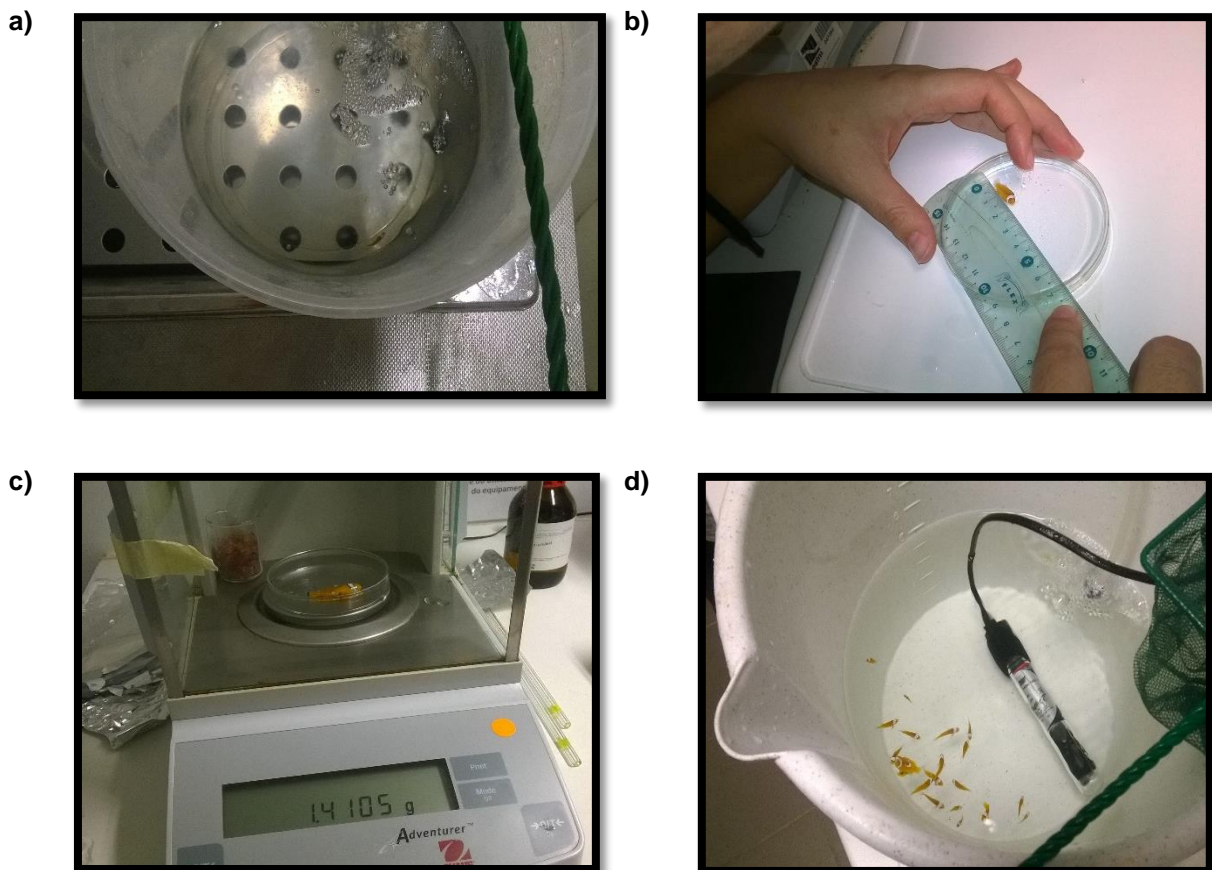


Figura 2.3 - Processo realizado nas amostragens iniciais e finais do ensaio experimental. Nas figuras encontram-se representados os passos de anestesia (a), medição (b), pesagem (c) e recuperação (d). Autor: Marcela França.

2.4. Determinação de parâmetros zootécnicos

No final do ensaio foi possível determinar os seguintes parâmetros zootécnicos:

Taxa de crescimento específico (SGR):

$$SGR (\% \text{ dia}^{-1}) = \frac{[LN(\text{peso final}(g)) - LN(\text{peso inicial}(g))]}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}} \times 100$$

Índice de crescimento diário (DGI):

$$DGI (g \text{ dia}^{-1}) = \frac{(\text{peso final}(g))^{1/3} - (\text{peso inicial}(g))^{1/3}}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}}$$

Taxa de crescimento absoluto (AGR):

$$AGR (g \text{ dia}^{-1}) = \frac{\text{peso final}(g) - \text{peso inicial}(g)}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}}$$

Índice de condição (K):

$$K = \frac{\text{peso final}(g)}{\text{comprimento final}^3(\text{cm})} \times 100$$

2.5. Análise de carotenoides por espectrofotometria

Três peixes foram recolhidos, aleatoriamente, de cada aquário no final do ensaio. Estes foram anestesiados com MS-222 (90mg L⁻¹), colocados em sacos de congelação individuais embrulhados em papel de alumínio e congelados a -20°C até a análise de carotenoides de acordo com Yasir e Qin (2010).

Amostras de pele foram retiradas de ambos os lados de cada indivíduo, entre a zona abdominal e a zona dorsal. Estas amostras foram transferidas, em pools de três peixes por aquário, para tubos de ensaio de vidro de 10mL, previamente pesados, e tapados com papel de alumínio. Nos tubos foram adicionados 3mL de acetona a 90% e 0,7g de sulfato de sódio anidro, de modo a eliminar toda a água presente na amostra, e homogeneizou-se as amostras, perfazendo-se de seguida o volume até 10mL com acetona. Os tubos foram colocados no frigorífico a 4°C durante 4 dias para extração dos carotenoides, e a solução obtida foi centrifugada a 2500rpm durante 10 minutos. A absorção foi medida no

espectrofotômetro, em triplicado, a 663, 645 e 470nm (Ramamoorthy *et al.*, 2010; Sumanta *et al.*, 2014).

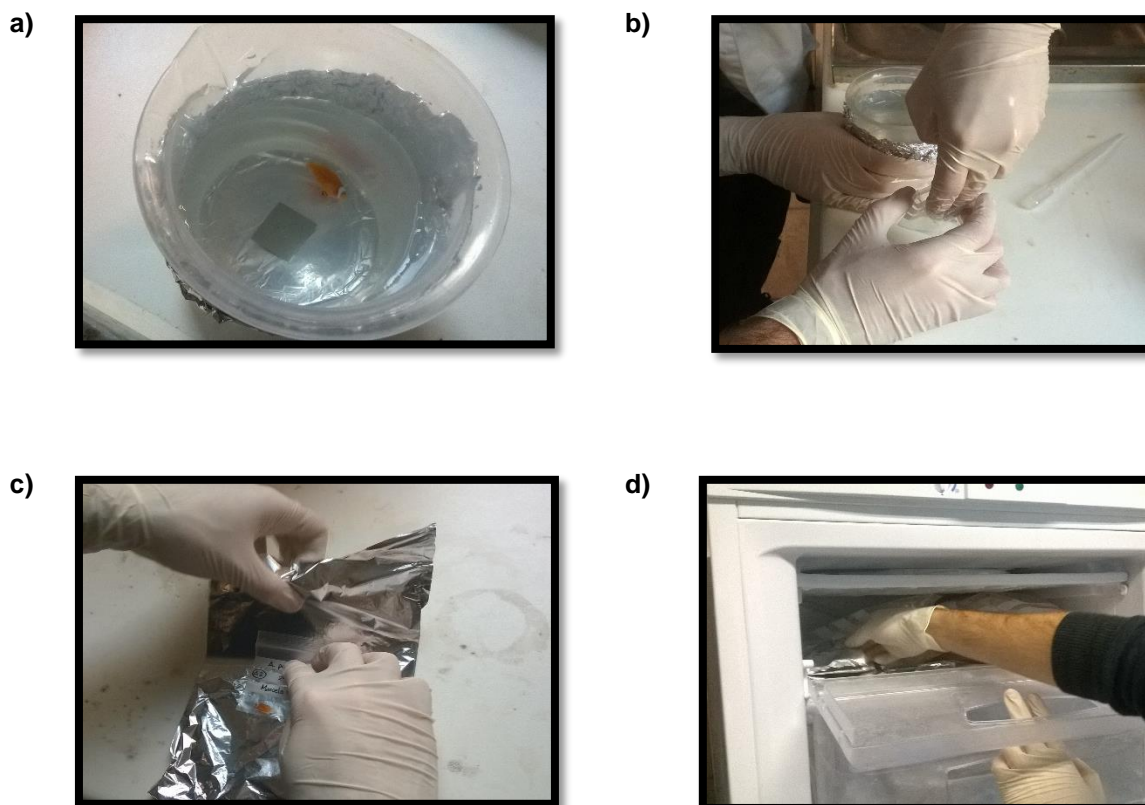


Figura 2.4 - Processo de conservação dos organismos recolhidos para posterior análise de carotenoides por espectrofotometria. Nas figuras encontram-se representados os passos de anestesia (a), colocação em sacos de congelação individuais (b), embrulho em papel de alumínio (c) e colocação em congelador a -20°C (d). Autor: Marcela França.

2.6. Modelo HSB (Matiz-Saturação-Brilho)

Fotografias tiradas a indivíduos de cada dieta, ao longo do tempo, foram analisadas através do modelo HSB. Com recurso ao programa *Adobe Illustrator CC 2015* (Figura 2.5), duas zonas dos peixes foram estudadas, zona dorsal e barbatana caudal. Os resultados obtidos foram comparados com valores do modelo HSB (Figura 2.6) (Yasir e Qin, 2009a), por forma a perceber qual a dieta capaz de proporcionar uma pigmentação mais laranja.

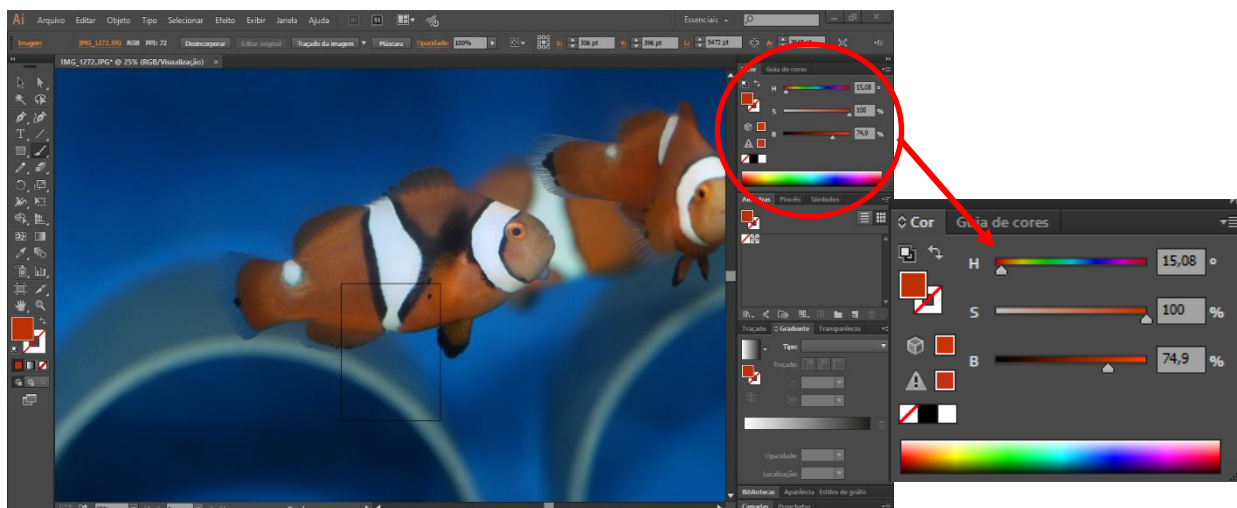


Figura 2.5 - Exemplo de análise de valores de HSB, numa fotografia capturada durante o ensaio, com auxílio do programa *Adobe Illustrator CC 2015*.

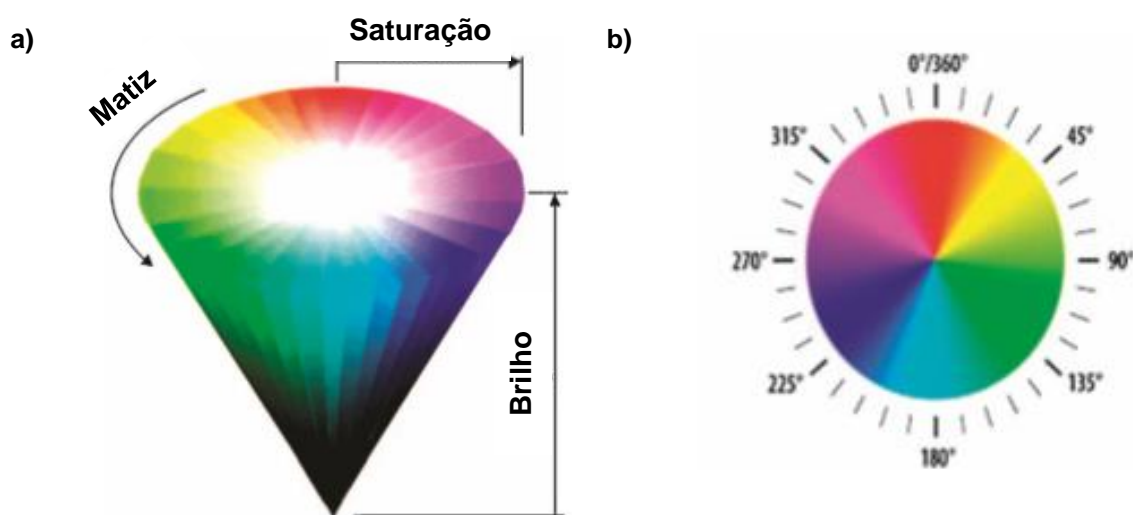


Figura 2.6 - Ilustração do modelo HSB mostrando a relação entre matiz, saturação e brilho como um cone, com visão lateral (a) e visão superficial (b).

2.7. Análise estatística

Em relação ao peso e comprimento e modelo HSB, os dados foram analisados através de uma ANOVA de duas vias, tendo como fatores o tempo e a dieta, seguida de um teste de *pos-hoc* de *Tukey* para identificar diferenças entre tratamentos experimentais.

Para a análise de carotenoides por espectrofotometria e parâmetros morfométricos e zootécnicos foi realizada uma ANOVA de uma via, tendo como fator as rações e os

diferentes parâmetros, respetivamente. Seguiu-se um teste *pos-hoc* de *Tukey* para identificação das diferenças entre dietas. A homogeneidade foi verificada através de um teste de LEVENE, e os valores foram transformados quando necessário.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software STATISTICA 12 para *WINDOWS*. O nível de significância utilizado foi $p\text{-value} \leq 0,05$ para todos os testes estatísticos.

3. Resultados

3.1. Parâmetros morfométricos

Relativamente ao peso, os peixes alimentados com a dieta A demonstraram um peso final de $1,47 \pm 0,40$ g, valor estatisticamente superior em relação à dieta controlo e todas as restantes. Pelo contrário, os indivíduos alimentados com a dieta C revelaram pesos finais significativamente inferiores à dieta controlo e a todas as outras, atingindo um peso médio de $0,90 \pm 0,29$ g (Figura 3.1a). Quanto ao comprimento, os peixes alimentados com mistura de *Chlorella* e Copépodes (Dieta C) demonstraram comprimento final de $3,49 \pm 0,42$ cm, encontrando-se estatisticamente inferiores ao controlo e a todas as restantes alimentações.

A dieta A, com um valor médio de comprimento de $4,00 \pm 0,37$ cm revelou ser estatisticamente superior em relação ao Controlo com $3,73 \pm 0,38$ cm de comprimento médio, mas não em relação à dieta B que apresentou $3,80 \pm 0,52$ cm de comprimento médio. Os peixes alimentados com esta dieta também não revelaram diferenças estatisticamente significativas em relação à dieta Controlo (Figura 3.1b).

É notório que os peixes alimentados com a dieta A foram os que registaram maior crescimento ao longo da experiência, quer em termos de peso, quer em termos de comprimento total. O seu peso aumentou, em média, 1,32g, enquanto nas dietas B, C e Controlo os aumentos foram de 1,09g, 0,79g e 1,05g, respetivamente. Já o comprimento total aumentou, em média, para a dieta A, 2,21cm, e para as restantes dietas, B, C e Controlo, aumentou 1,96cm, 1,69cm e 2,03cm, respetivamente.

Ainda assim, todas as dietas revelaram um aumento de peso e comprimento total significativo ao longo do tempo. Diferenças significativas revelaram-se apenas no final do ensaio, para ambos os fatores, indicando que a população era homogénea no início do ensaio.

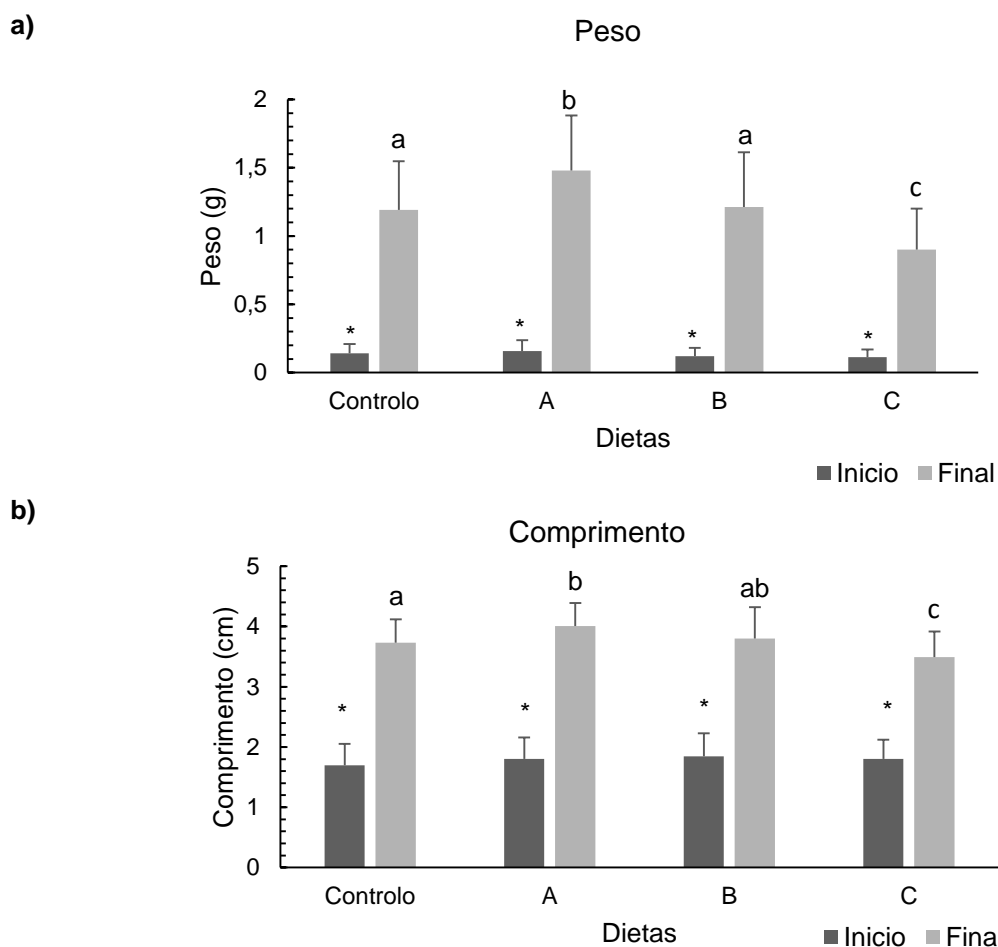


Figura 3.1 - Peso inicial e final em gramas (a) e comprimento inicial e final em centímetros (b) observado em todas as dietas. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP. Asterisco assinala diferenças estatisticamente significativas entre tempos para a mesma dieta. Letras indicam diferenças entre dietas para o mesmo tempo (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).

3.2. Parâmetros zootécnicos

A performance de crescimento e os parâmetros morfométricos dos juvenis de *A. percula*, alimentados com as diferentes dietas experimentais durante o ensaio de crescimento, encontram-se representados na tabela II. Apenas no índice de crescimento diário e na taxa de crescimento absoluto foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, sendo que em ambos os parâmetros a dieta C demonstrou valores significativamente mais baixos em relação a todas as outras.

Tabela II - Parâmetros morfométricos (K) e zootécnicos (SGR, DGI, AGR) de juvenis de *Amphiprion percula* alimentados com diferentes dietas experimentais. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP. Letras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes parâmetros (ANOVA de uma via, $p \leq 0,05$).

Parâmetro	Controlo	A	B	C
SGR (% dia ⁻¹)	2,395 \pm 0,082	2,399 \pm 0,168	2,485 \pm 0,074	2,226 \pm 0,182
DGI (g dia ⁻¹)	0,006 \pm 7,734 ^a	0,006 \pm 0,000 ^a	0,006 \pm 0,000 ^a	0,005 \pm 0,000 ^b
AGR (g dia ⁻¹)	0,012 \pm 0,001 ^a	0,014 \pm 0,001 ^a	0,012 \pm 0,000 ^a	0,008 \pm 0,000 ^b
K	2,418 \pm 0,171	2,296 \pm 0,055	2,216 \pm 0,154	2,114 \pm 0,035

3.3. Análise de carotenoides por espectrofotometria

A análise espectrofotométrica demonstrou que os peixes alimentados com a dieta C continham uma maior concentração de carotenoides na pele, com 122,63 \pm 21,10 mg kg⁻¹, seguindo-se dos peixes alimentados com a dieta B, apresentando 49,62 \pm 22,07 mg kg⁻¹ (Figura 3.2). A dieta A e a Controlo foram as que demonstraram menor concentração de carotenos. Todas as alimentações apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, exceto a dieta A em relação à dieta Controlo, com 23,47 \pm 7,26 mg kg⁻¹ e 29,00 \pm 15,49 mg kg⁻¹, respetivamente.

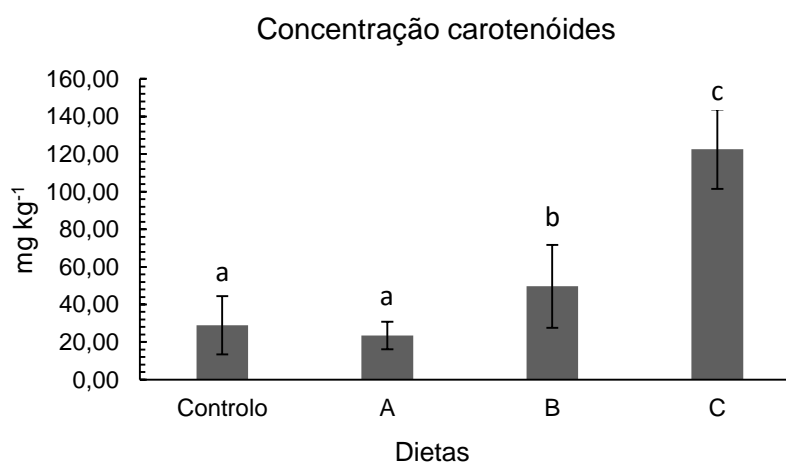


Figura 3.2 - Concentração de carotenoides observada na pele dos peixes expostos às diferentes dietas experimentais, através de espectrofotometria. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP. Letras indicam as diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos (ANOVA de um fator, $p \leq 0,05$).

Através da observação dos λ máximos obtidos (Tabela III), tornou-se possível determinar quais os carotenoides presentes na pele dos peixes expostos às diferentes dietas experimentais. Em todos foram verificados carotenos em comum, tais como α -caroteno, β -

caroteno, Licopeno e Zeaxantina. Apenas os peixes alimentados com a suplementação de copépodes apresentaram o carotenoide γ -caroteno.

Tabela III - Carotenoides observados na pele dos peixes expostos às diferentes dietas experimentais. Valores obtidos através da comparação do $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) encontrados, com valores base (Rodriguez-Amaya., 2001).

	Controlo	A	B	C
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	370	461	452	369
	451	465	369	451
	450	370	451	476
	369	475	476	373
	452		450	450
				449
			475	
Carotenos	β -caroteno	γ -caroteno	β -caroteno	β -caroteno
	Zeaxantina	α -caroteno	Zeaxantina	Zeaxantina
	α -caroteno	Licopeno	α -caroteno	α -caroteno
	Licopeno		Licopeno	Licopeno

3.4. Análise visual da coloração da pele

Ao longo de todo o ensaio experimental, a pigmentação dos indivíduos foi analisada visualmente e registada através de fotografias obtidas semanalmente. Na figura 3.3 encontra-se representada a evolução da coloração, desde Fevereiro a Abril, em cada uma das dietas. Verifica-se que, desde o primeiro mês, os peixes alimentados com a suplementação de copépodes foram os que demonstraram uma pigmentação mais alaranjada, sendo que os indivíduos alimentados com *Chlorella* e Cop+Chl se encontravam ainda semelhantes.

A partir do segundo mês de ensaio, as diferenças começaram-se a tornar mais evidenciadas sendo que, os peixes alimentados com a dieta controlo foram os que apresentaram uma coloração menos intensa, os da dieta *Chlorella* tornaram-se mais amarelados que os da dieta Cop+Chl e, por fim, os indivíduos da dieta com Copépodes apresentavam uma pigmentação laranja intensa.

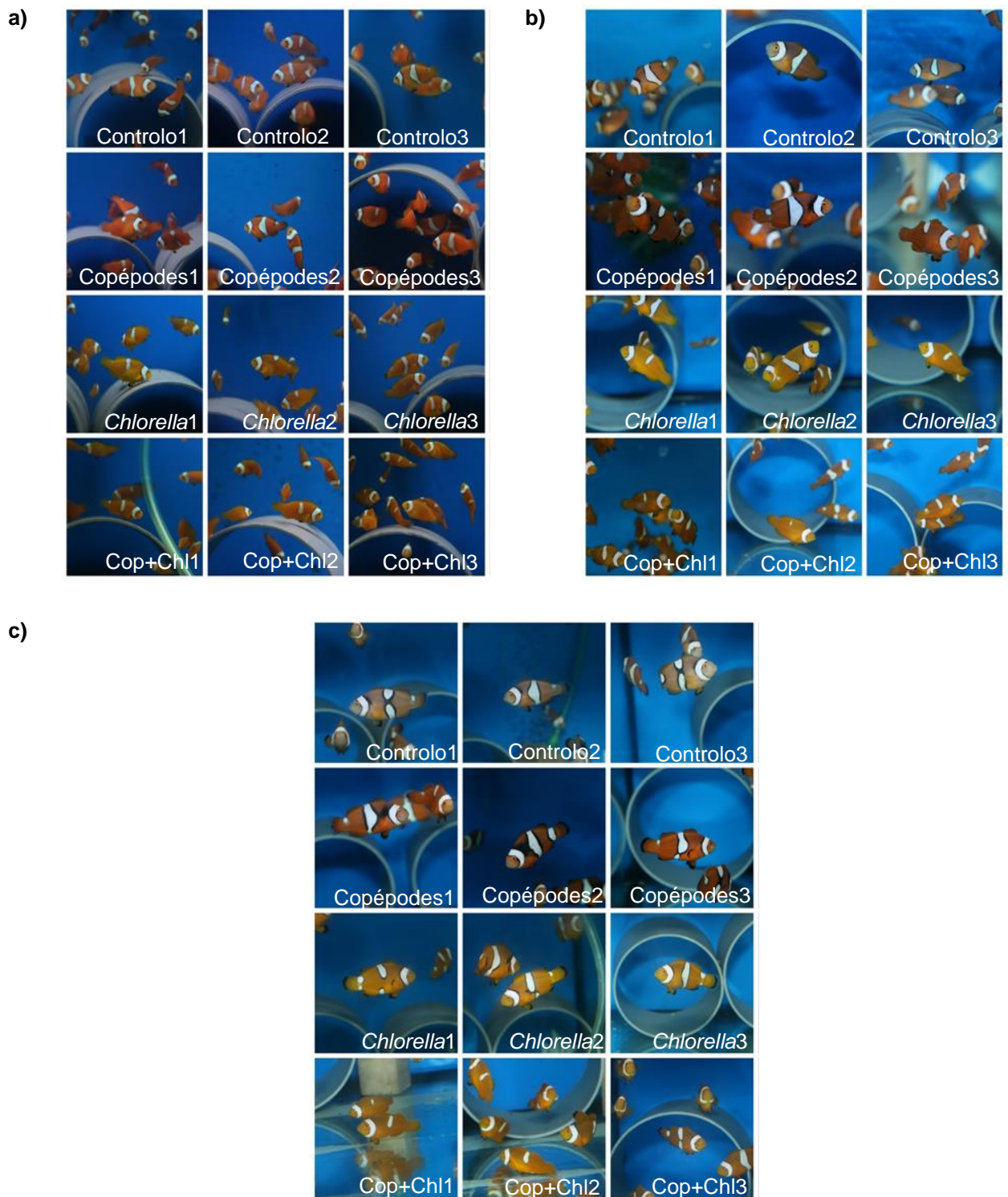


Figura 3.3 - Análise visual da coloração dos indivíduos alimentados com as diferentes dietas experimentais em Fevereiro (a), Março (b) e Abril (c).

3.4.1. Modelo HSB (Matiz - Saturação - Brilho)

Por forma a complementar a observação visual, realizou-se uma análise de coloração de imagem, recorrendo ao modelo HSB. Em relação à zona dorsal do corpo dos indivíduos (Figuras 3.4, 3.5, 3.6) a dieta A, suplementada com copépodes, apresentou os valores de matiz mais baixos, indicando que se encontrava mais perto do laranja. Pelo contrário, a Dieta B suplementada com *Chlorella*, apresentou valores de matiz mais elevados, encontrando-se mais próximo do amarelo. Apenas foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre dietas, sendo todas diferentes entre todas. No que toca ao brilho, a dieta controlo obteve os valores mais baixos, sendo estatisticamente diferente das restantes dietas. Também neste parâmetro, o mês de Fevereiro demonstrou diferenças em relação a Abril, em todas as dietas. Por último, a saturação da zona dorsal dos indivíduos revelou que, a dieta A em Fevereiro foi significativamente diferente da mesma em Março e Abril.

Analisando a barbatana caudal dos peixes (Figuras 3.7, 3.8, 3.9), a matiz revelou novamente que os organismos alimentados com a dieta com copépodes se encontravam mais próximos do laranja, devido aos valores mais próximos de 0, e que os da dieta suplementada com *Chlorella* se encontravam próximos do amarelo, com valores próximos de 60 (Yasir e Qin, 2009a). Foram observadas diferenças significativas entre tempos independentemente da dieta, e entre dietas independentemente do tempo. Mais concretamente, o mês de Fevereiro foi diferente de Março e Abril em todas as dietas, e apenas a dieta C demonstrou diferenças em relação à dieta controlo. Na saturação, apenas a dieta controlo revelou diferenças em relação a todas as outras e, no brilho, a mesma dieta revelou-se diferente da dieta B.

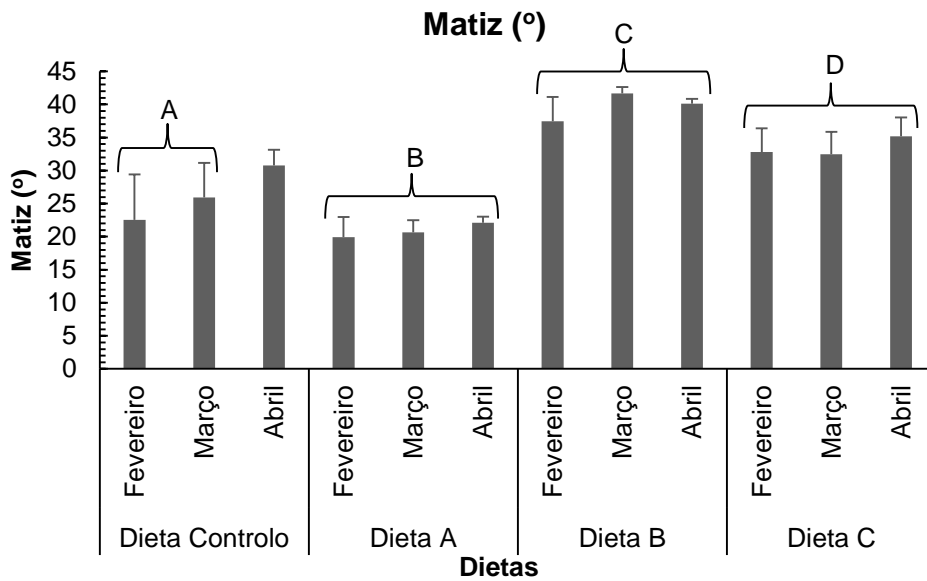


Figura 3.4 - Matiz (°) da zona dorsal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Os valores encontram-se expressos como média ± DP. Letras maiúsculas indicam as diferenças estatisticamente significativas entre dietas independentemente do tempo (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).

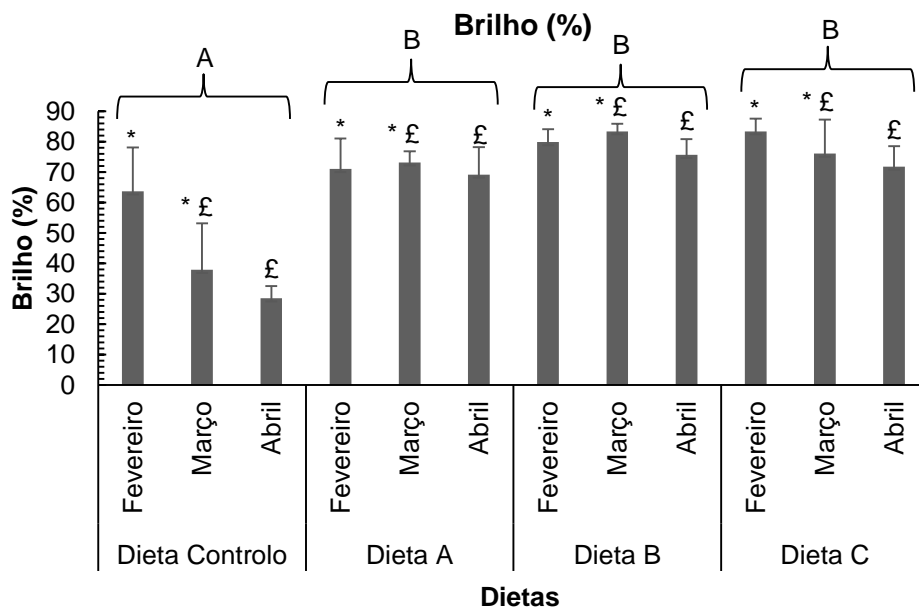


Figura 3.5 - Brilho (%) da zona dorsal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Os valores encontram-se expressos como média ± DP. Letras maiúsculas indicam as diferenças estatisticamente significativas entre dietas independentemente do tempo. Símbolos indicam diferenças entre tempos, para a mesma dieta (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).

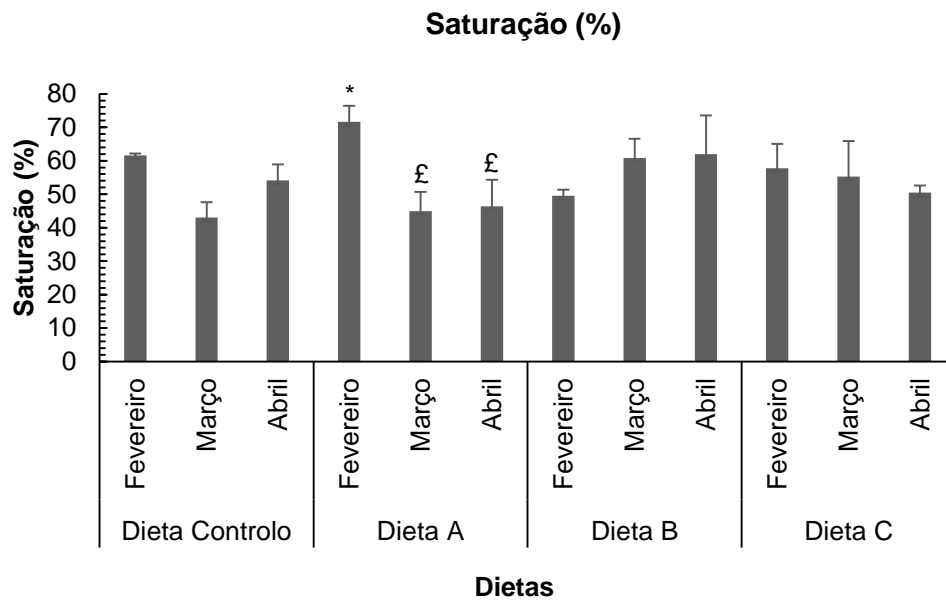


Figura 3.6 - Saturação da zona dorsal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Símbolos indicam diferenças entre tempos, para a mesma dieta. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).

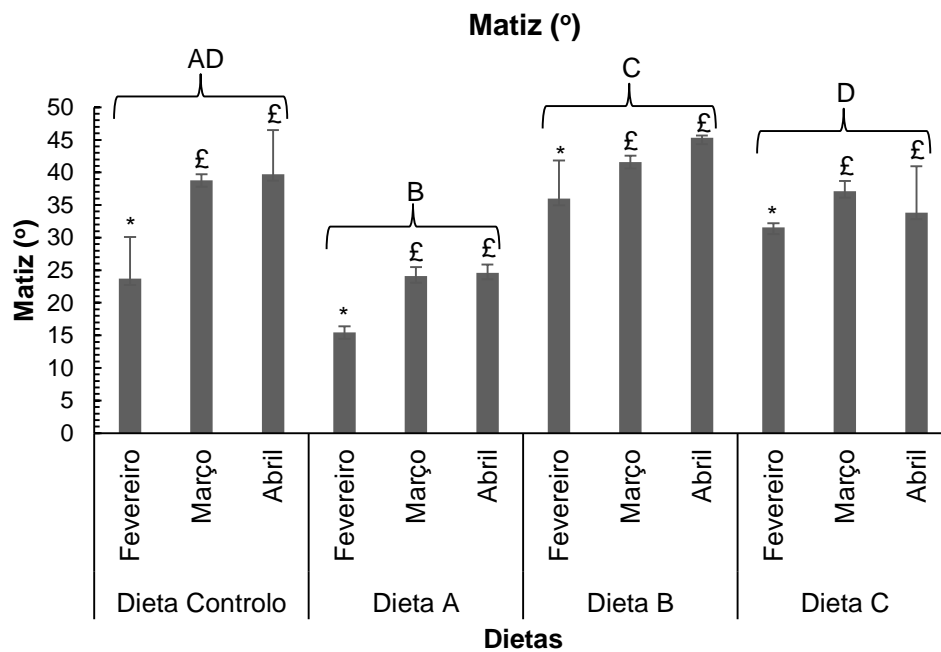


Figura 3.7 - Matiz (°) da barbatana caudal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas independentemente do tempo. Símbolos indicam diferenças entre tempos, para a mesma dieta. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).

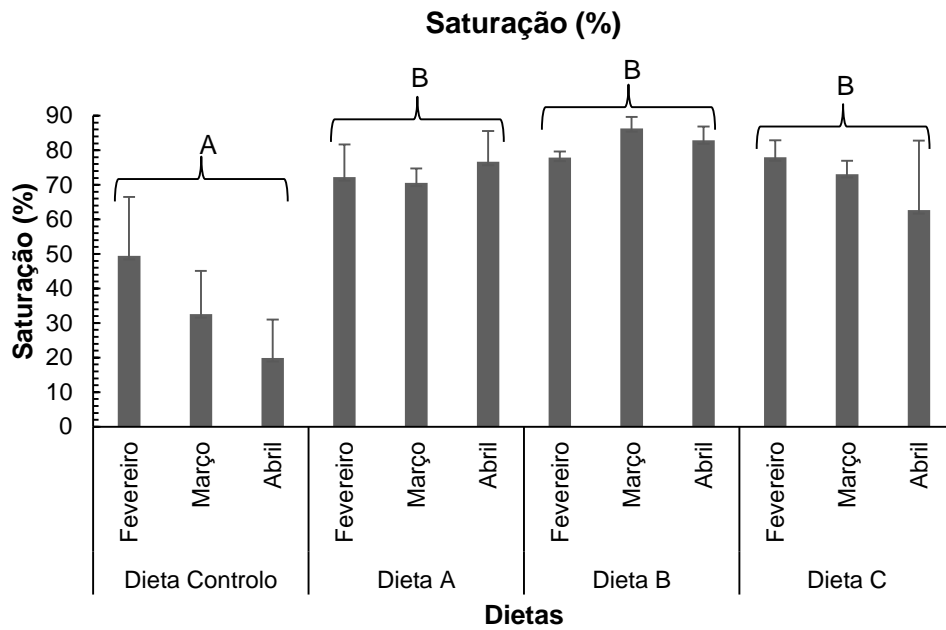


Figura 3.8 - Saturação (%) da barbatana caudal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas independentemente do tempo. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).

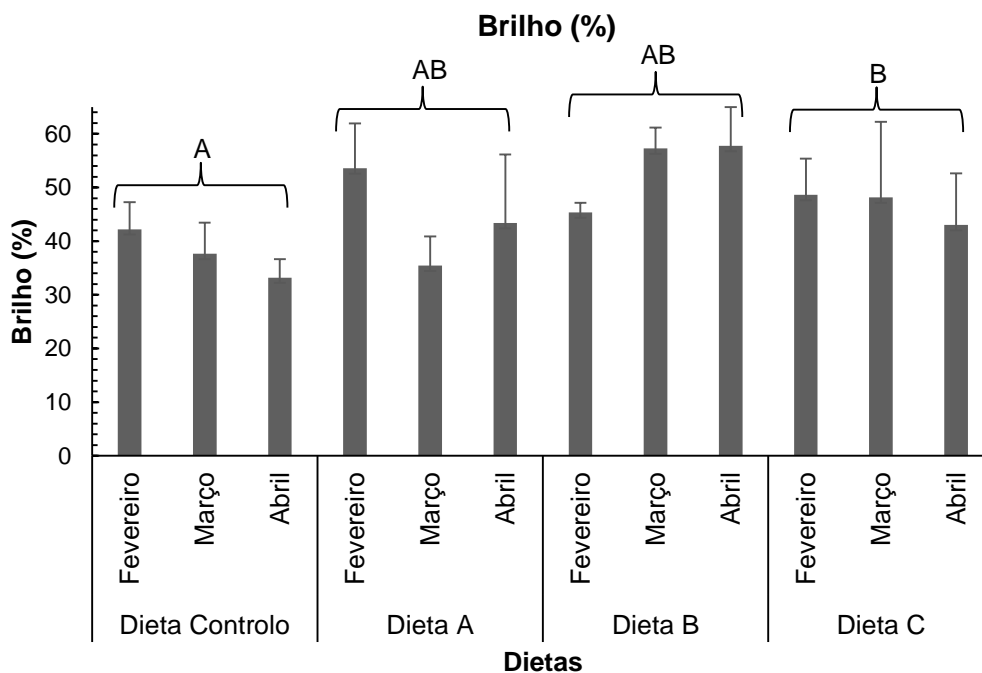


Figura 3.9 - Brillho da barbatana caudal dos indivíduos, observada nas diferentes dietas, ao longo do tempo. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas independentemente do tempo. Os valores encontram-se expressos como média \pm DP (ANOVA de duas vias, $p \leq 0,05$).

4. Discussão

O peixe-palhaço, *Amphiprion percula*, é um dos peixes marinhos ornamentais mais conhecidos e desejados em todo o mundo, levando a que todos os amantes da aquariofilia procurem os exemplares que apresentem uma pigmentação vermelho-alaranjada e três bandas brancas bem formadas, como é comum observar nos indivíduos selvagens. Desta forma, inúmeros esforços têm sido realizados de modo a melhorar o cultivo intensivo desta espécie, incluindo diversos estudos científicos em nutrição (Sales e Janssens, 2003). Procura-se proporcionar um melhor crescimento e coloração dos organismos de cultivo, lutando contra a sobre exploração e o seu impacto nas populações de *A. percula* (Wittenrich, 2007; Olivotto *et al.*, 2011).

Neste trabalho, quatro dietas formuladas para a engorda de juvenis de peixe-palhaço estiveram em estudo, sendo avaliado o seu efeito na sobrevivência, comprimento, peso e alterações na pigmentação dos indivíduos.

No que respeita ao crescimento, os peixes alimentados com a dieta A, suplementada com copépodes, demonstraram um aumento de peso e comprimento superior em relação às restantes alimentações, com valores de 1,32g e 2,21cm, respetivamente. A dieta B, suplementada por *Chlorella* revelou ser a segunda melhor nestes parâmetros, seguida da dieta controlo e, por último, da dieta C.

Santana *et al.* (2015) testaram novas alimentações em *Amphiprion ocellaris*, registando um aumento de peso médio de 0,12 - 0,21g e crescimento de 0,17cm. Embora o trabalho referido tenha decorrido durante um período de tempo menor e com indivíduos de outra espécie, de peso inicial superior, as dietas aqui estudadas parecem ter sido capazes de superar estes valores, com aumento de peso médio de 0,79 – 1,32g e crescimento de 1,69 – 2,21cm. A superação pode ser verificada através da taxa de crescimento específico (SGR), que no estudo anterior foi mais baixa, com valores de 0,73 – 1,13% dia⁻¹ comparativamente a 2,226±0,182 – 2,395±0,082% dia⁻¹.

Foi demonstrado que, no meio selvagem, as larvas de peixes marinhos se alimentam principalmente de náuplios de copépodes e copepoditos (Villalta *et al.*, 2005; Avella *et al.*, 2007), sendo que estes dominam o conteúdo estomacal das larvas (Holt, 2003). São naturalmente ricos em ácidos gordos essenciais, HUFAs, extremamente importantes para

a sobrevivência e crescimento, sendo essenciais em dietas larvares. Para além disso, melhoraram a pigmentação normal e reduzem a frequência de deformações (Avella *et al.*, 2007; Olivotto *et al.*, 2008).

Embora a maioria se refira a copépodes como alimento vivo para larvas de peixes marinhos, o estudo aqui apresentado poderá ter demonstrado que este suplemento pode ser essencial e enriquecedor numa dieta para juvenis de peixe-palhaço, *Amphiprion percula*, uma vez que foi na dieta A que se verificou um crescimento mais elevado, maior pigmentação e mais rápida e melhor formação das bandas brancas, como já teria sido verificado por Avella *et al.* (2007).

Apesar de também apresentar copépodes na sua composição, embora a sua quantidade seja menor, a dieta C revelou os valores de crescimento mais baixos em relação às restantes. A combinação de copépodes e *Chlorella* poderá não ter funcionado em termos de nutrição, bem como a menor quantidade de farinha de peixe e farinha de lula em relação às restantes dietas, causando um crescimento mais lento nos organismos. Ao longo do ensaio verificou-se uma degustação mais fraca por parte dos peixes em relação a esta dieta, comparativamente às dietas A, B e controlo, podendo indicar que o alimento não seria apelativo para os indivíduos. Desta forma, a quantidade de alimento ingerido foi reduzida e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento dos indivíduos terá sido diminuído. Uma vez que a microalga de água doce, *Chlorella*, não faz parte da alimentação normal da espécie em estudo, pode ter contribuído para o baixo interesse por parte dos indivíduos pelas dietas com este suplemento.

Contudo, todas as dietas contribuíram para o crescimento e sobrevivência da espécie em cativeiro, proporcionando o bem-estar e bom desenvolvimento dos indivíduos. Apenas a dieta C revelou um ligeiro atraso no índice de crescimento diário e taxa de crescimento diário mas, ainda assim, estes valores não foram prejudiciais. Contudo, um rápido crescimento pode resultar na redução da fase larvar, considerado o período mais delicado da história de vida dos peixes. Em situações de aquacultura intensiva atingir estes resultados é essencial, uma vez que permite a redução dos custos de produção, permitindo oferecer ao mercado de peixes ornamentais um produto capaz de competir com espécimes selvagens de custos menos elevados (Avella *et al.*, 2007), tendo sempre em conta a saúde e bem-estar dos organismos.

No geral, as espécies ornamentais são vendidas à unidade e selecionadas por tamanho, tornando o comprimento o fator mais importante para o negócio. Ainda assim, é importante obter um equilíbrio entre peso e comprimento, garantindo uma melhor condição a cada indivíduo. O fator de condição representa um indicador quantitativo do bem-estar dos peixes, sendo que os ornamentais são avaliados em termos de qualidade com base na aparência e atributos físicos (Moorhead and Zeng, 2010; Guidelli *et al.*, 2011). Valores de índices de condição elevados demonstram fatores de cultivo favoráveis, e os valores baixos indicam fatores menos favoráveis (Blackwell *et al.*, 2000). Nos resultados obtidos, todas as dietas conseguiram proporcionar bons valores de índices de condição, sendo que na dieta controlo atingiu-se o valor mais elevado, seguindo-se a dieta suplementada com copépodes.

A coloração é um importante fator no negócio da aquacultura ornamental a nível mundial. Desde sempre que os peixes-palhaço que possuam uma pigmentação laranja avermelhada são mais requisitados pelos aquaristas (Tanaka *et al.*, 1992). Este estudo demonstrou que a alimentação poderá ser um fator capaz de alterar a coloração não só no corpo mas também nas barbatanas dos indivíduos, e o desenvolvimento de novas dietas poderá vir a ser considerado um dos fatores contribuidores para o grande crescimento deste *hobby* mundial (Ramamoorthy *et al.*, 2010).

Os carotenoides são a fonte primária de pigmentação nos peixes ornamentais tropicais, como é o caso do peixe palhaço, *Amphiprion percula*, sendo responsáveis por diversas cores como o amarelo e o vermelho (Ramamoorthy *et al.*, 2010).

Os efeitos das dietas na pigmentação da espécie em estudo foram observados através de vários métodos como análise de carotenoides por espectrofotometria, análise visual e observação de imagem com o modelo HSB, método utilizado em diversos estudos anteriores (Kalinowski *et al.*, 2005; Yasir e Qin, 2009a, 2009b, 2010; Ho *et al.*, 2013, 2014).

Em relação à análise de carotenoides por espectrofotometria, observou-se que a dieta C continha maior concentração de carotenos em relação às restantes, seguindo-se da dieta B, dieta Controlo e, por último, dieta A. Uma vez que os comprimentos de onda utilizados durante o processo atingiam carotenos responsáveis pela coloração amarela (Rodriguez-Amaya., 2001), poderá ser possível concluir que os peixes alimentados com a dieta A se encontravam mais afastados desta cor, revelando os valores de concentração mais baixos. Esta situação pode ser comprovada através dos carotenos obtidos nos picos

de absorvância máxima (Tabela III). A pele dos indivíduos alimentados com as dietas Controlo, B e C continha β -caroteno, α -caroteno, zeaxantina e licopeno. Já a pele dos exemplares alimentados com a dieta A apenas continham α -caroteno, γ -caroteno e licopeno. Nenhum exemplar continha astaxantina na pele, vulgarmente usada em aquacultura de modo a proporcionar coloração em carne de salmão (Wathne *et al.*, 1998; Bjerkgeng *et al.*, 1999) e em pele de pargo (Booth *et al.*, 2004; Kalinowski *et al.*, 2005).

Uma vez que todas as espécies de peixes exibem diferentes reações ao metabolismo de carotenoides (Matsuno, 2001), os exemplares de *A. percula* poderão ter metabolizado a astaxantina, como foi verificado em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em que a astaxantina foi metabolizada para zeaxantina, responsável pela coloração amarela (Schiedt *et al.*, 1985). O mesmo foi verificado por Yasir e Qin (2010), com peixe-palhaço que transferiu a astaxantina para zeaxantina e cantaxantina. Esta situação poderia explicar o aparecimento de zeaxantina em todos os indivíduos, exceto os alimentados com a dieta A, justificando a coloração menos laranja. Contudo, e uma vez que apenas a dieta controlo continha astaxantina na sua composição, este resultado não pode ser comprovado, sendo necessários estudos futuros.

Outro caroteno presente nos indivíduos de todas as dietas, exceto a dieta A, foi o β -caroteno. Yasir e Qin (2010) verificaram anteriormente que este carotenoide tornou a coloração de juvenis de peixe-palhaço amarelo-alaranjada. O mesmo pode ter sido verificado neste estudo, uma vez que os indivíduos alimentados com as dietas Controlo, B e C, que revelaram uma coloração menos laranja intensa, possuíam na sua pele este carotenoide. Ainda assim, estes resultados necessitam ser estudados mais profundamente, através de um método capaz de avaliar a quantidade de cada caroteno presente nas amostras, como é o caso do HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Através do modelo HSB foi possível perceber quais os peixes que possuíam uma coloração mais laranja, encontrando-se mais próximos dos seus parentes selvagens.

O modelo Matiz-Saturação-Brilho (HSB) é uma representação matemática da cor, muito semelhante à percepção da cor pelo Homem (Georgieva *et al.*, 2005). Este modelo divide a cor em três componentes: matiz, saturação e brilho. Matiz, considerada a cor pura, é medida em graus angulares em torno do cone, iniciando e terminando em 0° e 360°, respetivamente. Estes graus correspondem à cor vermelha, assim como 60° correspondem

à cor amarela, 120° à cor verde e 240° ao azul. Saturação é a pureza da cor, medida em percentagem, desde o centro do cone (0) até à superfície (100). A 0% de saturação, a matiz é insignificante. A 0% de brilho, tanto a matiz como a saturação são insignificantes.

Neste trabalho foram analisadas duas zonas dos peixes, zona dorsal e barbatana caudal. Nas duas zonas, a matiz dos indivíduos alimentados com a dieta suplementada com copépodes demonstrou valores mais próximos de 0° indicando, desta forma, que esta dieta proporcionou a coloração mais laranja. Por outro lado, a dieta suplementada com *Chlorella* revelou os valores de matiz mais elevados, próximos de 60°, indicando uma coloração mais próxima do amarelo. Apenas na barbatana caudal os valores de matiz foram variáveis ao longo do tempo mas, ainda assim, não afetou os resultados em relação às dietas.

Em relação à saturação (mais cor), os indivíduos alimentados com a dieta B mostraram valores superiores em relação às restantes dietas, ou seja, possuíam mais cor amarela. Contudo, não existiram diferenças entre dietas. A redução de saturação verificada na dieta A, na zona dorsal, ao longo do tempo, poderá ser explicada pelo aparecimento na coloração preta nessa zona, típica da espécie.

Existiram já várias tentativas de intensificar a cor vermelha em peixes de cultivo, como é o caso do *Pagrus auratus* e *Pagrus pagrus* (Cejas *et al.*, 2003), onde os peixes alimentados com astaxantina demonstraram um valor mais baixo de matiz, demonstrando uma cor mais avermelhada (Kalinowski *et al.*, 2005), e a adição de β -caroteno não aumentou esta coloração.

Vários estudos demonstraram que peixes marinhos alimentados com HUFAs, naturalmente presentes em copépodes, possuíam uma pigmentação normal e baixa frequência de deformações (Avella *et al.*, 2007; Olivotto *et al.*, 2008), como é o caso do halibute, onde foi possível aumentar a pigmentação da zona dorsal ou eliminar o fenómeno da má pigmentação (Bell *et al.*, 2003).

Assim sendo, uma vez que a utilização de copépodes como presa viva aumenta a pigmentação em várias espécies comerciais (Bell *et al.*, 2003), estudos do efeito destas espécies de zooplâncton na pigmentação em juvenis de peixe-palhaço podem ser importantes para a aquacultura ornamental. No caso deste trabalho, a dieta A

suplementada com estes organismos revelou ser a melhor candidata para a melhoria da coloração de *A. percula*, colocando os peixes de cultivo mais próximos dos seus congéneres selvagens.

A microalga *Chlorella* tem sido usada com sucesso no aumento de taxas de pigmentação em truta arco-íris (Gouveia *et al.*, 1998), dourada (Gouveia *et al.*, 2002) e peixes ornamentais como carpa koi e peixes dourados (Gouveia *et al.*, 2003). Para além disto, foi já demonstrado que possui pigmentos em concentrações elevadas, com potencial de aumentar a matiz vermelha (Gouveia *et al.*, 1998).

No caso de *A. percula* o mesmo não se verificou, uma vez que os indivíduos alimentados com a dieta suplementada com *Chlorella* revelaram uma coloração mais amarela, com valores de matiz mais próximos desta. A justificação pode ser dada pelo facto de esta microalga ter apresentado ser uma boa fonte de pigmentos com potencial interesse em matizes amarelas e azuis (Gouveia e Rema, 2005).

A dieta C, suplementada por copépodes e *Chlorella*, demonstrou valores de matiz mais baixos em relação à dieta anteriormente descrita, o que poderá demonstrar que, apesar de os indivíduos terem ingerido menos alimento e terem um crescimento mais reduzido, o facto de a dieta conter copépodes colaborou para a pigmentação mais laranja em relação à dieta suplementada apenas com *Chlorella*.

Ao observar a concentração de carotenoides obtida nos indivíduos alimentados com esta dieta, a concentração mais elevada poderá indicar que a pele dos peixes continha maior quantidade de carotenos responsáveis pelo amarelo em relação às B e controlo mas, este resultado apenas poderá ser verificado através de HPLC, como foi referido anteriormente.

5. Conclusão

Peixes e outros invertebrados são incapazes de sintetizar carotenoides (Matsuno, 2001), necessitando recorrer a alimento que os contenha. Embora o peixe-palhaço possa, temporariamente, alterar a expressão da cor através da mudança de intensidade da luz (Yasir e Qin, 2009a) ou da coloração do fundo (Yasir e Qin, 2009b), não é possível alterar a composição de pigmentos através de alterações ambientais. Desta forma, torna-se necessário estudar a resposta da expressão de cor de peixe-palhaço em função da dieta.

O objetivo será encontrar uma dieta capaz de contribuir para melhoria de crescimento, bem-estar, sobrevivência e pigmentação de juvenis de *Amphiprion percula*. Estes fatores são essenciais para uma produção intensiva em aquacultura ornamental, possibilitando o abastecimento em grande escala do negócio da aquariorfilia.

Cada vez mais são realizados estudos na tentativa de melhorar o cultivo desta que é uma das espécies mais conhecidas e procuradas pelos amantes da aquariorfilia, sendo a pigmentação o principal alvo de estudo.

Neste trabalho, todas as dietas demonstraram contribuir para o crescimento e sobrevivência dos juvenis, com taxas de crescimento específico entre $2,226 \pm 0,182$ e $2,395 \pm 0,082\%$ dia⁻¹, sendo que indivíduos alimentados com dieta suplementada com copépodes atingiram os valores mais elevados. Também aqui foi atingida uma pigmentação mais próxima do laranja, típica nos peixes-palhaço selvagens, demonstrado através de diferentes métodos como análise de carotenoides por espectrofotometria e análise de imagem recorrendo ao modelo HSB.

Ainda assim, futuros estudos tornam-se necessários por forma a perceber a quantidade de cada caroteno presente na pele dos indivíduos alimentados com os diferentes suplementos, e se os resultados obtidos se encontram próximos de indivíduos selvagens, complementando os resultados obtidos neste estudo.

6. Referências Bibliográficas

- Ako, H., Tamaru, C. S., Asano, L., Yuen, B., Yamamoto, M., 2000. Achieving natural coloration in fish under culture. In: Spawning and maturation of aquatic species. Eds. Tamaru C. C-T., Tamaru, C. S., McVey, J., Ikuta, K. UJNR Technical Report No 28. University of Hawaii Sea Grant College Program, Hawaii.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Gioacchini, G., Maradonna, F., Carnevali, O., 2007. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, 273(1): 87-95.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A. R., Carnevali, O., 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 298: R359-371.
- Bell, J. G., Mc Evoy, L. A., Estevez, A., Shields, R. J., Sargent, J. R., 2003. Optimizing lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227: 211-220.
- Bjerkeng, B., Hamre, K., Hatlen, B., Wathne, E., 1999. Astaxanthin deposition in fillets of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed two dietary levels of astaxanthin in combination with three levels of α – tocopheryl acetate. *Aquacult Res*, 30(9): 637-646.
- Blackewll, B. G., Brown, M. L., Willis, D. W., 2000. Relative Weight (Wr) Status and current use in fisheries assessment and management. *Reviews in Fisheries Science*, 8: 1-44.
- Blount, J., Surai, P., Nager, R., Houston, D., Moller, A., Trewby, M., Kennedy, M., 2002. Carotenoids and egg quality in the lesser blackbacked gull *Larus fuscus*: a supplemental feeding study on maternal effects. *Proc R Soc B*. 269(1486): 29-36.
- Booth, M. A., Warner-Smith, R. J., Allan, G. L., Glencross, B. D., 2004. Effects of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin color of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquacult Res*. 35(5): 458-464.
- Buston, P., 2003. Forcible eviction and prevention of recruitment in the clown anemonefish. *Behavioral Ecology*, 14: 576–582.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Tejera, N., Jerez, S., Bolanos, A., Lorenzo, A., 2003. Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. *Aquaculture*, 218: 457-469.
- Cervino, J. M., Hayes, R. L., Honovitch, M., Goreau, T. J., Jones, S., Rubec, P. J., 2003. Changes in zooxanthellae density, morphology, and mitotic index in hermatypic corals and anemones exposed to cyanide. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 573–586.
- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Jimeno, C. D., Vardinis, G., Sterioti, A., Divanach, P., 2005. The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Research*, 36: 1517-1525.
- Corbin, J. S., 2001. Marine Ornamentals'99, conference highlights and priority recommendations. In: Marine ornamental conference. Aqua Sci Conserv. Ed. Burgess, P. pp 3:3-11. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Hawaii.

- Dhaneesh, K. V., Nanthini, D. K., Kumar, A. T. T., Balasubramanian, T., Kapila, T., 2011. Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. Journal of King Saud University – Science (Article in Press).
- Dhaneesh, K. V., Kumar, T. T. A., Divya, S. P., Kumaresan, S., Balasubramanian, T., 2012. Influence of prompt first feeding on growth and survival of Clownfish *Amphiprion percula* larvae. Emir. J. Food Agric, 24(1): 92-97.
- Ezhil, J., Jeyanthi, C., Narayanan, M., 2008. Effect of formulated pigmented feed on colour changes and growth of red swordtail, *Xiphophorus helleri*. Turk J Fish Aquat Sci, 8(1): 99-101.
- Fautin, D. G., 1992. Anemonefish recruitment: The roles of order and chance. Symbiosis, 14: 143-160.
- Fernando, O., Raja K., Balasubramanian, T., 2006. Studies on Spawning in Clownfish *Amphiprion sebae* with Various Feed Combinations under Recirculating Aquarium Conditions. International Journal of Zoological Research, 2(4): 376-381.
- Georgieva, L., Dimitrova, T., Angelov, N., 2005. RGB and HSB colour models in colour identification of digital traumas images. International Conference on computer systems and technologies. Technical University, Varna, Bulgaria.
- Goodwin, T., 1984. The biochemistry of the carotenoids: Animals. Vol 2, 2nd edn. Eds. Chapman and Hall. London.
- Gordon, A. K., Hecht, T., 2002. Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. J. Appl. Ichthyol, 18: 113–117.
- Gopakumar, G., 2006. Culture of marine ornamental fishes with reference to production systems, feeding and nutrition. In: Souvenir, Ornamentals Kerala. Eds. Kuruo *et al.*, pp 61-70. Dept. Fisheries, Govt of Kerala.
- Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama, K., Yamashita, E., Terada, H., 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potente antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochim Biophys Acta, 1512(2): 251-258.
- Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Rema, P., Empis, J., 1998. Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source of salmonids: Effect of dietary lipid content on colouringation, digestibility and muscular retention. Aquacult. Int., 6: 269 – 279.
- Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., 2002. Colouringation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (Lin 1875), using *Chlorella vulgaris* microalga. Aquacult. Res., 33: 1 – 7.
- Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O., Empis, J., 2003. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquaculture nutrition, 9: 123-129.
- Gouveia, L., Rema, P., 2005. Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. Aquacult Nutr, 11(1): 19-23.
- Green, B. S., McCormick, M.I., 2004. O2 replenishment to fish nest: males adjust brood care to ambient conditions and brood development. Behavioural Ecology, 16: 389-397.

- Guidelli, G., Tavechio, W. L. G., Takemoto, R. M., Pavanelli, G. C., 2011. Relative condition factor and parasitism in anostomid fishes from the floodplain of the Upper Paraná River, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 177(1-2): 145-151.
- Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. A., Sayanova, O., 2014. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, 22: 3-9.
- Hill, G., Inouye, C., Montgomerie, R., 2002. Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proc R Soc B*, 269(1496): 1119-1124.
- Ho, A. L. F. C., O'Shea, S. K., Pomeroy, H. F., 2013. Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. *Aquacult Int*, 21: 361-374.
- Ho, A. L. F. C., Zong, S., Lin, J., 2014. Skin color retention after dietary carotenoid deprivation and dominance mediated skin coloration in clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *AAAL Bioflux*, 7: 103-115.
- Hoff, F. H., 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clown fish. Dade city, Aquaculture Consultants, Inc., Florida, USA.
- Hudon, J., Grether, G., Millie, D., 2003. Marginal differentiation between the sexual and general carotenoid pigmentation of guppies (*Poecilia reticulata*) and a possible visual explanation. *Physiol Biochem Zool*, 76(6): 776-790.
- Holt, G. J., 2003. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: Cato, J. C., Brown, C. L., eds. *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, Ames, pp. 251-254.
- Ignatius, B., Rathore, G., Jagdis, I., Kandasami, D., Victor, A. C. C., 2001. Spawning and larval rearing technique for tropical clownfish *Amphiprion sebae* under captive conditions. *J. Aqua. Trop*, 16(3): 241-249.
- Johnston, G., Kaiser, H., Hecht, T., Oellermann, L., 2003. Effect of ration size and feeding frequency on growth, size distribution and survival of juvenile clownfish, *Amphiprion percula*. *J. Appl. Ichthyol*, 19: 40-43.
- Kalinowski, C. T., Robaina, L. E., Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Izquierdo, M. S., 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture*, 244(1-4): 223-231.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J., Rimmer, M.A., 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture*, 249: 339-351.
- Kumar, T. T., Balasubramanian, T., 2009. Broodstock development, spawning and larval rearing of the false clown fish, *Amphiprion ocellaris* in captivity using estuarine water. *Curr. SCI.*, 97(10): 1483-1486.
- Kumar, T. T. A., Gunasundari, V., Prakash, S., 2015. Breeding and Rearing of Marine Ornamentals. In: *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*, eds. Perumal, S., Thirunavukkarasu, A. R., Pachiappan, P., pp. 101-107. Springer India.
- Lieske, E., Myers, R., 1994. Fishbase. [ONLINE] Disponível em: <http://www.fishbase.org/summary/Amphiprion-percula.html>. [Acedido a 2 de Agosto de 2015].

- Lupatsch, I., Floyd, R.J., Shields, R. J., Snellgrove, D.L., 2012. Feed Requirements for Maintenance and Growth of Anemone Clownfish *Amphiprion percula*. The Israeli Journal of Aquaculture, 1-9.
- Madhu, K., Madhu, R., Krishnan, L., Sasidharan, C. S., Venugopalan, K. M., 2006. Spawning and larval rearing of *Amphiprion ocellaris* under captive condition. Mar. Fish. Infor. Serv, 188: 1-5.
- Madhu, R., Madhu, K., Rethesh, T., 2012. Life history pathways in false clown *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830: A journey from egg to adult under captive condition. J. Mar. Biol. Ass. India, 54(1): 77-90.
- Mak, K. K. W., Hideshi, Y., Reinhard, R., 2005. Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. Biosensors & Bioelectronics, 20:2581–2593.
- Matsuno, T., 2001. Aquatic animal carotenoids. Fisheries Science, 67: 771-783.
- McGraw, K. J., Ardia, D. R., 2003. Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental test. Am Nat, 162(6): 704-712.
- McKenzie, D. J., Höglund, E., Dupont-Prinet, A., Larsen, B. K., Skov, P. V., Pedersen, P. B., Jokumsen, A., 2012. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. Aquaculture, 338-341(0): 216-222.
- Moorhead, J. A., Zeng, C., 2010. Development of Captive Breeding Techniques for Marine Ornamental Fish: A Review. Reviews in Fisheries Science, 18(4): 315-343.
- Olivotto, I., Cardinali, M., Barbaresi, L., Maradonna, F., Carnevali, O., 2003. Coral reef fish breeding: The secrets of each species. Aquaculture, 224: 69-78.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, M. A., Vitiello, V., Maradonna, F., Carnevali, O., 2008. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects of larval survival and growth. Aquaculture, 274(2-4): 347-352.
- Olivotto, I., Tokle, N., Nozzi, V., Cossignani, L., Carnevali, O., 2010. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: a feeding study. Aquaculture, 30: 124-131.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G. J., Avella, M. A., Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. Journal of the World Aquaculture Society, 42(2): 135-166.
- Olivotto, I., Gaiot, G., Holste, L., Tulli, F., Cardinaletti, G., Piccinetti, C. C., Gioacchini, G., Carnevali, O., 2012. Are *Acartia tonsa* cold-stored eggs a suitable food source for the marine ornamental species *Amphiprion polymnus*? A feeding study. Aquaculture nutrition, 18: 685-696.
- Önal, U., Langdon, C., Çelik, I., 2008. Ontogeny of the digestive tract of larval percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacépède 1802): a histological perspective. Aquaculture Research, 39: 1077–1086.
- Page, G. I., Davies, S.J., 2006. Tissue astaxanthin and canthaxanthin distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Comparative Biochemistry and Physiology, 143A: 125-132.

- Postma, P. R., Miron, T. L., Olivieri, G., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., Eppink, M. H. M., 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology*, 184: 297-304.
- Ramamoorthy, K., Bhuvaneshwari, S., Sankar, G., Sakkaravarthi, K., 2010. Proximate Composition and Carotenoid Content of Natural Carotenoid Sources and its Colour Enhancement on Marine Ornamental Fish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1880). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(6): 545-550.
- Rhyne, A. L., Tlustý, M. F., Schofield, P. J., Kaufman, L., Morris, J. A. Jr., Bruckner, A. W., 2012. Revealing the appetite of the marine aquarium fish trade: the volume and biodiversity of fish imported into the United States. *PLoS One*, 7(5): e35808.
- Rodriguez-Amaya, B. D., 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC, OMNI Research.
- Yasir, I., Qin, J. G., 2007. Embryonic development and early ontogeny of false clownfish *Amphiprion ocellaris* Cuvier. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87: 1025-1033.
- Yasir, I., Qin, J. G., 2009a. Impact of Background on Color Performance of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40: 724-734.
- Yasir, I., Qin, J. G., 2009b. Effect of light intensity on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40: 337-350.
- Yasir, I., Qin, J. G., 2010. Effect of Dietary Carotenoids on Skin Color and Pigments of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41: 308-318.
- Santana, N. E., Robaina, L., Afonso, J.M., Merlo, V., Molina-Domínguez, L., 2015. Optimización de la dieta en la etapa de engorde del falso pez payaso (*Amphiprion ocellaris*, Cuvier 1830). XV Congreso Nacional / I Congreso Ibérico de Acuicultura, 94 – 95.
- Sales, J., Janssens, G. P. J., 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquat. Living Resour*, 16: 533-540.
- Saoud, I. P., Ghanawi, J., Lebbo, N., 2008. Effects of stocking density on the survival, growth, size variation and condition index of juvenile rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Aquacult Int*, 16(2): 109-116.
- Schiedt, F., Leuenberger, F. J., Vecchi, M., Glinz, E., 1985. Absorption retention and metabolic transformation of carotenoids in rainbow trout salmon and chicken. *Pure & Applied Chemistry*, 57: 685-692.
- Sinha, A., Asimi, O. A., 2007. China rose (*Hibiscus rosasinensis*) petals: a potent natural carotenoid source for goldfish (*Carassius auratus* L.). *Aquacult Res*, 38(11): 1123-1128.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng*, 101: 87–96.
- Stottrup, J. G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquac. Res.*, 31: 703-711.
- Sugimoto, M., 1993. Morphological color changes in the medaka, *Orzias latipes*, after prolonged background adaptation. I. Changes in the population and morphology of melanophores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 104:513.

- Sumanta, N., Haque, C., Nishika, J., Suprakash R., 2014. Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(9): 63-69.
- Tanaka, Y., Yamamoto, A., Kamata, T., Simpson, K., 1992. Biochemical study on the carotenoids in the anemonefish, *Amphiprion* spp. *Mem Fac Fish Kagoshima Univ*, 41: 1-8.
- Tlusty, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 205: 203-219.
- van Nieuwerburgh, L., Wänstrand, I., Liu, J., Snoeijs, P., 2005. Astaxanthin production in marine pelagic copepods grazing on two different phytoplankton diets. *J Sea Res*, 53(3): 147-160.
- Villalta, M., Esteeveza, A., Bransdenb, M. P., Bell, J. G., 2005. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Sole senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture*, 249: 353-365.
- Vinoth, R., Kumar, T. T. A., Gopi, M., 2010. Photoperiod Induced Larval Growth of Anemonefish *Amphiprion percula*. *World Applied Sciences Journal*, 10(3): 283-286.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak T., 2003. From ocean to aquarium. UNEP-WCMC, Cambridge, UK.
- Wallat, G. K., Lazur, A. M., Chapman, F. A., 2005. Carotenoids of different types and concentrations in commercial formulated fish diets affect color and its development in the skin of the red oranda variety of goldfish. *N Am J Aquacult*, 67(1): 42-51.
- Wathne, E., Bjerkeng, B., Storebakken, T., Vassvik, V., Odland, A. B., 1998. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. *Aquaculture*, 159 (3-4): 217-231.
- Wittenrich, M. L., 2007. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. Publications, Neptune City, T.F.H.

Anexos

Anexo I

Parte do trabalho realizado foi aceite, como comunicação oral, no congresso FENACAM & LACAQUA'15, com o título "ANEMONEFISH, *Amphiprion percula* GROWTH UNDER DIFFERENT DIETS", com lugar em Fortaleza, Brasil, em Novembro de 2015.

ANEMONEFISH, *Amphiprion percula* GROWTH UNDER DIFFERENT DIETS

Marcela França, Ricardo Passos, Rodolfo Ramos, Marina Machado, Ana Pombo and Teresa Baptista*

MARE—Marine and Environmental Sciences Centre, ESTM, Polytechnic Institute of Leiria, 2520-641 Peniche, Portugal
Email: teresa.baptista@ipleiria.pt

Anemonefishes such as *Amphiprion percula* are important in the ornamental industry due to their beautiful colors. However the coloration of reared fish is inferior from the wild fish. The latest usually are reddish orange and farmed fish are light orange. This study aims to observe the effect of diet on growth and on skin color.

Two-month-old *A. percula* (0.13 ± 0.06 g), obtained from a local aquaculture supplier were distributed in 12 glass aquaria (50x30x30cm), with 25 fish each (0.5 ind.l^{-1}). The aquaria were supplied with a water re-circulating system and environmentally enriched with PVC tubes, as shelters. Temperature, salinity and photoperiod were fixed at $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 33 and 12-h light:12-h dark, respectively. Organisms were fed *ad libitum* three times per day. Three diet formulations from a basal composition differently supplemented were tested. Diet A – copepods; diet B – *Chlorella*, diet C – mix of copepods and *Chlorella*. As control, a commercial feed for clownfish. Color observation, total length, weight and survival were evaluated in the end of assay. Data was analyzed by two-way ANOVA, with time and diet as factors, followed by Tukey post hoc ($P \leq 0.05$) using the computer package STATISTICA 12 for WINDOWS.

ANOVA analysis showed that diet A had a statistically different ($P \leq 0.05$) and higher influence on weight and total length comparing to other diets. All diets were positive for survival and growth along the study. In ornamental aquaculture, color is a key factor, but also growth and survival are as much important. In this study, diet A supplemented with copepods showed a higher growth both in weight and length and fish also get a reddish orange color. This can be explained by the fact that marine copepods are considered a nutritionally superior feed.

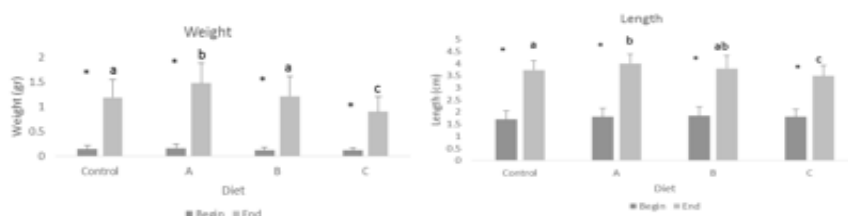


Figure 1. Values of weight and length over time. The values represent the means \pm SEM. Means with different letters denote significant differences ($P \leq 0.05$).

Anexo II

Um trabalho realizado em paralelo, com o título: “Anemonefish, *Amphiprion percula* behavior on captivity under different diets conditions” teve presença no congresso Aquaculture Europe, realizado em Roterdão, Holanda, em Outubro de 2015.

AE2015 JOIN US IN THE NETHERLANDS

Aquaculture, Nature and Society
aquaculture europe 15
ROTTERDAM • OCTOBER 20-23, 2015

easonline.org

Organised by the European Aquaculture Society in cooperation with IMARES Wageningen UR

WAGENINGEN UR For quality of life
Ministerie van Economische Zaken
Provincie Zeeland
AE2015 Gold Sponsor BioMar

ANEMONEFISH, *Amphiprion percula* BEHAVIOR ON CAPTIVITY UNDER DIFFERENT DIETS

R. Passos, R. Ramos, M. França, S. Mendes, A. Pombo and T. Baptista*

MARE—Marine and Environmental Sciences Centre, ESTM, Polytechnic Institute of Leiria, 2520-641 Peniche, Portugal
Email: teresa.baptista@ipleiria.pt

Introduction

Anemone fishes such as *Amphiprion percula* are a territorial species as shown in some behavioral studies Iwata and Manbo (2013). But none of these studies was focused on the effect of diet on behavior in this species on captivity. This knowledge can be used to rear these fish in a better environment, being fish welfare the target. This study aims to obtain information, through the observation of several behavioral elements comparing three diets.

Material and Methods

Two-month-old *A. percula* (weight 0.13 ± 0.06 g), obtained from a local aquaculture supplier were used in the experiment. The individuals were distributed in 12 aquaria (50x30x30cm) equipped with a water re-circulating system and environmentally enriched with PVC tubes, as shelters. Temperature, salinity and photoperiod were fixed at $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 33 and 12-h light:12-h dark, respectively. Organisms were fed *ad libitum* three times per day. The number of animals per aquarium was 25, corresponding to a density of 0.5 ind.l⁻¹. Three diet formulations, were tested, diet A – supplemented with copepods; diet B – supplemented with *Chlorella*, diet C – supplemented with a mix of copepods and *Chlorella* and as control, a commercial feed for clownfish. To assess the effects of feed on behavior, observations of 5 minutes on each aquarium were performed, before the first feeding of the day (fasting) and 1 hour after feeding (fed). These observations started when fish were four months old. Behavior observation elements adapted from the work of Iwata and Manbo (2013) were: lunging, biting, trembling and shelter defense, territorial shelter dispute, biting and side-by-side or face-to-face swimming and bottom searching feed. Also was registered the banding pattern during the experiment. Behavior observation elements (namely, bottom searching feed, lunging, shelter defense, biting, face-to-face swimming, trembling and visual contact) are reported as means \pm SD of average values per diet of each behavior element. All data were checked for normality and homoscedasticity. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant differences of the effect of the diets (namely, A, B, C and control) (Zar, 2009). In order to analyze the pattern of difference between means, the ANOVA was followed by pairwise comparisons by means of Least Significant Difference test (LSD; Williams and Abdi, 2010). Also Dunnett's multiple comparison of group means were employed to determine significant differences relatively to control diet (Zar, 2009). When assumptions (that is, normality and homoscedasticity) were not met, Kruskal-Wallis, followed by Games-Howell test was employed as appropriate (Games and Howell, 1976; Kirk, 1982). Additionally, Chi-square test was used for study the association in contingency tables (Steel et al., 1997) for the behavior elements as biting, side-by-side or face-to-face swimming and shelter dispute. Therefore, it is thus possible to detect and describe patterns of association (or dissociation) between the various elements addressed throughout the behavior study. For all statistical tests, the significance level was set at $p\text{-value} \leq 0.05$. All calculations were performed with IBM SPSS Statistics 22.

Results

Concerning lunging, being this a typical threatens behavior by dominant anemone fish; diet C is significantly lower than the other diets ($p\text{-value} \leq 0.05$). When the frequency of chasing and biting another individual was considered, diets B and C were significantly lower than control ($p\text{-value} \leq 0.05$). There were observed statistically significant results in A and C diets, being the A diet higher than the control and C lower for trembling ($p\text{-value} \leq 0.05$). This is the frequency of focal individual to twitter its whole body. Shelter defense results were significantly higher for diet A, comparing with control ($p\text{-value} \leq 0.05$). Frequency of biting and side-by-side or face-to-face swimming interactions show a tendency of being higher at fasting state, diminishing for both states, fasting and fed, along the experiment months ($p\text{-value} \leq 0.05$). Interaction period of two seconds had higher frequency. Regarding shelter dispute results seem to show a diminishing tendency toward the end of the experiment ($p\text{-value} \leq 0.05$). The banding pattern was different among diets during the experiment. Diet A, and control were the first where the fish exhibited the third band, in the beginning of this study, meanwhile the fish fed with the other two diets were still forming the second band. In the end of following month, fish fed with control, B and A diets, showed an almost finished third band and starting of black edging outline. At this time, fish fed with C diet started to form the third band. After two months from the beginning of the study, fish fed with control, A, and B diets, showed the third band totally formed and the black edging outline getting thicker. Meanwhile the fish fed with diet C, still had the third band poorly developed and started to show the black edging outline.

(Continued on next page)

Discussion and Conclusion

The fish fed on diet C, took longer time developing, as revealed on the observations of banding pattern. These results are in agreement with those obtained on the behavior traits observed, such as on lunging, biting, and trembling. Fish fed with A diet showed a significantly higher value for biting which is consistent with trembling observations. In *Amphiprion ocellaris*, the rank order of the group is established in a very early phase of group formation and is maintained for the long term (Iwata *et al.*, 2008). This behavior could explain the decrease of the frequency of shelter dispute registered toward the end of the study. The types of aggression mentioned above are common in groups of *A. percula*, since hierarchy is related with size, if there are fishes in the same length level they will fight in order to demonstrate dominance towards the other (Buston, 2003a). The same author refers that anemone fish adjust their size and growth rate according to their social status within the group. As for the higher frequency of biting and side-by-side or face-to-face swimming interactions in the fasting state when compared to the fed state, it could be explained by the availability of better resources to the top ranked fish. This is corroborated by previous studies in which is explained that the rank may confer access to better food, better shelter and greater reproduction chances, if some of these factors are limiting the competition for the rank may favor natural selection. (Buston, 2003b).

References

- Buston, P., 2003a. Size and growth modification in clownfish. Sex change is not the only way these fish achieve dominance – they grow into the role. *Nature*. 424:145-146.
- Buston, P., 2003b. Mortality is associated with social rank in the clown anemonefish (*Amphiprion percula*). *Marine Biology*. 143: 811-815
- Games, P.A., Howell, J.F., 1976. Pairwise Multiple Comparison Procedures with Unequal N's and/or Variances: A Monte Carlo Study. *Journal of Educational Statistics* 1:113-125
- Iwata, E., Nagai, Y., Hyoudou, M., Sasaki, H., 2008. Social environment and sex differentiation in the false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Zoological Science*. 25(2):123-128.
- Iwata, E., Manbo, J., 2013. Territorial behaviour reflects sexual status in groups of false anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) under laboratory conditions. *Acta Ethol.* 16:97-103.
- Kirk, R.E. 1982. *Experimental design: procedures for the behavioral sciences*. Brooks/Cole Pub. Co., Monterey, Calif.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 1997. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 3rd ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc. p. 502- 26.
- Zar, J.H., 2009. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education International; 5th ed.