

Instituto Politécnico de Leiria
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



***Efeito da intensidade luminosa na coloração do peixe-
palhaço Clarkii (Amphiprion clarkii)***

Vinícia Da Florência Matias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Ricardo Calado e do
Doutor Rui Pedrosa

Novembro de 2011

Instituto Politécnico de Leiria
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



***Efeito da intensidade luminosa na coloração do peixe-
palhaço Clarkii (Amphiprion clarkii)***

Vinícia Da Florência Matias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Ricardo Calado e do
Doutor Rui Pedrosa

Novembro de 2011

Efeito da intensidade luminosa na coloração do peixe-palhaço Clarkii (Amphiprion clarkii)

Vinícia Da Florência Matias

2011

Copyright[©] Vinícia Da Florência Matias
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria

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

Gostaria de agradecer, primeiramente, a todas as pessoas envolvidas na realização da minha dissertação. Aos meus orientadores, o Prof. Ricardo Calado na ajuda da escolha da tese e em todo o processo envolvente, e o Prof. Rui Pedrosa que esteve sempre de porta aberta para me receber e com motivação nas alturas que as coisas correram menos bem. Agradeço, também ao Prof. Rui Rocha, pela montagem dos sistemas de aquários, bem como a todo o pessoal técnico da escola, principalmente ao João Chambel, que sempre me ajudaram com o seu conhecimento e simpatia e sem os quais este trabalho não teria sido possível. Um muito obrigado a todos.

Acima de tudo, gostaria de agradecer aos meus pais, aos quais dedico este trabalho, por todo o apoio financeiro e pela motivação que me deram ao longo de todo o mestrado e ainda à minha irmã e ao meu namorado que também muito me auxiliaram e apoiaram. Agradeço, também, a todos os meus amigos pelo excelente companheirismo e apoio académico que me deram ao longo destes dois anos.

Por fim, dedico também este trabalho, ao meu avô Isidro Florência, que faleceu durante o decorrer desta tese, as minhas eternas saudades!

Resumo

Aquariofilia é uma indústria muito importante no mercado internacional. A comercialização de peixes ornamentais marinhos teve início no Sri Lanka, em 1930, estando atualmente difundida em mais de 80 países. Existe um esforço mundial para condicionar a captura de animais selvagens, promovendo os cultivos em cativeiro.

Os peixes-palhaço são fortes candidatos à produção em cativeiro, pois são de fácil cultivo e apreciados pelos aquarofilistas. A espécie *Amphiprion clarkii* é uma das mais populares em aquários, devido à sua resistência e coloração. No entanto, um dos problemas associados ao cultivo desta espécie está relacionado com alterações na coloração selvagem, bem como na manutenção de colorações homogêneas entre populações de peixes ornamentais produzidos em cativeiro.

O objetivo deste estudo foi observar o efeito da intensidade luminosa na coloração da espécie *Amphiprion clarkii* durante o seu crescimento em cativeiro, utilizando métodos de análise colorimétrica não invasiva e não destrutivos.

Utilizaram-se 3 sistemas de iluminação, com diferentes intensidades luminosas (30, 1200 e 2700 lux), ligados a um único sistema de filtração. No início da experiência os peixes tinham 2 meses de vida e foram alimentados duas vezes ao dia e expostos a um fotoperíodo de 12h:12h. No final do ensaio (12 semanas) a coloração foi avaliada com auxílio de um espectroradiômetro.

Observou-se que a luminosidade não afeta o crescimento dos peixes. Os peixes usados como padrão eram mais escuros, mas menos amarelos e vermelhos do que os peixes em estudo. Não existiram diferenças no parâmetro luminoso L^* ao longo do tempo. No entanto, os peixes demonstraram uma tendência para ficarem mais vermelhos e amarelos com o passar do tempo, mas de um modo independente da luminosidade. A intensidade luminosa não alterou a saturação, verificando-se para os três sistemas um aumento ao longo do tempo. Não existiram alterações na tonalidade, nem na variação total da cor em função da intensidade luminosa. Nas análises com o espectroradiômetro, houve diferenças entre os animais do ensaio e os peixes padrão. No entanto, não houve diferenças entre os 3

sistemas na zona dorsoventral, apenas ocorreram diferenças na zona caudal entre a luminosidade 30lux e a luminosidade 2700lux.

Em conclusão, não se verificaram alterações significativas na coloração dos peixes *Amphiprion clarkii* em função da intensidade luminosa. O uso de métodos não invasivos neste trabalho foi um sucesso, já que ambos os métodos utilizados traduzem os mesmos resultados em relação à variação de cor.

Palavras-chave: *Amphiprion clarkii*, intensidade luminosa, colorímetro, espectroradiómetro

Abstract

Ornamental fish trade is a very important industry in the international market. The commercialization of ornamental fish began in Sri Lanka, in the year 1930, but nowadays is an important business activity in over 80 countries. Currently there is a global effort to prevent the capture of wild animals, with the aquaculture production of marine ornamental fishes being significantly improved on the last years.

Yellow tailed clown-fish are strong candidates for captivity production, because they are easy to farm and this fish species is particularly appreciated by marine aquarium hobbyists. *Amphiprion clarkii* is one of the most popular in aquariums due to their resistance and coloration. However one of the problems with the farming of this species is associated with shifts in native coloration, as well as maintenance of a homogeneous coloration between ornamental fish population in captivity.

The aim of this study was to observe the relationship between light intensity and the coloration of *Amphiprion clarkii* using non-invasive and non-destructive techniques for colorimetric analyzes.

Three illumination systems with three different light intensities (30, 1200, 2700 lux) were employed, with a single filtration system being used to stock all fishes. At the beginning of the experience fishes were only 2 months old and were fed twice a day under photoperiod of 12h: 12h. The coloration was measured at week 0, 5, 7, 9 and 12, using a colorimeter. Color was also evaluated at the end of the experiment with a spectroradiometer.

It was observed, that light intensity does not affect the growth of stocked fishes. Fishes used as a standard were darker, but displaying less yellow and red than all fishes used in this study.

The different L* color parameter did not change. However, there was a tendency for fishes to get more red and yellow in a time dependent manner, which was that were not light dependent. Color saturation increased during the experiment. However, this result was also not light dependent. Light intensity did not change tonality or total color, with the

spectroradiometer showing differences between standard fishes and fishes exposed to different light intensities. There were no differences between the three illumination regimes on the coloration of the dorsal-ventral area. However, differences were recorded on the anal fin region between the 30 and 2700 lux experimental conditions.

We can conclude that light intensities of 30, 1200 and 2700 lux did not significantly change fish coloration. The use of non invasive methods on this work proved to be a success, as both methods employed displayed concordant results on color changes.

Keyword: *Amphiprion clarkii*, light intensity, colorimeter, spectroradiometer

Índice matérias

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Índice matérias.....	1
Lista abreviaturas, siglas e símbolos	3
1. Introdução	5
2. Objetivo	13
3. Metodologia.....	15
3.1. Desenho experimental	15
3.2. Manutenção peixes	15
3.3. Medição de tamanho	16
3.4. Medição de coloração	16
3.5. Análise estatística.....	18
4. Resultados	19
4.1. Avaliação da intensidade luminosa no crescimento	19
4.2. Avaliação da intensidade luminosa na cor (sistema L*a*b*).....	20
4.2.1. Análise da Saturação	21
4.2.2. Análise da Tonalidade	22
4.3. Análise da variação da L, a, b e variação total da cor	22
4.4. Análise dos dados de refletância.....	24
5. Discussão	27
6. Conclusão	31
7. Perspetivas futura	33
8. Bibliografia	35
Sites consultados:.....	37
Anexo	39
Anexo A – Composição da ração	39

Lista abreviaturas, siglas e símbolos

l – litro

g – grama

cm – centímetro

mm - milímetros

mg – miligrama

ppm – partes por milhão

SEM – Erro médio padrão

C* - saturação

h* - tonalidade

°C – graus centígrados

1. Introdução

A indústria dedicada à aquariofilia representa um importante sector de mercado, a nível internacional, movimentando milhões de dólares. Daí muitos países começarem a apostar neste tipo de produção, que utiliza técnicas da aquacultura convencional, juntamente com técnicas desenvolvidas pelos próprios produtores (Lin *et al*, 2009; Moorhead *et al*, 2010; Ribeiro *et al*, 2008).

A criação de peixes surgiu, primeiramente, para combater as necessidades alimentares básicas. No entanto, existem dados que mostram que na China, há mais de 3 mil anos, já se produziam peixes para fins ornamentais. Por sua vez, só no século XIX é que esta prática se tornou famosa na Europa, com a construção em Londres (1853) do primeiro aquário público (Nottingham *et al*, 2005).

Nos anos trinta do século XX, no Sri Lanka, teve início o comércio de peixes ornamentais marinhos, alcançando níveis internacionais duas décadas depois. Em 1970 este negócio já era praticado por vários países tropicais, sendo que atualmente já existem mais de 80 países envolvidos neste tipo de negócio. Anualmente são comercializadas mais de 1.500 espécies para aquariofilia, sendo, aproximadamente, 800 espécies de água salgada. No entanto, apenas 100 são produzidas regularmente em cativeiro (Kodoma *et al*, 2011).

Dados recentes, mostram que milhões de pessoas mantêm em seu domínio aquários marinhos, mas contrariamente aos peixes de água doce, a maioria dos peixes marinhos (90 a 99%) são capturados na natureza, principalmente nas zonas tropicais e subtropicais, sendo a Indonésia e as Filipinas os principais exportadores. Se por um lado estas zonas são as mais ricas em variedade de espécies, por outro também são as mais exploradas a nível de pescado, tanto para fins nutricionais humanos como para a área ornamental (Kodoma *et al*, 2011; Monteiro-Neto *et al*, 2003; Moorhead *et al*, 2010; Nottingham *et al*, 2005; Olivotto *et al*, 2011).

Atualmente, a nível mundial, existe um esforço para condicionar a captura de animais selvagens e dar reconhecimento aos seres criados em cativeiro, sendo esta, considerada por muitos, uma ferramenta capaz de tornar o aquariofilismo uma atividade mais sustentável

do ponto de vista ambiental, aliviando a pressão da pesca nos recifes de coral (Kodoma *et al*, 2011; Monteiro-Neto *et al*, 2003; Tlusty, 2004; Olivotto *et al*, 2011).

A escolha de espécies para produção em aquacultura depende de variados fatores, as necessidades de mercado, o valor da espécie, aspetos biológicos e técnicas de produção disponíveis. Segundo alguns autores, os peixes-palhaço apresentam vários fatores favoráveis, uma vez que se domina o seu cultivo e atinge bons preços no mercado. O género *Amphiprion* é constituído por 27 espécies, que se distribuem entre o Indo-Pacífico e o mar Vermelho. A espécie *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830) é umas das mais populares em aquários domésticos devido à sua resistência, sendo caracterizado pela sua forma oval, duas faixas brancas verticais, uma atrás do olho e outra logo acima do ânus, podendo a barbatana caudal ser branca ou amarelada (Figura 1). A coloração do corpo varia consoante a sua origem geográfica (Figura 2), mas normalmente apresenta um tom alaranjado com vários graus de preto. Na fase juvenil apresentam uma coloração amarela. Como outras espécies de peixe-palhaço estes vivem associados a anémonas, onde se protegem dos predadores. Outra característica interessante destes animais é o facto de serem hermafroditas protândricos, pois são animais que vivem em grupos sociais, onde existe uma dominância baseada no tamanho corporal, sendo que num grupo o maior animal geralmente é uma fêmea e os restantes machos, aquando da remoção da fêmea o maior macho do grupo sofre uma reversão sexual. Este facto facilita a formação de casais em cativeiro (Kobayashi *et al*, 2010; Kodoma *et al*, 2011; Le *et al*, 2011; Parmentier *et al*, 2009).



Figura 1 – *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830) (www.fishbase.org)

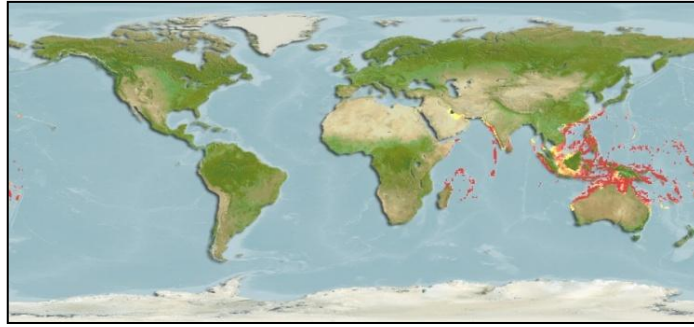


Figura 2 - Mapa da distribuição geográfica do *Amphiprion clarkii* (www.fishbase.org)

Por vezes o valor de mercado de um animal para aquário também é afetado pela sua própria coloração, sendo que os compradores tendem a adquirir animais com padrões diferentes dos encontrados na natureza. De modo a promover esta situação, na produção em aquacultura, utilizam-se várias técnicas, como modificações genéticas, dietas com suplemento de pigmentos ou mesmo vários tipos de iluminação. Para que haja uma confirmação destas alterações na pigmentação usam-se várias técnicas laboratoriais, como a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), para separação e identificação de pigmentos, bem como ferramentas não invasivas, como máquinas fotográficas e colorímetros. Na análise computacional, comumente recorre-se ao uso do sistema CIELAB, que consiste num modelo matemático que é usado para descrever vários componentes da cor através de fórmulas matemáticas. Este cobre na íntegra todo o espectro visível pelo olho humano e representa-o de forma uniforme, sendo possível detetar pequenas diferenças de tonalidade numa determinada cor (Melgosa, 1999).

O sistema CIELAB (CIE $L^*a^*b^*$) foi criado em 1973 pela comissão internacional de iluminação, com o objetivo de ser o espaço de cor mais completo, de modo a ser usado como referência em vários modelos de cores de superfícies. Sendo, que este permite especificar as cores num espaço tridimensional cúbico (Figura 3), onde o L representa a luminosidadeⁱ e vai desde o branco (0) até ao preto (100), os eixos a^* e b^* não apresentam limites numéricos. No entanto, valores positivos de a^* apresentam uma tendência vermelha enquanto os negativos são esverdeados, por sua vez valores positivos de b^* representam os amarelos e valores negativos representam os azuis (Figura 4). Com estes dados pode-se

ⁱ Grau de claro ou escuro; percepção visual onde uma área emite mais ou menos luz.

calcular a tonalidadeⁱⁱ e a saturaçãoⁱⁱⁱ de uma cor. As variações (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) das componentes de cor podem ser analisadas de modo independente ou combinado, permitindo observar diferenças entre as várias componentes de cor entre amostras ou para cálculos da variação total da cor (ΔE) de uma amostra (Ertas *et al*, 2006; Singh *et al*, 2009; Wee *et al*, 2006).

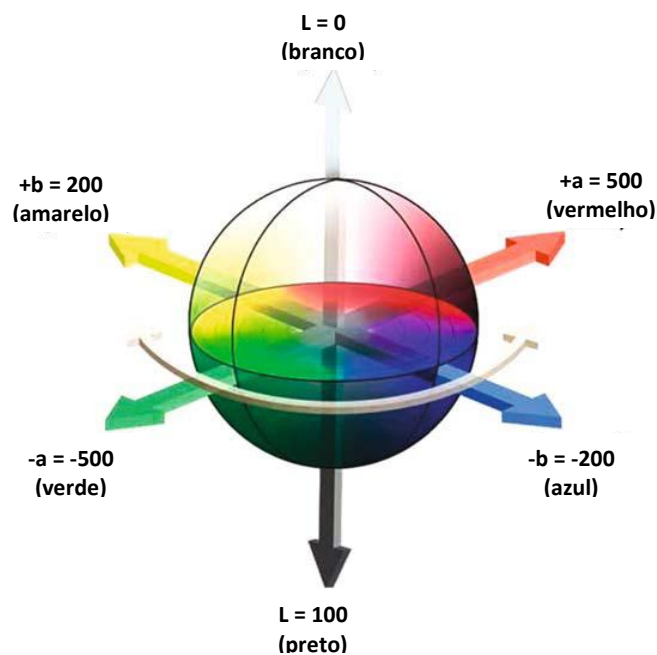


Figura 3 - Representação do espaço cúbico CIE Lab (Singh *et al*, 2009)

ⁱⁱ Percepção visual onde uma cor é identificada como vermelho, amarelo, azul, entre outros. Branco, preto e cinzas são cores que não possuem tonalidade nem saturação.

ⁱⁱⁱ Vivacidade da cor. Quanto mais pura é uma cor mais viva ela será.

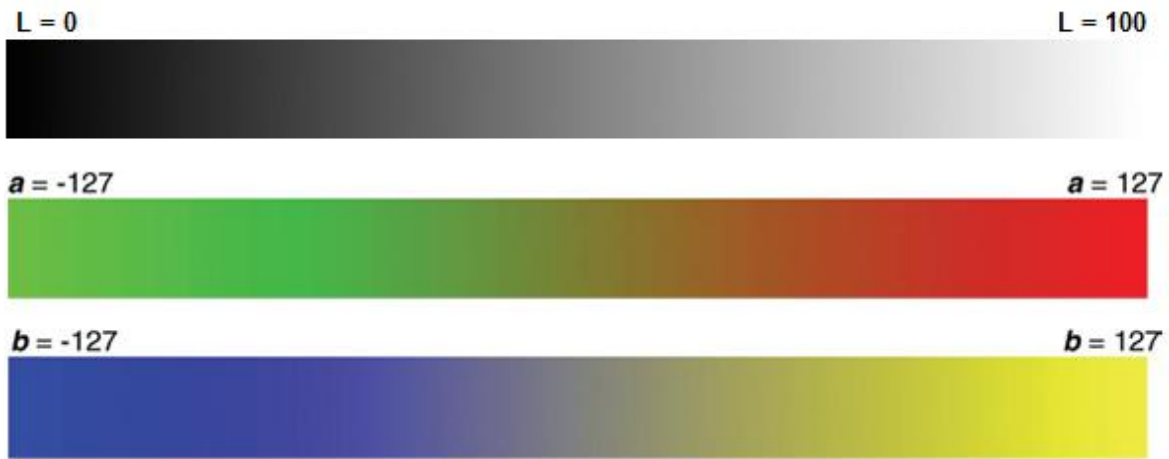


Figura 4 - Representação evolutiva da cor segundo o esquema CIE Lab (OptelVision)

Existem dois instrumentos principais para medir coloração em superfícies opacas, o colorímetro e o espectrofotómetro de refletância. Este último mede a quantidade de luz refletida por uma amostra em função do comprimento de onda, tendo como resultado um espectro de refletância. Por outro lado, o colorímetro aplica três filtros de banda larga de forma a obter três registos que são diretamente convertidos em valores numéricos de L^* , a^* e b^* .

Existem vários trabalhos onde se usa a intensidade luminosa para tentar provocar uma alteração de cor em peixes ornamentais, onde apenas são estudados os pigmentos presentes nestes. No entanto, estes estudos, na sua grande maioria, quantificam os pigmentos por HPLC, o que implica extração das moléculas com o sacrifício dos animais.

Um dos exemplos deste tipo de trabalho foi realizado por Lin *et al* (2009), onde foi abordado qual o efeito da cor do fundo dos aquários, da intensidade luminosa e da temperatura na sobrevivência e coloração de cavalos-marinhos (*Hippocampus erectus*). Segundo os autores é importante realizar experiências com esta espécie devido à brusca queda da população em meio natural, principalmente por causa do seu uso na medicina tradicional chinesa, mas também à sua procura para aquarofilia. Ao conseguir-se cultivar esta espécie em cativeiro, com melhores taxas de sobrevivência e com a coloração pretendida, a sua captura em meio natural deverá reduzir, mas para que tal aconteça é necessário observar que fatores ambientais afetam esta espécie de cavalos-marinhos. No final do ensaio os autores chegaram à conclusão que a cor do fundo dos tanques, a

intensidade luminosa e a temperatura são fatores importantes no cultivo destes animais, pois podem induzir uma variedade de respostas em relação ao crescimento, sobrevivência e *stress*. Uma explicação possível é que como se tratam de animais que usam a visão na captura de presas, a exposição a ambientes mais claros faz com que gastem mais energia na sua alimentação, havendo assim um maior desgaste do animal ficando mais propício a patologias que podem causar mortalidade (Lin *et al*, 2009).

Em 2009, Yasir *et al*, também realizaram um estudo relacionado com a intensidade luminosa, onde pretendiam observar o efeito desta na coloração do falso peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) através de análise visual e quantificação dos carotenoides da pele do peixe. Eles usaram esta espécie por ser um peixe muito importante na indústria ornamental, devido à sua coloração, ao seu comportamento e à sua relação simbiótica com anémonas. No entanto, a coloração dos peixes-palhaço de cativeiro é menos atraente do que a dos seus semelhantes do meio selvagem. Para a realização do estudo usaram juvenis de 3 meses alimentados com uma dieta sem suplemento de carotenoides, submetidos a três níveis de intensidade luminosa (20-50, 600-850 e 2700-3500 lux). A experiência durou 5 semanas, e a cada semana foram amostrados 3 animais, que foram fotografados e posteriormente sacrificados para análise em HPLC. Os resultados obtidos neste estudo mostram que não houve alterações significativas de tonalidade e saturação entre os vários tratamentos porém, os animais que se encontravam com menos intensidade luminosa apresentavam uma coloração mais viva do que os outros. Na análise de HPLC, foi visível que o β -caroteno foi o principal pigmento encontrado, seguido da zeaxantina, sendo que a astaxantina e a cantaxantina foram os com menor percentagem, algo que já tinha também sido demonstrado em estudo anteriores. No entanto, os 3 tratamentos não mostraram diferenças significativas na quantidade de astaxantina, β -caroteno e cantaxantina, apenas houve diferenças na quantidade de zeaxantina presente na pele dos animais, obtendo valores mais altos para este pigmento no tratamento com a intensidade luminosa mais baixa. A explicação dada pelos autores para esta diferença é que embora os peixes não consigam sintetizar carotenoides, conseguem mudar de cor em determinadas circunstâncias, metabolizando um tipo de carotenoides para formar outros, algo que já estava relatado noutros trabalhos, onde se concluiu que o peixe-palhaço pode converter astaxantina e cantaxantina em zeaxantina. Deste modo, confirmou-se que o falso peixe-

palhaço consegue manter os níveis de carotenoides na sua pele independentemente do tipo de dieta que consome (Yasir *et al*, 2009).

Muitos outros estudos foram realizados com o intuito de observar o efeito da luz na coloração de peixes e invertebrados ornamentais, assim como também para animais de consumo humano, havendo alguns que apresentam variações segundo a intensidade luminosa a que estão sujeitos e em contra partida, várias espécies parecem não ser afetadas visualmente por este fator.

2. Objetivo

O objetivo global deste trabalho foi estudar o efeito da intensidade luminosa na coloração do peixe-palhaço Clarkii (*Amphiprion clarkii*) através da utilização de técnicas laboratoriais não invasivas.

3. Metodologia

3.1. Desenho experimental

O trabalho experimental foi efetuado num sistema fechado com recirculação de água formado por três subsistemas cada um com três réplicas, sendo estas pequenos aquários (25 x 30 x 30 cm) de vidro, cada um com 18l de água, estando todos ligados a uma *sump* equipada com um escumador (ReefSet Reef marine tech), um filtro biológico fludizado (V²Bio 600F), um filtro biológico submerso (bio-balls), um filtro mecânico (lã de vidro), um esterilizador U.V. (V²ecton 400), arejamento, bomba de água (AquaBee Up600^{iv}) e dois aquecedores (Aquapor 50W). Este sistema de filtração foi deixado a maturar durante, aproximadamente, três semanas.

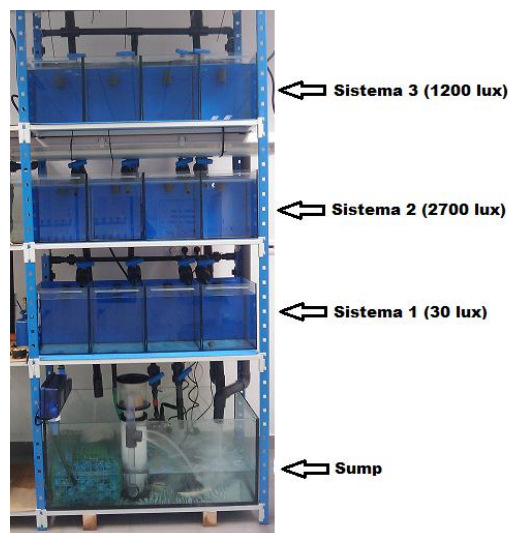


Figura 5 - Sistema de aquários onde se realizou o trabalho experimental

3.2. Manutenção peixes

No início deste trabalho os peixes encontravam-se com 2 meses de idade, um comprimento total de $30,6 \pm 00,6$ mm (média \pm SEM) e um peso húmido de $0,68 \pm 0,05$ g (média \pm SEM), e foram mantidos em grupos de 16 peixes por aquário, durante 12

^{iv} Saída água: 6000 l/h

semanas. Os organismos foram alimentados duas vezes ao dia, com uma mistura de rações comerciais (Anexo A, Tabela 1), até à saciedade. Todos os parâmetros químicos da água foram medidos regularmente com testes rápidos (Api aquarium pharmaceuticals), tendo o oxigénio sido mantido a 7mg/L (97%), a salinidade nos 30 e a temperatura nos 25°C ± 0,2 (média ± SEM). Usaram-se lâmpadas Sylvania (standard F36W/54-785) sobre cada subsistema de modo a conseguir-se três intensidades luminosas diferentes, baixa (31 lux), média (1200 lux) e alta (2700 lux), e um fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro.

3.3. Medição de tamanho

No início da experiência, todos os peixes foram anestesiados com 2-Fenoxietanol, numa concentração de 0,5ml/l de água, medido o seu comprimento total com uma régua e pesados numa balança, sendo este processo repetido na 5ª semana e no final da experiência.

3.4. Medição de coloração

Na primeira semana foram anestesiados com 2-Fenoxietanol e depois medida a sua coloração entre as duas primeiras bandas brancas (Fig. 6 A), de todos os animais, com um colorímetro (Konica minolta Chroma meter CR-400). Este processo repetiu-se na 5ª semana do estudo e depois quinzenalmente. No final da experiência foram colhidos 8 animais, de forma aleatória, de cada aquário, sendo estes acondicionados em sacos plásticos com 1/3 de água e 2/3 de ar, colocados dentro de uma caixa de esferovite e transportados até ao Departamento de Biologia, na Universidade de Aveiro, onde foram anestesiados novamente com 2-Fenoxietanol e medida a sua coloração, em 3 locais (Fig. 6 B), com um espectroradiómetro (KL 2500 LCD schott). No final do ensaio foram selecionados três peixes^v, com a coloração desejada (Figura 7) para servirem de padrão, e foi-lhes medida a coloração de forma semelhante aos peixes do estudo, tanto com o colorímetro como com o espectroradiómetro.

^v Proveniência: empresa Opérculo

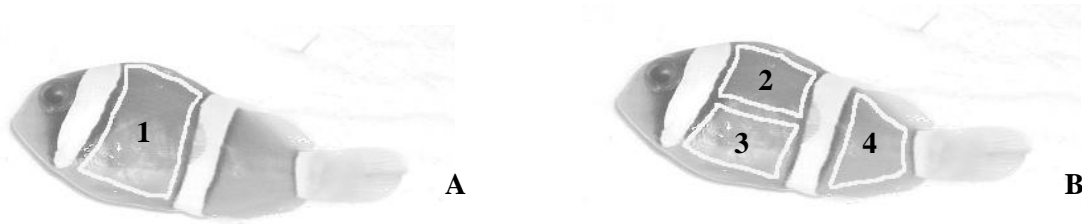


Figura 6 - Esquema das zonas analisadas nos peixes com o colorímetro (A) e com o espectrorradiômetro (B). Zona 1: dorsoventral; Zona 2: dorso; Zona 3: ventre; Zona 4: cauda



Figura 7 - Peixes usados como padrão (*Amphiprion clarkii*)

Na avaliação da cor foram ainda analisados parâmetros como a saturação, a tonalidade e a variação total da cor, utilizando as seguintes equações:

Saturação (Drlange, 1994):

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Tonalidade (Drlange, 1994):

$$\text{°}h = \frac{\arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right)}{6,2832 \times 360} \quad \text{se } a > 0 \text{ e } b > 0$$

Variação total da cor (Drlange, 1994):

$$TCD = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Onde:

$$\Delta L^* = L^* - L_0^* \quad L_0^* = \text{amostra sem tratamento}$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^* \quad a_0^* = \text{amostra sem tratamento}$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^* \quad b_0^* = \text{amostra sem tratamento}$$

3.5. Análise estatística

A análise dos resultados foi efetuada através do software GraphPad Prism5 e os testes estatísticos pelo software GraphPad InStat 3, pela análise de variância One-way ANOVA, seguido do teste Dunnett (Zar, 2009) e pelo software SPSS Statistics 18, pela análise Repeated Measures ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$) ou ao nível de 1% ($p < 0,01$).

4. Resultados

4.1. Avaliação da intensidade luminosa no crescimento

A diferente intensidade luminosa a que os peixes foram sujeitos pode provocar índices de *stress* distintos, com eventuais consequências para a componente nutricional dos animais (Puvanendran e Brown, 1998). Deste modo decidiu-se avaliar estas eventuais alterações pela análise do tamanho dos animais em comprimento (mm) e em peso (g) ao longo do tempo. Todos os peixes foram medidos e pesados sempre com o mesmo critério, a mesma régua e a mesma balança.

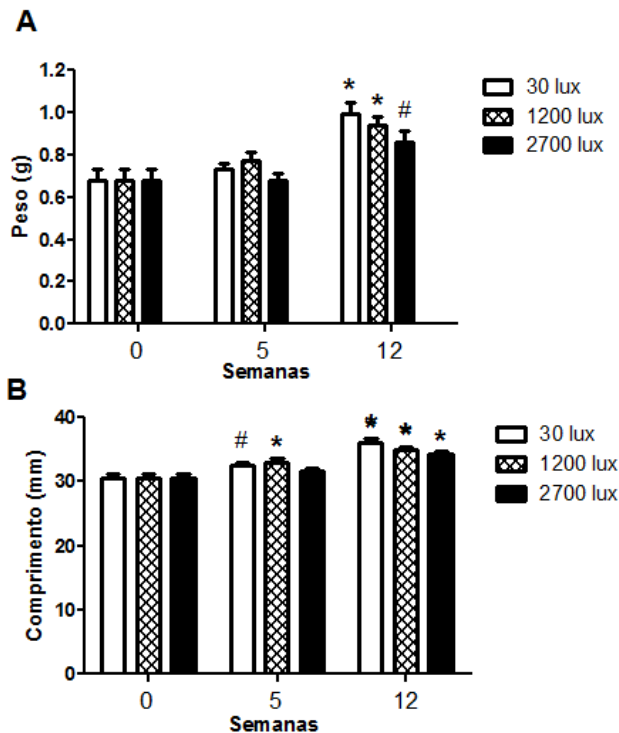


Figura 8 – Peso (A) e comprimento (B) dos peixes nos 3 sistemas ao longo do tempo de estudo. Cada coluna representa a média de avaliações entre 18 a 47 peixes. As linhas verticais indicam o SEM. * $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor observado no controlo (tempo 0).

Como é possível observar, todos os animais cresceram independentemente da intensidade luminosa a que estavam expostos, algo que era esperado, uma vez que estes nunca apresentaram problemas na alimentação. A partir da 5ª semana já é possível observar diferenças no comprimento dos peixes do sistema 30 lux e 1200 lux em relação ao seu

tamanho inicial (Figura 8B), acentuando-se estas diferenças na 12^a semana e alargando-se ao sistema 2700 lux. Em relação ao peso (Figura 8A), as diferenças aparecem em todos os sistemas, mas surgem apenas na 12^a semana.

4.2. Avaliação da intensidade luminosa na cor (sistema L*a*b*)

Recorrendo ao colorímetro conseguiu-se obter os valores de L*a*b*, com os quais é possível observar rapidamente se os peixes se encontram mais escuros, mais vermelhos ou amarelos. Inicialmente os peixes apresentavam valores médios para L*, a* e b* de 39.92, 3.06 e 22.45, respetivamente.

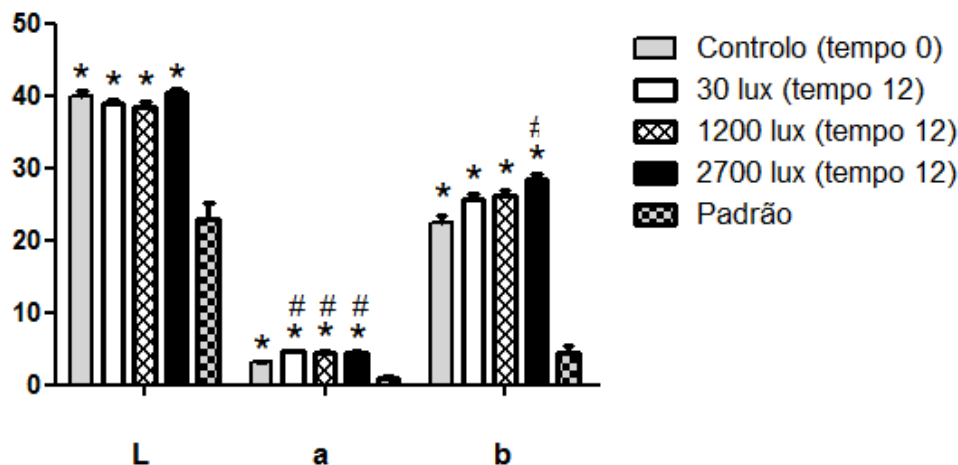


Figura 9 – Variação da cor (L*, a* e b*) ao longo do tempo de estudo. Cada coluna representa a média de avaliações entre 18 a 47 peixes. As linhas verticais indicam o SEM. *p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor observado nos peixes padrão, #p<0,05 representa diferenças significativas em relação ao controlo.

Através da Figura 9 é possível observar que existe uma grande diferença em relação aos peixes padrão e os peixes em estudo. Havendo diferenças significativas entre o padrão, os peixes em estudo no início da experiência e todos os sistemas na 12^a semana, nas três componentes de cor avaliadas (L*, a* e b*). Em relação a L* não existem diferenças entre o controlo (tempo 0) e a 12^a semana. Pelo contrário, é possível observar um aumento nos valores de a* ao longo do tempo, para todas as intensidades luminosas. E para b* parece existir uma tendência para o aumento deste com o aumento da intensidade luminosa, havendo diferença entre o controlo e o sistema 2700 lux na 12^a semana.

4.2.1. Análise da Saturação

Para calcular a saturação apenas se utilizam os valores de a^* e b^* de forma a observar a pureza da cor, utilizando a fórmula indicada na secção dos métodos. Através desta pôde-se calcular os valores absolutos da saturação para os três sistemas, que representam no final do estudo valores de 26,14 para o sistema 30 lux, 28,82 para o sistema 2700 lux e 26,59 para o sistema 1200 lux. Inicialmente a saturação apresentava um valor médio de 24.33.

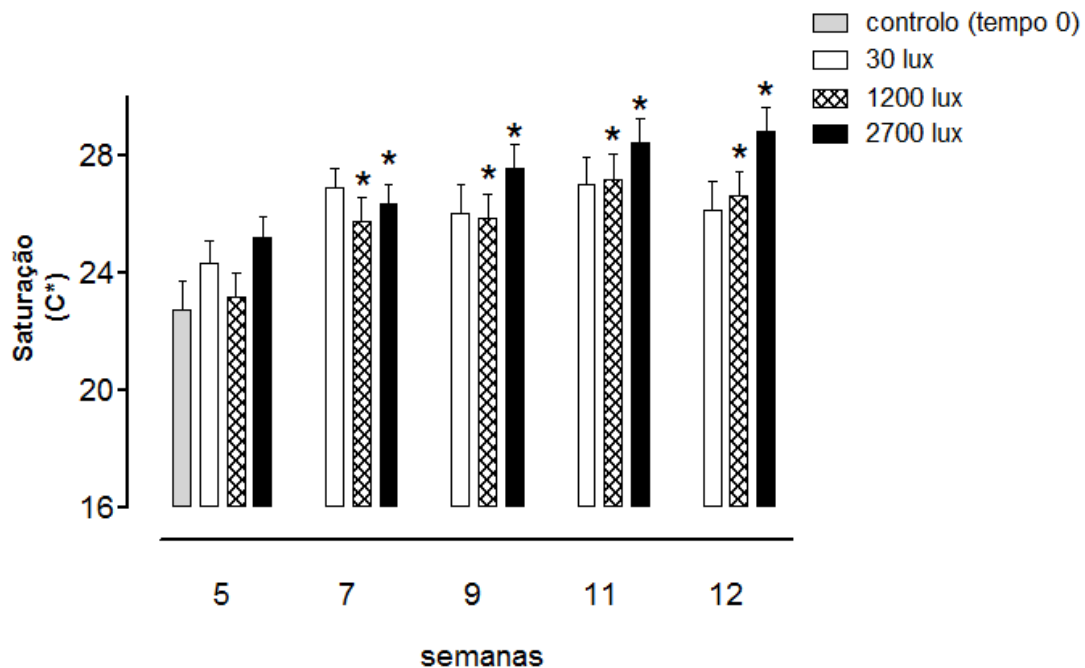


Figura 10 - Variação da saturação da cor ao longo do tempo de estudo. Cada coluna representa a média de avaliações de 18 a 47 peixes. As linhas verticais indicam o SEM. * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor observado no controlo

Pela análise da Figura 10 é possível observar que existem alterações na saturação ao longo do tempo. A partir da 7ª semana são visíveis alterações nesta nos sistemas com 1200 e 2700 lux, mantendo-se até à 12ª semana. Revelando ambos os sistemas uma tendência para aumentar.

4.2.2. Análise da Tonalidade

A tonalidade da cor é outra das componentes avaliadas nos ensaios de avaliação da cor. Deste modo, resolvemos avaliar este parâmetro recorrendo à utilização da equação apresentada na secção dos métodos.

Pela realização desta análise foi possível visualizar que a tonalidade no início do ensaio era de 81,82 e no final era de 79,57 para o sistema 30 lux, de 79,95 para o sistema 1200 lux e de 80,8 para o sistema 2700 lux, valores muito próximos dos dados iniciais.

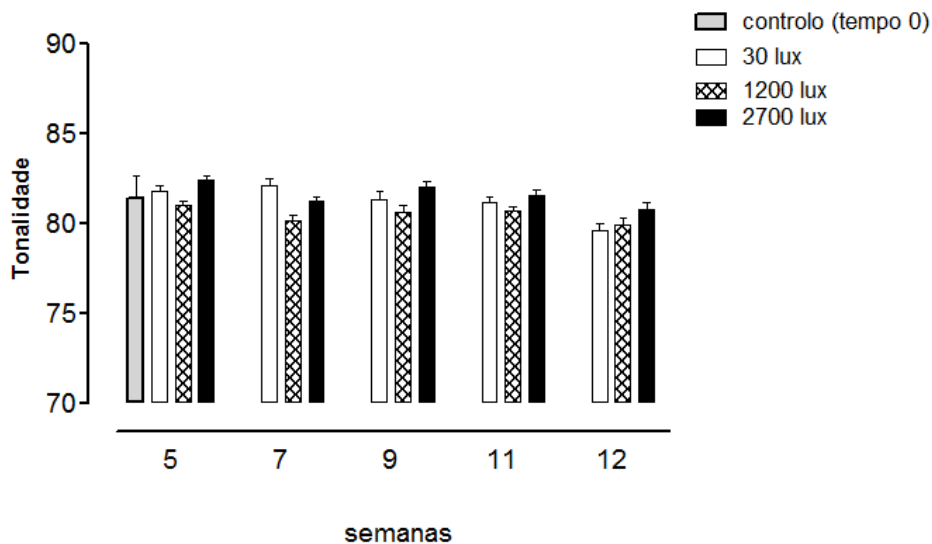


Figura 11 - Variação da tonalidade da cor ao longo do tempo de estudo. Cada coluna representa a média de avaliações de 18 a 47 peixes. As linhas verticais indicam o SEM.

Pela análise da Figura 11 não existem alterações na tonalidade ao longo do tempo, sendo este resultado independente da intensidade luminosa.

4.3. Análise da variação da L, a, b e variação total da cor

Outro dado que pode ser estudado através da leitura do $L^*a^*b^*$ é a diferença total de cor, onde entram as três variáveis em estudo, tal como mencionado na secção métodos.

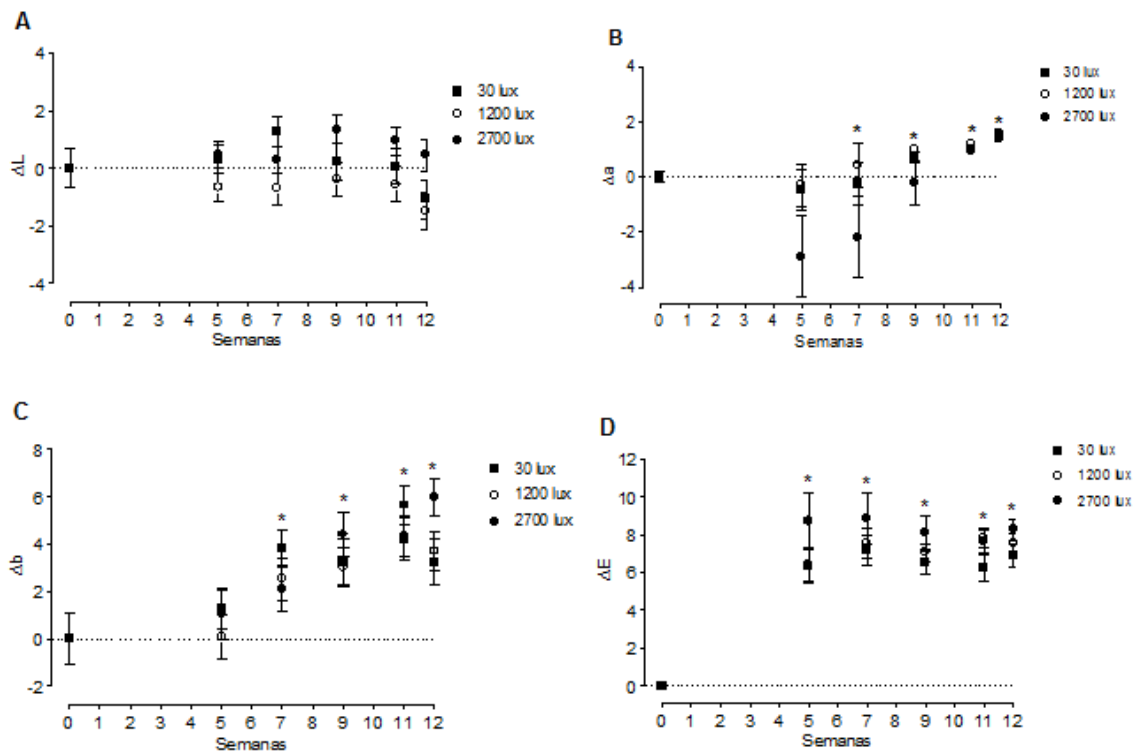


Figura 12 - Variação da cor ao longo do tempo de estudo. Cada símbolo representa a média de avaliações de 18 a 47 peixes. As linhas verticais indicam o SEM. * $p < 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. A: variação de cor em L^* ; B: variação de cor em a^* ; C: variação de cor em b^* ; D: variação total de cor

Através da Figura 12 é possível observar que a variação de L^* ao longo do tempo é praticamente inexistente para os três sistemas. Parece haver uma tendência para o aumento de Δa^* , existindo diferenças quando se compara o controlo (tempo 0) com o sistema 30 lux na semana 7, 11 e 12, o sistema 1200 lux a partir da 7ª semana e no sistema 2700 lux na 11ª e 12ª semana. Existe uma tendência para o aumento de Δb^* ao longo do tempo, mas parece que esta é independente da intensidade luminosa, uma vez que este aumento é muito semelhante em todos os sistemas, havendo diferenças entre o controlo e sistema 30 lux na 7ª e 11ª semanas, o sistema 1200 lux a partir da 9ª semana e no sistema 2700 lux na semana 11 e 12. Em relação a ΔE há diferenças entre o controlo e todos os sistemas em todas as semanas. No entanto, não existem diferenças entre os três sistemas em estudo, mantendo-se este parâmetro quase constante ao longo do tempo.

4.4. Análise dos dados de refletância

Com os dados obtidos no espectroradiômetro foi possível desenhar curvas de refletância, que vão desde os 350 – 1050 nm. Através da análise destes resultados (Figura 13) é possível observar que em todos os sistemas as curvas são muito semelhantes.

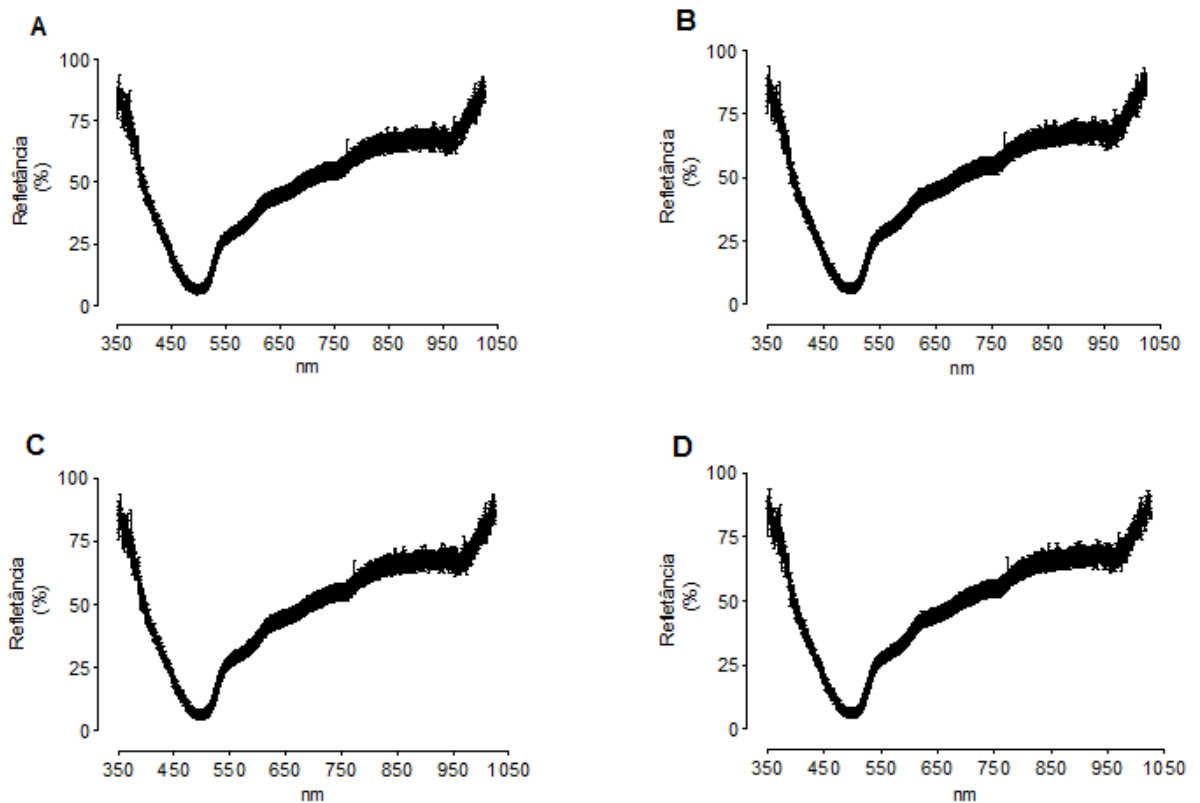


Figura 13 – Curvas de refletância (%) obtidas com o espectroradiômetro para o sistema de 30 lux (A), 1200 lux (B), 2700 lux (C) e peixes padrão (D). Cada ponto representa a média de avaliações de 16 a 24 peixes e as linhas verticais indicam o SEM.

De forma a analisar-se com mais detalhe as curvas de refletância reduziu-se a zona de estudo entre os 500-700nm, onde se incluem os amarelos (565-590 nm) e os vermelhos (630-780)^{vi}. Deste modo, foi possível calcular a área abaixo das curvas, de forma a detetar pequenas diferenças que podiam existir na região do espetro.

^{vi} Espectro visível – 350 – 700 nm

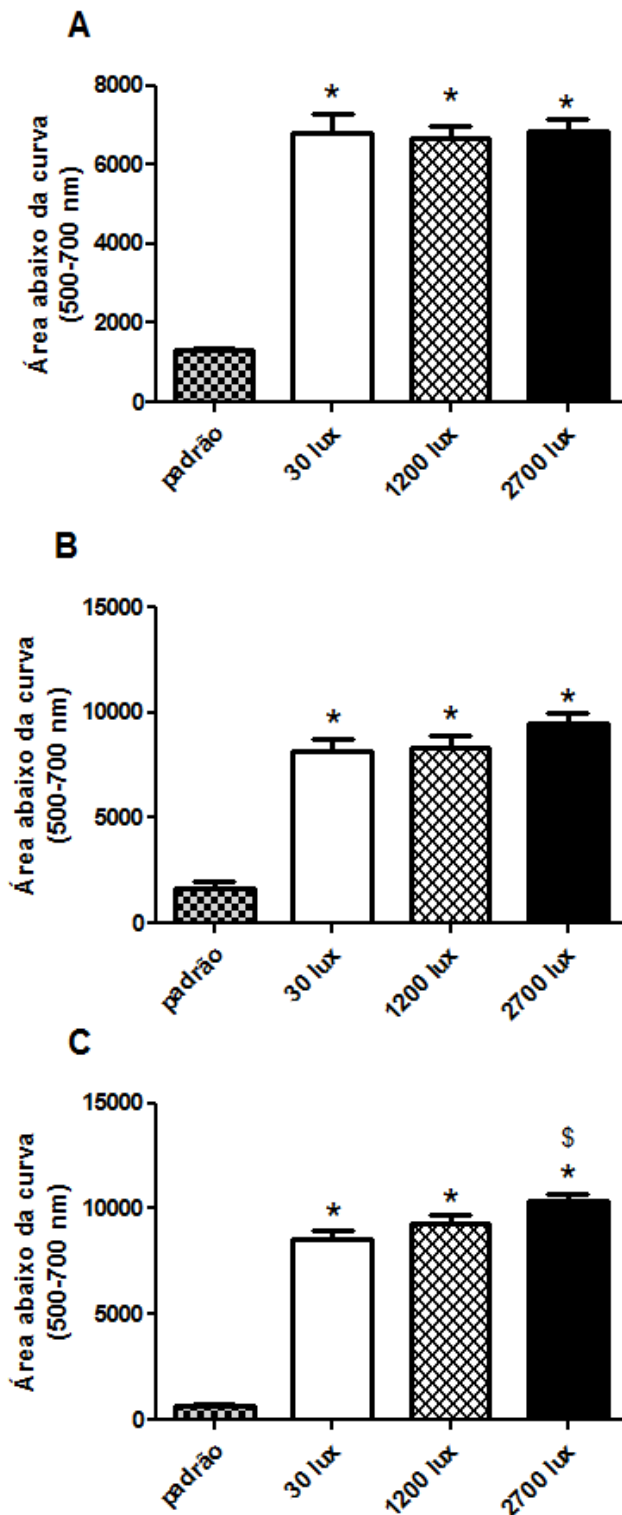


Figura 14 – Áreas abaixo da curva de refletância entre os 500 e os 700nm, nos três sistemas e no padrão na zona peitoral (A), na zona dorsal (B) e na zona caudal (C). Cada coluna representa a média de avaliações de 3 (padrão) 3 47 peixes (sistemas). As linhas verticais indicam o SEM. * $p < 0,01$ representa diferenças estatisticamente significativas em relação aos peixes padrão e \$ $p < 0,01$ em relação aos 30 lux

Através da análise estatística da área abaixo da curva foi possível observar que, tanto na zona dorsal, como ventral e cauda, existem diferenças significativas quando se compara os peixes dos três sistemas com os peixes padrão, tendo estes últimos, uma área abaixo da curva muito menor. Algo que não era facilmente observado na Figura 14. Por outro lado, quando se compara o sistema 30 lux com os outros dois sistemas, apenas existe diferenças quando se compara este com o sistema 2700 lux na zona caudal.

5. Discussão

Todos os peixes usados neste estudo foram alimentados e manipulados de forma semelhante, para que qualquer indução de *stress* provocada fosse sistemática, uma vez que quando se encontram em *stress* os peixes têm tendência a mudar de cor (Yasir *et al*, 2009).

Em relação ao crescimento dos animais, este não parece ser afetado pela intensidade luminosa, uma vez que todos os peixes apresentaram crescimento ao longo do tempo, não existindo diferenças em função da intensidade luminosa. Este resultado demonstra aparentemente, que o fator de *stress* luminoso não altera a ingestão de alimento e a metabolização nutricional do mesmo, algo também referido por Yasir *et al* (2009), que verificou que a luminosidade não afetou o crescimento do falso peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*). No entanto, outros autores relataram que existem espécies de peixes em que a intensidade luminosa afeta o crescimento (Han *et al*, 2005).

Com os dados obtidos no colorímetro é possível observar diretamente os valores de L^* , a^* e b^* e comparar os dados dos peixes padrão com os peixes estudados no tempo 0 e na 12ª semana. Através destes foi possível observar que os peixes padrão são mais escuros, menos amarelos e menos vermelhos que os peixes em estudo. Sendo que o valor de L^* nos peixes estudados manteve-se praticamente inalterável ao longo do tempo, não ficando os peixes mais escuros nem mais claros. Por sua vez, o parâmetro a^* (vermelhos) mostrou uma tendência para aumentar, mas esta parece não ser influenciada pela intensidade da luz, uma vez que os peixes foram mostrando uma tendência para ficarem mais vermelhos ao longo do tempo, de forma homogênea e independente da intensidade luminosa. Por fim, para o parâmetro de cor b^* foi possível observar diferenças entre o controlo e o sistema 2700 lux, embora, no geral, todos os peixes de todos os sistemas se encontrassem mais amarelos no fim do estudo do que no início.

Depois da análise direta dos dados recolhidos com o colorímetro, também foi possível calcular a saturação e a tonalidade da cor dos animais. Sendo que a saturação no início do ensaio era menor, isto é, os animais apresentavam uma coloração menos viva, parecendo haver uma tendência para esta aumentar ao longo do tempo. Principalmente para os sistemas 1200 lux e 2700 lux, que começam a subir na 7ª semana até ao final do estudo.

Pelo contrário, estudos anteriores realizados com peixe-gato chinês (*Leiocassis longirostris*) e dourada-australiana (*Pragus auratus*) onde o aumento da intensidade luminosa ao longo do tempo provocou o escurecimento dos peixes, logo com uma cor menos pura (Booth *et al*, 2004; Han *et al*, 2005). Segundo alguns autores a pigmentação de um peixe é influenciada pela maior ou menor número de melanóforos ou da pigmentação presente nestes. Por outro lado, a alteração da intensidade luminosa pode alterar a morfologia destas células. No entanto, a resposta da cor da pele dos peixes para a intensidade luminosa parece depender da espécie e da idade dos animais (Fuji, 2000; Odiome, 1957). Em relação à tonalidade não existem diferenças estatísticas em relação aos dados iniciais, o que vai de encontro aos dados obtidos por Yasir *et al*, em 2009, onde também não observaram diferenças na tonalidade do falso peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) em função da intensidade luminosa.

Com os dados obtidos pela utilização do colorímetro foi ainda possível calcular a variação dos vários parâmetros de cor ao longo do tempo. Embora se tenha detetado uma tendência para o aumento de Δa^* e Δb^* , esta foi semelhante em todos os sistemas, como tal, não existem alterações na variação total de cor ao longo do tempo, mantendo-se os valores constantes, o que indica que o aumento da intensidade luminosa não faz com que os peixes-palhaço clarkii fiquem mais escuros, pelo menos nas condições experimentais utilizadas. Este resultado, mais uma vez, está de acordo com o descrito por Yasir *et al* (2009), já que este autor também não observou diferenças na tonalidade da cor na pele dos animais, embora tenham encontrado diferenças nas barbatanas quando a intensidade luminosa era mais baixa, o que sugere que as barbatanas do falso peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) são mais sensíveis às alterações de luz do que a própria pele.

Os dados conseguidos com o espectroradiómetro vieram confirmar os dados obtidos com o colorímetro. Para uma observação mais rigorosa efetuou-se uma análise da região visível, não só porque é a zona de interesse para a vertente comercial da aquariofilia, mas também porque os pigmentos encontrados na pele destes peixes, como a astaxantina, melatonina, catanxantina e β -caroteno, absorvem numa zona próxima dos 500 nm (Yasir *et al*, 2009; Kobayashi *et al*, 2010) e também porque é a zona do espectro onde absorvem os amarelos, laranjas e vermelhos (565-700 nm), cor predominante na pele destes peixes (Kobayashi *et al*, 2010; Le *et al*, 2011). A área abaixo da curva dos espectros demonstrou diferenças entre

as 3 zonas analisadas nos peixes padrão e nos peixes de estudo, sendo que os peixes padrão apresentam uma menor área abaixo da curva, em todas as zonas analisadas, do que os outros peixes, mostrando assim que estes são mais escuros uma vez que a quantidade de luz refletida é muito menor. Entre os peixes sujeitos a diferentes intensidades luminosas, apenas existiram diferenças na zona caudal entre o sistema 30 lux e os 2700 lux, ocorrendo uma diminuição da tonalidade “preta”. No entanto, estes dados são contrários aos obtidos por Booth *et al* (2004) e Han *et al* (2005), que observaram o escurecimento das espécies que estavam a estudar com o aumento da intensidade luminosa. Curiosamente, mas apenas na zona caudal, o nosso ensaio mostra que os peixes que se encontravam a uma maior intensidade luminosa encontram-se mais claros. Esta conclusão resulta do facto dos peixes, refletirem mais luz daí terem maior área abaixo da curva de refletância. No entanto, estes resultados não são muito surpreendentes, já que Yasir *et al* (2009) também observou, que quanto menor a intensidade luminosa mais viva era a coloração dos peixes.

6. Conclusão

Ao longo deste trabalho foi possível fazer uma análise detalhada da cor dos peixes-palhaço clarkii sem nunca ter que se recorrer ao sacrifício de qualquer espécime, algo que pode ser muito útil em aquacultura com fins ornamentais, pois o objetivo da produção em cativeiro destes animais é não ter impacto nas populações selvagens, logo quanto menos se sacrificarem, mesmo que em prole da ciência, mais protegidos estes estarão.

Neste estudo observaram-se alterações, independentes da intensidade luminosa, nos valores de a^* e na saturação, encontrando-se os peixes mais vermelhos, com cores mais vivas e definidas. Em b^* parece haver alterações com o aumento da intensidade luminosa mas, no geral, no final do ensaio os peixes encontravam-se mais amarelos. No entanto, não há diferenças na variação total da cor dos animais. Por sua vez, o sistema com maior intensidade luminosa foi o que apresentou peixes com a zona caudal mais clara.

Embora não se tenha observado o escurecimento dos animais com o aumento da intensidade luminosa, o uso do colorímetro e do espectroradiómetro foi um sucesso, pois abre novas portas para estudos da avaliação da cor na área da aquacultura, permitindo a sua realização de um modo não invasivo sem necessidade de sacrificar animais.

7. Perspetivas futuras

Os dados obtidos neste trabalho mostram que a intensidade luminosa parece não afetar a coloração dos peixes-palhaço clarkii, pelo menos nas intensidades testadas e no tempo experimental decorrido. No entanto, este trabalho abre novas oportunidades para a realização de estudos futuros com recursos aos métodos não invasivos utilizados e validados neste trabalho.

No futuro será interessante avaliar o efeito de vários tipos de lâmpadas (fluorescentes, de iodetos metálicos, entre outras), densidades populacionais, substratos e dietas com suplementos de carotenoides, de modo a tentar perceber se algum destes fatores afeta a coloração do peixe-palhaço clarkii.

8. Bibliografia

- 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) – Aquaculture Research, vol.35, pag. 458-464
- Drlange (1994) – Colour review – Drlange Application Report, nº8, US
- Elliott, J.K., Lougheed, S.C, Basteman, B., McPhee, L.K., Boag, P.T. (1999) – Molecular phylogenetic evidence for the evolution of specialization in anemonefishes – The Royal Society, vol.266, pag.677-685
- Ertas, E.; Guler, A.U., Yucel, A.Ç., Koprulu, H., Guler, E. (2006) – Color stability of resin composites after immersion in different drinks – Dental Materials Journal, vol.25, nº2, pag.371-376
- França, K.C. (2007) – Criação de peixes ornamentais – Dossiê Técnico, Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, 17 Dezembro 2007
- Fujii, R. (2000) – The regulation of motile activity in fish chromatophores- Pigment Cell Research, vol.13, pag.300-319
- Gozalo-Diaz, D.J., Lindsey, D.T., Johnston, W.M., Wee, A.G. (2007) – Measurement of color for craniofacial structures using a 45/0-degree optical configuration – The Journal of Prosthetic Dentistry, vol.97, nº1, pag.45-53
- Han, D., Xie, S., Lei, W., Zhu, X., Yang, Y. (2005) – Effect of light intensity on growth, survival and skin color of juvenile Chinese longsnout catfish (*Leiocassis lonirostris* Gunther) – Aquaculture, vol.248, pag.299-306
- Kobayashi, Y., Horiguche, R., Miura, S., Nakamura, M. (2010) – Sex an tissue-specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii* – Comparative Biochemistry and Physiology, part.A, vol. 155, pag.237-244
- Kodoma, G., Anunciação, W.F., Sanches, E.G., Gomes, C.H.A.M., Tsuzuki, M.Y. (2011) – Viabilidade económica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação – Boletim do Instituto de Pescas, vol. 37, nº1, São Paulo, Brasil, pag.61-72
- Le, Y., Sheng-Yun, Y., Xiao-Ming, Z., Min, L., Jing-Yi, L., Kai-Chang, W. (2011) – Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: perciformes) – Acta Ecologica Sinica, vol.31, pag.241-245
- Lin, Q., Lin, J., Huang, L. (2009) – Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810 – Aquaculture, vol.298, pag.157-161
- Melgosa, M. (2000) – Testing CIELAB-based color difference formulas – Color Research and Application, vol.25, Espanha

- Monteiro-Neto, C., Cunha, F.E.A., Nottingham, M.C., Araújo, M^a E., Rosa, I.L. Barros, G.M^aL. (2003) – Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State, northeast Brazil – Biodiversity and Conservation, vol.12, pag.1287 – 1295
- Moorhead, J. A., Zeng, C. (2010) – Development of captive breeding technique for marine ornamental fish: a review – Reviews in Fisheries Science, vol.18, n^o4, pag.315-343
- Nottingham, M.C., Barreto, L.M., Araújo, M.E., Monteiro-Neto, C., Cunha, F.E.A, Rosa, I.M.L., Alencar, C.A.G. (2005) – A exploração de peixes ornamentais marinhos no estado do Ceará, Brasil: capturas e manutenção nas empresas e exportação – Boletim Técnico do CEPENE, vol.13, n^o1, pag.53-73
- Odiorne, J.M. (1957) – Color changes, the physiology of fishes – Academic Press, New York, USA
- 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, vol.42, n^o2, pag.135-166
- Parmentier, E., Colleye, O., Mann, D. (2009) – Hearing ability in three clownfish species – The Journal of Experimental Biology, vol.212, pag.2023-2026
- Puvanendran, V., Brown, J.A. (1998) – Effect of light intensity on the foraging and growth of Atlantic cod larvae: interpopulation difference? – Marine Ecology, Progress Series, vol.167, pag.207-214
- Ribeiro, F.A., Preto, B.L., Fernandes, J.B.K. (2008) – Sistemas de criação para o acará-bandeira (*Pterophyllum salare*) – Acta Scientiarum, Animal Sciences, vol.30, n^o4, pag.459-466
- Singh, B., Parwate, D.V., Shukla, S.K. (2009) – Radiosterilization of fluoroquinolones and cephalosporins: assessment of radiation damage on antibiotics by changes in optical property and colorimetric parameters – AAPS PharmSciTech, vol.10, n^o1
- Thlusty, M. (2004) – Small scale of production does not automatically mean small scale of impact – Ornamental Aquaculture, OFI Jornal, vol.46, Boston, USA
- Wee, A.G., Lindsey, D.T., Kuo, S., Johnston, W.M. (2006) – Color accuracy of commercial digital cameras for use in dentistry – Dental Materials 22, pag.553-559
- Yasir, I., Qin, J.G. (2009) – Effect of light intensity on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier – Jornal of the World Aquaculture Society, vol.40, n^o3
- Zar, J.H. (2009) – Biostatistical Analysis – Prentice Hall, 5^a ed.

Sites consultados:

<http://www.fishbase.org/summary/Amphiprion-clarkii.html>, consultado em 4 Agosto 2011

Anexo

Anexo A – Composição da ração

Tabela 1 – Rações, porções e composição da dieta usada para alimentar os peixes

Marca	Porção	Componentes	Quantidade (%)
Ocean nutrition Formula one Marine pellet small	1/2	Proteína	41,1 (min.)
		Gordura	9 (min.)
		Fibra	2,4 (max.)
		Humidade	14,5 (max.)
		Cinza	10,5 (max.)
Ocean nutrition Formula two Marine pellet small	1/2	Proteína	38,1 (min.)
		Gordura	9,7 (min.)
		Fibra	2,8 (max.)
		Humidade	14,5 (max.)
		Cinza	10,5 (max.)