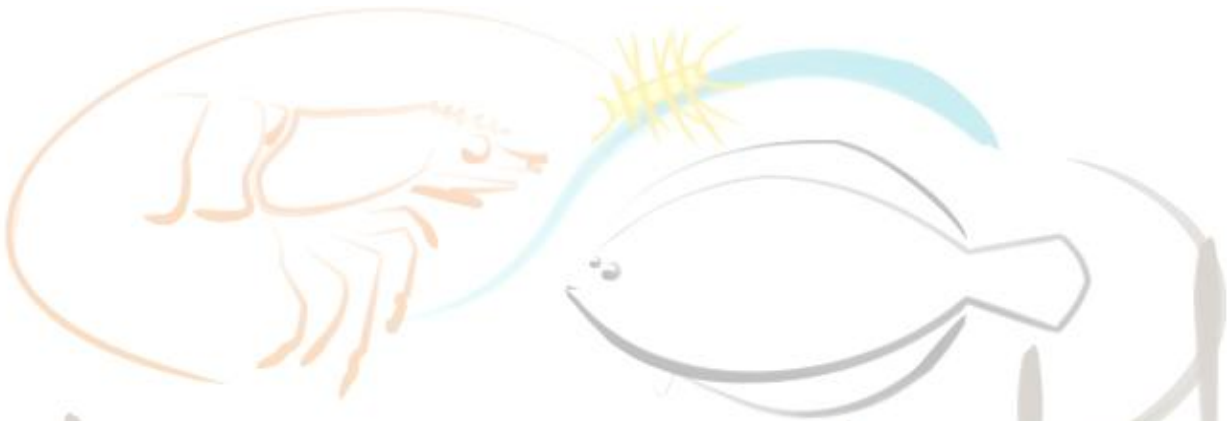




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE JUVENIS DO PEIXE-PALHAÇO
Amphiprion ocellaris VARIEDADE “BLACK” CRIADO EM ÁGUA MARINHA
ARTIFICIAL

MARIO DAVI DIAS CARNEIRO

FURG
RIO GRANDE, RS
JULHO, 2015

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Oceanografia

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE JUVENIS DO PEIXE-PALHAÇO
Amphiprion ocellaris VARIEDADE “BLACK” CRIADO EM ÁGUA MARINHA
ARTIFICIAL

MARIO DAVI DIAS CARNEIRO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. Luís André Sampaio

Co-orientador: Dr. Ricardo Viera Rodrigues

Rio Grande -RS- Brasil

Julho, 2015

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Aquicultura ornamental no mundo e no Brasil	1
1.2 Pomacentrideos e Amphiprioninae	3
1.3 <i>Amphiprion ocellaris</i> , variedade “Black”	3
1.4 Benefícios da produção de peixes marinhos ornamentais.....	4
1.5 Peixes-palhaço e sua produção.....	5
1.6 Possibilidades da produção de peixes ornamentais marinhos longe do litoral	5
1.7 Bem estar fisiológico e seus indicadores para peixes	7
1.8 Referências Bibliográficas	8
2. OBJETIVOS.....	14
3. CAPÍTULO 1: Efeitos da salinidade sobre juvenis do peixe-palhaço <i>Amphiprion ocellaris</i> variedade “Black” criado em água marinha artificial.....	15
3.1 Introdução	15
3.2 Material e Métodos	17
3.3 Resultados	21
3.4 Discussão	30
3.5 Conclusão.....	33
3.6 Referências Bibliográficas	33
4. CONCLUSÕES GERAIS	38

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos aqueles que se felizmente se surpreendem com inicialmente impossível de se realizar, que enfrentam as dificuldades e demonstram poder superá-las.

Logo dedico aos meus amigos, que assim como eu superaram e superam inúmeros desafios para alcançar seus objetivos e que ainda me auxiliaram para que eu cumprisse os meus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus força a que muitos agregam outros nomes, mas que independente de nomenclaturas possibilita acreditar e realizar o que pode, ou não, ser metodicamente comprovado.

Minha gratidão eterna a meus pais Maria Mirian Lima Dias Carneiro e Daniel Ferreira Carneiro por todos os auxílios que sempre se esforçaram a me prestar. As minhas irmãs Dayana Dias Carneiro e Laura Dias Carneiro que me apoiaram e incentivaram.

Agradeço a todos os minhas amigas e amigos Paulistanos, Uruguaienses, Rio-Grandinos ou de outras localidades que estiveram comigo durante meu período de Mestrado e mais ainda por inúmeros outros momentos na minha vida, ressaltando Atila Clívea Martins, Thamyres Vanessa, Helena Kumeda, Rafael Medeiros, Ricardo Rodrigues, Jéssica Teske, Camila Besold, Bianca Lopez, Flávia Marin, Keli Wrany, Diogo Alcantara, Marcelo Okamoto, Ivanildo Silva e Janaína Pedron que me auxiliaram nos procedimentos desta dissertação e/ou no manejo dos ornamentais.

A galera itinerante do ALOJAMENTO.

Agradeço a cidade de Rio Grande e a Estação Marinha de Aquicultura por ter me acolhido durante esta experiência.

Ao grupo de Jovens CRISTIFIQUE, sal da terra e luz do mundo em muitos momentos.

Em especial aos Professores Dr. José Maria Monsserat pelo imenso apoio e Dr. Luis André Nassr de Sampaio e Ricardo Vieira Rodrigues por aceitar orientar e co-orientar este trabalho.

Ao corpo docente, técnico e discente do Programa de Pós Graduação em Aquicultura, por todos os ensinamentos específicos, lições de vida e exemplos de como agir ou não agir.

RESUMO

O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* é um peixe ornamental marinho. Esta é uma espécie comum na aquariofilia e sua tecnologia de produção é simples. Uma vez que a produção de espécies ornamentais requer menor volume de água do que espécies de corte, a produção de espécies ornamentais marinhas pode ser feita mais facilmente em regiões distantes do litoral, utilizando sistemas de recirculação de água (SRA) e água marinha artificial. Nos últimos anos houve uma diminuição nas exportações e aumento do valor de importações de peixes ornamentais no Brasil, isso reforça o potencial e a necessidade da criação de peixes ornamentais no país. O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho, as respostas de estresse oxidativo e os custos de produção de juvenis de *A. ocellaris* em baixa salinidade, utilizando água salinizada artificialmente. Os juvenis foram criados por 60 dias em quatro SRA com água marinha artificial nas salinidades 5, 15, 25 e 35‰. Todos os peixes morreram na menor salinidade, mas as sobrevivências foram acima de 90% para as demais salinidades testadas. Nenhuma diferença foi encontrada para crescimento e demais parâmetros zootécnicos observados, mas o número de ionócitos aumentam a medida que se eleva a salinidade. A atividade da GST (Glutathione S-Transferase) foi significativamente menor na salinidade 25‰, mas não foram observadas diferenças para ACAP (Capacidade total frente a um radical peroxil) e TBARS (lipoperoxidação) entre as salinidades. Os custos de produção referentes a salinização é reduzida em 57% para os peixes produzidos a 15‰ quando comparados com 35‰. Um segundo experimento avaliou a sobrevivência e as respostas de estresse oxidativo para juvenis de *A. ocellaris* submetidos ao choque salino. Os peixes foram transferidos de 15 para 35‰ e não foram observadas mortalidades após um período de 7 dias. TBARS e GST não foram afetados pelo choque salino, mas a ACAP aumentou 1h depois da transferência de 15 para 35‰ e continuou elevada. Os resultados deste estudo demonstram que a produção de juvenis de *A. ocellaris* tem menor custo na salinidade 15‰ e esta não causa problemas relacionados a sobrevivência, crescimento ou respostas de estresse oxidativo.

Palavras-chave: crescimento; estresse oxidativo; ionócitos; SRA; salinização

ABSTRACT

The clownfish *Amphiprion ocellaris* is an ornamental marine fish. It is a common species in the aquarium industry and rearing technology is simple. Since the production of ornamental species requires a smaller volume of water than that of table fish, the production of marine ornamental species can be done more easily inland, using recirculating aquaculture systems (RAS) and artificial seawater. In recent years, there was a reduction on exports and an increase on imports of ornamental species into the Brazilian market, which favors the development of the local ornamental aquaculture industry. The objectives of this work were to evaluate the performance, oxidative stress responses, and the cost of production of juvenile *A. ocellaris* reared in low salinity, using artificial seawater. Fish were reared for 60 days in four RAS at different salinities: 5, 15, 25, and 35‰. All fish died at the lowest salinity, but survival was above 90% for all other salinities tested. There was no significant difference for growth, but the number of ionocytes increased with salinity. The activity of Glutathione S – Transferase (GST) was significantly lower at 25‰, but no significant differences were observed for lipoperoxidation measured by TBARS and ACAP (total antioxidant competence against peroxy radicals) among salinities. The production costs related to artificial seawater were reduced by 57% for fish reared at 15‰ compared to fish reared at 35‰. A second experiment evaluated survival and oxidative stress responses of juvenile *A. ocellaris* submitted to acute saline shock. Fish were transferred from 15 to 35‰ and no mortalities were observed after 7 days. TBARS and GST were not affected by the saline shock, but ACAP was improved 1h after the transference from 15 to 35‰ and remained elevated thereafter. The results of this study reveal that production of juvenile *A. ocellaris* has a lower cost at 15‰ and in this condition there are no problems related to survival, growth, and oxidative stress responses.

Keywords: growth; ionocytes; oxidative stress; RAS; salinity

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquariofilia é um dos ramos da aquicultura no qual é feita a produção de organismos para uso ornamental, que embora não tenha um elevado volume de comercialização, tem um alto valor agregado (FAO, 2014). Considerando que a legislação brasileira trata qualquer peixe como ornamental desde que sua produção tenha esta finalidade (IBAMA, 2008), podemos inferir que a aquariofilia, ou aquarismo, é a atividade de manter peixes e demais organismos aquáticos em ambientes limitados pessoais ou públicos que possuam o intuito de ornamentar, decorar, trazer conhecimentos e/ou consciência ambiental. Segundo LIMA et al. (2001), o nascimento da aquariofilia ocorreu em 1596, quando o chinês Chang Chi'em-Tê escreveu um livro intitulado Chu Sha YuP'u, que significa Livro do Peixe Vermelho, onde o autor descreveu os manejos realizados em seu "aquário". Os mesmos autores relatam estudos que indicam o início da atividade no Brasil em 1922, quando japoneses apresentaram aquários ornamentais simulando os jardins da cultura oriental no estado do Rio de Janeiro durante uma exposição. Entretanto, foi em 1926 que teve início a piscicultura ornamental no país, quando Shigueiti Takase trouxe peixes ornamentais da Ásia (LIMA et al., 2001).

1.1 Aquicultura ornamental no mundo e no Brasil

Segundo RIBEIRO (2007), o setor de peixes ornamentais é um componente significativo do comércio internacional, sendo que a importância desta indústria está no grande potencial em contribuir para o desenvolvimento sustentável de recursos aquáticos. A criação peixes ornamentais está entre os setores mais lucrativos da piscicultura, pois a atividade representa uma opção com custo de implantação relativamente baixo, e elevada rentabilidade para piscicultores familiares, servindo como possibilidade de melhoria da situação econômica (REZENDE, 2010).

A maioria das espécies ornamentais comercializadas no mundo tem os Estados Unidos como destino, seguido pela Europa e Japão (SMITH et al., 2008; RHYNE et al., 2012). Ainda segundo esses autores, mais de um bilhão de animais vivos foram importados pelos Estados Unidos entre os anos 2000 e 2005, dos quais 60% eram aquáticos, majoritariamente representados por peixes, que quando classificados corretamente em espécies tropicais (87,5% no ano de 2005) estavam divididos em marinhos (42,1%) e de água doce (45,4%), sendo 97,6% dos organismos marinhos selvagens. O Sudeste Asiático, Oceania, Norte da América do Sul e Trinidad e Tobago são os locais de origem mais comuns das importações para

33 aquarismo. Foi registrado o ingresso de mais de 11 milhões de peixes marinhos nos Estados
34 Unidos em 2004 e 2005, representantes de 1802 espécies de 125 famílias (RHYNE et al.,
35 2012).

36 Relacionando os anos de 2008 e 2009, o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA)
37 observou uma diminuição da exportação de peixes ornamentais em 26% do volume e aumento
38 do faturamento em 25%. Assim este bem apresentou aumento médio no preço de 69%, e por
39 não ter um produto similar, demonstra ser de demanda inelástica, ou seja, os valores de venda
40 não exercem tanta influência sobre a quantidade comprada. Quanto à importação de peixes
41 ornamentais, em 2009 o Brasil aumentou suas compras em 28% em quantidade e 11% em
42 valor (MPA, 2013). Esses dados ilustram o potencial que o aquarismo demonstra e a
43 necessidade do aumento da produção brasileira de organismos ornamentais.

44 A expansão da aquariofilia no Brasil favoreceu o desenvolvimento de novos polos de
45 piscicultura ornamental, que se tornaram mais expressivos a partir da década de 1980, com
46 destaque para Muriaé/MG, Mogi das Cruzes/SP, Magé/RJ, Recife/PE, Salvador/BA,
47 Fortaleza/CE e Cascavel/PR, onde quase a totalidade dos produtores tem o perfil de agricultor
48 familiar (REZENDE, 2010). LIMA (2010) diz que alguns estados estão aprimorando a
49 produção de peixes-palhaços em produções particulares na Bahia, Pernambuco, Paraná, Rio
50 de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, incitando a necessidade de maiores informações
51 produtivas sobre a espécie. A produção de peixes ornamentais marinhos é interessante,
52 servindo como um produto alternativo e de maior valor agregado aos pequenos produtores e
53 indústrias do ramo distantes do litoral, sendo que DHANEESH et al. (2012) afirmam que
54 considerações econômicas sobre a aquicultura de espécies de água marinha ou estuarina
55 poderiam ser um atrativo as de água doce. Para isso, além da salinização, é importante a
56 utilização de sistemas de recirculação de água (SRA).

57 A utilização de sistemas de recirculação tem crescido nos últimos 30 anos graças às
58 pesquisas e produções comerciais que utilizam este sistema em suas atividades (TIMMONS
59 & EBELING, 2010). Segundo os mesmo autores, sistemas de recirculação possuem uma série
60 de vantagens frente a outros regimes de produção aquícolas como a economia de água graças
61 a filtragem biológica, maior controle das variáveis abióticas, menor risco de escape de
62 espécies exóticas ou geneticamente modificadas, menor vulnerabilidade a doenças, maior
63 produtividade, além de permitir a produção em locais de clima inicialmente inadequado para
64 determinada espécie, ou no caso específico da produção de peixes ornamentais marinhos,
65 longe do litoral.

66 **1.2 Pomacentrideos e Amphiprioninae**

67 A Família Pomacentridae, pertencente à Ordem dos Perciformes, é a mais explorada
68 no mundo, sendo desta os cinco maiores representantes marinhos que somam 76% do número
69 de peixes ornamentais importados para os Estados Unidos. (RHYNE et al., 2012) Os mais
70 populares representantes desta Família pertencem a Subfamília Amphiprioninae, que possui
71 30 espécies (THORNIHIL, 2012) divididas em dois gêneros, *Amphiprion* e *Premnas*,
72 respectivamente com 29 e uma espécie. Estas espécies habitam recifes da região oeste dos
73 oceanos Índico e Pacífico. No Índico desde a costa oeste da África, Mar Vermelho até as Ilhas
74 do Pacífico aonde sua distribuição vai do norte de Tóquio, Japão até o sudoeste australiano
75 (THORNIHIL, 2012; FAUTIN & ALLEN, 1992). Para melhor classificação, os peixes dessa
76 Subfamília estão divididos em seis grupos ou complexos, que possuem comportamento e
77 morfologia similares. Estes grupos são o Complexo Tomato; o Complexo Clarkii; o
78 Complexo SaddleBlack; o Complexo Percula; o Complexo Skunk e o Complexo Maroon
79 (BRIGHTWELL, 2006).

81 **1.3 *Amphiprion ocellaris*, variedade “Black”**

82 Dentre os representantes da Subfamília Amphiprioninae, existe uma que se destaca no
83 mercado ornamental, o *Amphiprion ocellaris*, popularmente conhecido como falso peixe-
84 palhaço, peixe-anêmona e nas últimas décadas como “Nemo”. Esta espécie é de coloração
85 geralmente laranja brilhante, possui três bandas brancas circundadas de estreitas linhas pretas
86 e 11 (raramente 10) espinhos na nadadeira dorsal (FAUTIN & ALLEN, 1992).

87 Existem, segundo TIMM & KOCHZIUS (2008), quatro clãs genéticos de falsos
88 peixes-palhaço, que se distribuem sobre a região oeste dos oceanos Índico e Pacífico de
89 acordo com as marés e seu período larval planctônico. Além de clãs genéticos, essa espécie de
90 peixe-palhaço é a única onde ocorre naturalmente o melanismo (FAUTIN & ALLEN, 1992;
91 MADHU & MADHU, 2007). Este melanismo confere ao peixe tonalidades negras ou
92 marrons nas partes comumente pigmentadas de tons laranja. As variedades melânicas de *A.*
93 *ocellaris* tem distribuição geográfica específica, assim segundo MADHU & MADHU (2007),
94 os falsos peixes-palhaço marrons ocorrem no litoral de duas ilhas indianas, Andaman e
95 Nicobar, e os totalmente pretos na província de Darwin, Austrália (FAUTIN & ALLEN,
96 1992). Apesar de natural, o melanismo passa ser uma característica peculiar da espécie
97 tornando as variedades preta ou “Black” e marrom ou “Brownish” mais raras e com maior
98 valor de mercado. Segundo GOUVEIA & REMA (2005), a cor desempenha um importante

99 papel na aceitação do peixe e além da forma, tipo de nadadeira e tamanho é um fator que afeta
100 o preço de mercado. De fato, essas variedades chegam a custar duas ou três vezes mais do que
101 o falso peixe-palhaço laranja, assim além de representar uma diversidade de mercado, as
102 variedades podem melhorar os ganhos produtivos.

103

104 **1.4 Benefícios da produção de peixes marinhos ornamentais**

105 Os ambientes de recife, além de expor grande diversidade biológica, servem como
106 fonte de alimento, abrigo e local de reprodução, e embora ele ocupe menos de 1% da área dos
107 oceanos são responsáveis por mais de 25% da diversidade das espécies marinhas
108 (THORNHILL, 2012), sendo desse habitat extraídos a maioria dos organismos ornamentais.
109 Estima-se que aproximadamente 11 milhões de peixes são retirados por ano dos recifes para
110 fins de ornamentação (RHYNE et al., 2012). Este dado é bastante alarmante, pois embora se
111 conheça a técnica de reprodução de peixes-palhaço em cativeiro, tem ocorrido uma
112 diminuição de seus estoques naturais devido a exploração dos espécimes (WABNITZ, 2003),
113 e que a aquariofilia marinha se baseia em apenas 5% de organismos produzidos em cativeiro
114 (THORNHILL, 2012). Este fato, somado ao que a indústria movimenta milhões de dólares,
115 cria uma atmosfera bastante favorável para a criação em cativeiro.

116 Uma das questões que podem ser levantadas quanto à aquariofilia, principalmente de
117 espécies exóticas, é o risco de fuga e estabelecimento da espécie no ambiente. Episódios
118 problemáticos com espécies exóticas podem ser vistos na Costa do Atlântico com a presença
119 do peixe-leão (LUIZ et al., 2013), que também já foi documentado no Brasil. Porém este risco
120 é menor em sistemas de recirculação e, sobretudo em regiões distantes do litoral.

121 Ao longo dos anos, a partir de cruzamentos e manejos, foi obtida uma série de
122 variedades criadas em empresas específicas de produção ornamental. Dentre as empresas de
123 produção de peixes-palhaço, pode-se citar a Ora, nos Estados Unidos, que detém uma série de
124 linhagens e variedades que diversificam a quantidade de peixes-palhaço comerciais. Como
125 afirmado para as espécies melânicas, sem entrar em méritos éticos de produção destas
126 variedades, é inegável salientar que elas possuem um maior valor de mercado, e chamam a
127 atenção do consumidor pela peculiaridade, desestimulando a exploração e conseqüentemente
128 sendo vantajosas ao produtor.

1.5 Peixes-palhaço e sua produção

Segundo WITTENRICH (2007), a reprodução de peixes-palhaço é realizada desde o início de 1900 obtendo um crescimento comercial na década de 1950 e atualmente é de simples reprodução inclusive para piscicultores ornamentais iniciantes. No Brasil a produção é realizada desde 1984 quando Alceu Roberto Catalo de Castro trouxe para o país exemplares de peixe-palhaço, sendo produzidos na Bahia e vendidos nas regiões Sul e Sudeste, além do próprio estado (LIMA et al., 2010). Podemos considerar frente ao tempo de produtividade de peixes ornamentais dulcícolas, que a atividade produtiva de ornamentais marinhos é recente. Exatamente por este fator, somado a facilidade de criação da espécie, é que cremos ser esta interessante para estudos de produção marinha interiorana, ainda que apesar das facilidades de criação, alguns gargalos ainda precisem ser estudados na produção de peixes-palhaço.

Diversos estudos têm sido realizados para solucionar problemáticas como a coloração do peixe criado em cativeiro em resposta a influência da luminosidade (YASIR & QIN, 2009) e de dietas (YASIR & QIN, 2009; YASIR & QIN, 2010), assim como a necessidade de ácidos graxos na larvicultura (OLIVOTTO, 2011) e estudos de identificação de doenças (PIRARAT et al., 2011). Porém não foram encontrados estudos com salinidade para juvenis em produção. Segundo OLIVOTTO (2011), além da importância para a produção ornamental, o peixe-palhaço *A. ocellaris* deve ser considerado um modelo de estudos fisiológicos pelas facilidades de mantê-lo em laboratório, na larvicultura e alimentação.

1.6 Possibilidades da produção de peixes ornamentais marinhos longe do litoral

Segundo MEDEIROS (2013), as maiores produções de peixe-palhaço do Brasil estão alocadas no estado de São Paulo, sendo bem tímidas e utilizando para sua funcionalidade, água marinha artificial. Esta informação corroborada com o desenvolvimento dos polos de pisciculturas ornamentais brasileiros descritos no item acima e a citação sobre a produção marinha ornamental fora da costa de TLUSTY (2002), levam a crer que ensaios para o aperfeiçoamento das tecnologias de produção distante do litoral são necessários, sendo a salinidade uma questão relevante.

Segundo DHANEESH et al. (2012), estudos de adaptação de peixes-palhaço a salinidade são limitados e embora uma série de estudos sobre o efeito da salinidade no crescimento e sobrevivência de outras espécies de peixes marinhos e dulcícolas tenham sido realizados (SAMPAIO et al., 2002; RESLEY et al., 2006; SAMPAIO et al., 2007; LARUMBE-MORÁN et al., 2010), estes abordam a utilização de NaCl ou diluições de água

162 do mar, logo não estão num contexto de utilização de água marinha artificial. Ao utilizar
163 diferentes sais comerciais, comparando-os com água do mar diluída, foi observado que
164 diferentes sais marinhos influenciaram os resultados de sobrevivência na larvicultura do
165 camarão *Macrobrachium rosenbergii* (COOPER & HEINEN, 1991).

166 Sais marinhos artificiais comerciais são feitos a partir da extração de sais, presentes
167 em maior concentração em água marinha (cloreto e sódio) do próprio mar ou de outras fontes
168 salinas, como poços de água salgada. Após a extração, estes sais são suplementados com os
169 demais componentes iônicos presentes na água do mar. Cada empresa possui um protocolo de
170 suplementação e um local de extração que proporciona diferentes características e valores
171 comerciais aos sais marinhos artificiais.

172 Existem também empresas que formulam os sais a partir de produtos totalmente
173 sintéticos que conferem da mesma forma uma característica específica da marca. A média de
174 custo final de sais marinhos ao consumidor é de R\$ 20,00 por quilo. Em nossos experimentos
175 foi utilizado o sal marinho Red Sea (EUA), marca referência na aquarioria, sendo que seus
176 maiores componentes (cloreto e sódio) são extraídos do Mar Vermelho e suplementados para,
177 de acordo com o tipo de organismo mantido no aquário, atingir os níveis mínimos garantidos
178 pelo fabricante. Neste contexto, para que o mercado se expanda, é necessário investigar
179 fatores que possibilitem uma redução dos custos, sendo um dos principais para a produção
180 ornamental marinha distante do litoral, a redução da salinidade e suas implicações.

181 O quadro geral de regulação osmótica tanto para peixes de água doce quanto para
182 espécies marinhas é razoavelmente claro, desde que os órgãos e tecidos osmorregulatórios
183 (brânquias, rim, trato gastrointestinal, bexiga urinária e fígado nos reguladores ureotélicos)
184 foram identificados (BOEUF & PAYAN, 2001). Segundo SCHMIDT-NILSEN (2002), os
185 fluídos corporais dos peixes teleósteos se mantêm em uma concentração em torno de 1/3 da
186 água do mar que corresponde a uma salinidade de 11-12‰. Assim, segundo o mesmo autor,
187 os teleósteos osmorreguladores têm um gasto energético para manter seus fluídos nesta
188 concentração.

189 Segundo BOEUF & PAYAN (2001), a salinidade é um fator determinante que age
190 através de receptores aumentando ou diminuindo o crescimento. Os mesmos autores
191 concluem em sua revisão que peixes marinhos e de água doce apresentam maiores taxas de
192 crescimento/desenvolvimento em salinidades intermediárias, optando muitas vezes os juvenis
193 por ambientes entre 8 e 20‰ para um ótimo desenvolvimento. Para peixes-palhaço e demais
194 teleósteos, a salinidade age de forma diversa em cada espécie e fase de vida. Para KUMAR et

195 al. (2010), as melhores condições de reprodução para *Amphiprion sebae*, incluem uma
196 salinidade entre 22-24‰. Contudo segundo DHANEESH et al. (2012), uma salinidade entre
197 20-25‰ diminui a sobrevivência das larvas de *Amphiprion akallopisos*. De acordo com
198 MEDEIROS (2013), larviculturas de *Amphiprion clarkii* feitas em 20‰ apresentam melhores
199 resultados independente da temperatura. Porém poucas informações são encontradas sobre a
200 salinidade em juvenis de peixe-palhaço.

201

202 **1.7 Bem estar fisiológico e seus indicadores para peixes**

203 O bem estar em peixes não é precisamente definido, uma vez que uma série de fatores
204 podem ser utilizados como indicador de estado fisiológico qualitativo. De fato, segundo
205 VOLPATO et al. (2007), o bem estar em peixes não deveria ser avaliado fisiologicamente,
206 mas sim por liberdades e preferências, porém para alguns autores, a avaliação fisiológica ou
207 comportamental é cabível (BARCELLOS et al., 2007; KORALEVIC et al., 2014; BROWN,
208 2015). Peixes, bem como demais animais de produção são seres considerados sencientes, ou
209 seja, possuem a capacidade de sentir um conjunto de alterações como dor, fome, perigo e
210 interpretar que uma situação já vivida ou vivenciada circunstancialmente possa lhe trazer os
211 mesmos resultados preteritamente ocorridos (PEDRAZZANI, 2007). De fato, embora exista a
212 avaliação das preferências para o bem estar, em cativeiro esta abordagem pode não ser
213 possível. Assim se faz necessário a utilização de fatores que indiquem a qualidade de vida do
214 organismo frente a situação em cativeiro. Para a avaliação fisiológica frente a uma situação
215 ambiental são utilizados marcadores, ou biomarcadores, que utilizados de forma correta trazem
216 respostas sobre o organismo em determinada circunstância (MACHADO et al., 2013).

217 A histologia inicialmente descrevia a morfologia das células e tecidos, entretanto ela
218 focada na função celular para o tecido possibilita esclarecer a função fisiológica da célula, no
219 caso dos peixes, por exemplo, as funções fisiológicas da osmorregulação (VERLAG, 1982).
220 Através da contagem e avaliação morfológica de células dos diversos tecidos, é possível se
221 fazer inferências de metabolismo, por exemplo, com a contagem de ionócitos (UCHIDA et
222 al., 1996). Os ionócitos, também conhecidos com células de cloreto ou células ricas em
223 mitocôndrias, são células específicas responsáveis pela ionoregulação de peixes. Estas células
224 oscilam sua configuração funcional e morfológica de acordo com a espécie e o ambiente
225 (concentração osmótica) que ela está inserida (KANG et al., 2012; HSU et al., 2014)

226 Outro importante marcador de metabolismo adequado para organismos aeróbios é a
227 relação entre espécies pró e antioxidantes que podem danificar moléculas do mesmo, quando

228 este se encontra em situação fisiológica, ambiental ou patológica inadequada, fazendo com
229 que seu metabolismo não consiga neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas
230 naturalmente na respiração mitocondrial e seus consequentes danos (BANERJEE, 2008), logo
231 alterando seu bem-estar. Os processos celulares para detoxificação do organismo são
232 divididos em três fases, cada uma composta por componentes e reações que levam a I-
233 reduzir, oxidar ou hidrolisar a molécula tóxica, II- conjugar a molécula intermediária,
234 tornando-a menos tóxica e III- catabolizar o conjugado para que este possa ser mais
235 facilmente excretado (VAN DER OOST, 2003). Várias enzimas estão envolvidas no
236 metabolismo oxidativo e podem ser ativadas dependendo da necessidade ou fator de estresse,
237 além dos diversos processos não enzimáticos que servem como moléculas antioxidantes
238 (ascorbato, tocoferol, carotenoides, glutatona, etc) (WINSTON, 1998; AMADO, 2009). A
239 ação destas enzimas e moléculas antioxidantes *versus* um ambiente ou molécula pró-oxidante
240 constitui o balanço redox do organismo, que pode estar sofrendo estresse oxidativo se a ação
241 pró-oxidante superar a antioxidante evidenciando dano lipídico, proteico ou no DNA (VAN
242 DER OOST, 2003). Ou seja, a mensuração de diversas enzimas sem a avaliação de um dano
243 não permite sugerir um estresse oxidativo. Portanto é interessante avaliar enzimas primárias,
244 danos e a capacidade do organismo neutralizar espécies EROs, uma vez que o balanço redox
245 que tende a interpretar o ambiente como moderadamente pró-oxidante também pode ser
246 benéfico, sinalizando processos de proteção, diferenciação ou proliferação celular
247 (BANERJEE, 2008). Alguns autores estudaram a relação entre as espécies pró e
248 antioxidantes, que oscilam seu balanço de acordo com a configuração fisiológica do
249 organismo frente ao ambiente hiposmótico ou hiperosmótico (MARTINEZ-ALVAREZ,
250 2002; PARK et al., 2011), sugerindo estes marcadores como resultados tão relevantes quanto
251 o nível de cortisol. Estes parâmetros histológicos e bioquímicos, somados às avaliações
252 pertinentes a produção aquícola permitem avaliar qual o efeito da salinidade sobre peixes
253 ornamentais marinhos produzidos em água marinha artificial revelando significativos avanços
254 na produção ornamental marinha.

255

256 **1.8 Referências Bibliográficas**

257 AMADO, LL, ML GARCIA, PB RAMOS, RF FREITAS, B ZAFALON, JLR FERREIRA,
258 JS YUNES, JM MONSERRAT. 2009. A method to measure total antioxidant capacity
259 against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins
260 toxicity. *Sci. Total Environ.*, 407: 2115–212.

- 261 BANERJEE, R. 2008. Redox Biochemistry. Wiley. 339 p.
- 262 BARCELLOS, LJG, F RITTER, LC KREUTZ, RM QUEVEDO, LB SILVA, AC BEDIN, J
263 FINCO, L CERICATO. 2014. Whole-body cortisol increases after direct and visual
264 contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. Aquaculture, 272: 774–778.
- 265 BOEUF, G, P PAYAN. 2001. How should salinity influence fish growth? Comp. Biochem.
266 Physiol. C, 130: 411-423.
- 267 BRIGHTWELL, C. 2006. The Nano-Reef Handbook. TFH Publications. 192p.
- 268 BROWN, C. 2015. Fish intelligence, sentience and ethics. Anim. Cogn., 18: 1-17.
- 269 COOPER, R, JM HEINEN. 1991. A starvation test to determine optimal salinities for larval
270 freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol., 3: 531-542.
- 271 DHANEESH, KV, KN DEVI, TTA KUMAR, T BALASUBRAMANIAN, K TISSERA.
272 2012. Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish
273 *Amphiprion akallopisos*. J. King Saud Uni. Sci., 24: 201-209.
- 274 FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. 2014. Fisheries and Aquaculture
275 Department. Roma, disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699e/a0699e.pdf>
276 Acesso em: 14/04/2015.
- 277 FAUTIN D, GR ALLEN. 1992. Anemonefishes and their host sea anemones. Western
278 Australian Museum, Perth, 160 p.
- 279 GOUVEIA, L, P REMA. 2005. Effect of microalgal biomass concentration and temperature
280 on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. Aquacult. Nutrit., 11(1):
281 19-23.
- 282 HSU, H-H, L-Y LIN, Y-C TSENG, J-L HORNG, P-P HWANG. 2014. A new model for fish
283 ion regulation: identification of ionocytes in freshwater- and seawater-acclimated medaka
284 (*Oryzias latipes*). Cell. Tissue Res., 357: 225–243.
- 285 HOFF JR, FH. 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine
286 clownfish. 1° ed. Aquaculture Consultants Inc. Dade City. 212p.
- 287 IBAMA. 2008. Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura,
288 comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquariofilia.
289 Brasília Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis,
290 Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas. Brasília. 38p.
- 291 KANG, C-K, F-C LIU, W-B CHANG, T-H LEE. 2012. Effects of low environmental salinity
292 on the cellular profiles and expression of Na⁺, K⁺-ATPase and Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter

293 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus*
294 *argenteus*. Fish Physiol. Biochem. 38: 665–678.

295 KOLAREVIC, J, G BAEVERFJORD, H TAKLE, E YTTEBORG, BKM REITEN, S
296 NERGÅRD , BF TERJESEN. 2014. Performance and welfare of Atlantic salmon smolt
297 reared in recirculating or flow through aquaculture systems. Aquaculture, 432: 15–25.

298 KUMAR, TTA, SK SETU, P MURUGESAN, T BALASUBRAMANIAN. 2010. Studies on
299 captive breeding and larval rearing of clown fish [a¹], *Amphiprion sebae* (Bleeker, 1853)
300 using estuarine water. Indian J. Mar. Sci., 39: 114-119.

301 LARUMBE-MORÁN, E, MP HERNÁNDEZ-VERGARA, MA OLVERA-NOVOA, CIP
302 ROSTRO. 2010. Protein requirements of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry cultured
303 at different salinities. Aquacult. Res., 41: 1150-1157.

304 LIMA, AO, JÁ GUERREIRO, L PORTZ. 2010. Peixes-palhaço: antecedentes biológicos e
305 introdução ao cultivo. Panorama da Aquicultura, 120: 38-45.

306 LIMA, AO, G BERNARDINO, CEM PROENÇA. 2011. Agronegócio de peixes ornamentais.
307 Panorama da Aquicultura, 11: 14- 24.

308 LUIZ, OJ, SR FLOETER, LA ROCHA, CEL FERREIRA. 2013. Perspectives for the lionfish
309 invasion in the South Atlantic: Are Brazilian reefs protected by the currents? Mar. Ecol.
310 Prog. Ser., 485: 1–7.

311 LUZ, RK, MC PORTELLA. 2002. Larvicultura de Trairão (*Hoplias lacerdae*) em água doce
312 e água salinizada. R. Bras. Zootec., 31(2): 829-834.

313 MACHADO, AAS, MLM HOFF, RD KLEIN, JG CARDOZO, MM GIACOMIN, GLL
314 PINHO, A BIANCHINI. 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy
315 *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. Aquatic Toxicol., 138–139: 60–69

316 MADHU, R, K MADHU. 2008. Occurrence of anemonefishes and host sea anemones in
317 Andaman and Nicobar Islands. J. Mar. Biol. Ass. India., 49(2): 118 – 126.

318 MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, RM, MC HIDALGO, A DOMEZAIN, AE MORALES, M
319 GARCÍA-GALLEGO, A SANZ. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser*
320 *naccarii* caused by increasing environmental salinity. J. Exp. Biol., 205: 3699–3706.

321 MEDEIROS, AFF. 2013. Desenvolvimento de larvas do Peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*:
322 efeito da salinidade e da temperatura. Dissertação de Mestrado (Aquicultura).
323 Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 43p.

324 MPA. 2013. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2008-2009. Ministério da
325 Pesca e Aquicultura (MPA), disponível em:

326 <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/anu%C3%A1rio%20da%20pesca%20c>
327 [ompleto2.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/anu%C3%A1rio%20da%20pesca%20c) Acesso: 26/12/2013.

328 OLIVOTTO, I, M DI STEFANO, S ROSETTI, L COSSIGNANI, A PUGNALONI, F
329 GIANTOMASSI, O CARNEVALI. 2011. Live prey enrichment, with particular
330 emphasis on HUFAs, as limiting factor in false percula clownfish (*Amphiprion ocellaris*,
331 Pomacentridae) larval development and metamorphosis: molecular and biochemical
332 implications. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 159: 207–218.

333 PARK, MS, HS SHIN, G-S KIL, J LEE, CY CHOI. 2011. Monitoring of Na⁺/K⁺-ATPase
334 mRNA expression in the cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*, exposed to an
335 osmotic stress environment: profiles on the effects of exogenous hormone. *Ichthyol. Res.*,
336 58: 195–201.

337 PEDRAZZANI, AS. 2007. Reconhecimento da Senciência e Proposta de Método Alternativo
338 de Abate. Dissertação de Mestrado (Ciências Veterinárias). Universidade Federal do
339 Paraná. Curitiba, Paraná. 82p.

340 PIRARAT, N, W PRATAKPIRIYA, K JONGNIMITPAIBOON, Ki SAJJAWIRIYAKUL, C
341 RODKHUM, N CHANSUE. 2011. Lymphocystis disease in cultured false clown
342 anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). *Aquaculture*, 315: 414–416.

343 RESLEY, MJ, KA WEBB JR., G J HOLT. 2006. Growth and survival of juvenile cobia,
344 *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system.
345 *Aquaculture*, 253: 398–407.

346 REZENDE, FA. 2010. Intensificação da coloração em peixes ornamentais com uso de rações
347 enriquecidas com pigmentos naturais. Tese Doutorado (Zootecnia). Universidade Federal
348 de Viçosa Minas Gerais. 128p.

349 RHYNE, AL, MF TLUSTY, PJ SCHOFIELD, L KAUFMAN, JA MORRIS JR. 2012
350 Revealing the appetite of the marine aquarium fish trade: the volume and biodiversity of
351 fish imported into the United States. *PLoS ONE* 7: e35808.

352 RIBEIRO, FAS, LA RODRIGUES, JBK FERNANDES. 2007. Desempenho de juvenis de
353 Acará-Bandeira (*Pterophylum scalare*) com diferentes níveis de proteína na dieta.
354 *Boletim Instituto de Pesca*, 33(2): 195-203.

355 SAMPAIO, LA, LS FREITAS, MH OKAMOTO, LR LOUZADA, RV RODRIGUES, RB
356 ROBALDO. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*
357 from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture*, 262: 340–346.

358 SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002. Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente. 5. ed. São
359 Paulo: Livraria e Editora Santos. 609 p.

360 SMITH, KF, MD BEHRENS, LM MAX, P DASZAK. 2008. U.S. Drowning in Unidentified
361 Fishes: Scope, Implications, and Regulation of Live Fish Import. *Conserv. Lett.*, 1: 103–
362 109.

363 TIMM, J, M KOCHZIUS. 2008. Geological history and oceanography of the Indo-Malay
364 Archipelago shape the genetic population structure in the false clown anemonefish
365 (*Amphiprion ocellaris*). *Mol. Ecol.*, 17: 3999–4014.

366 TIMMONS, MB, JM EBELING. 2010. Recirculating Aquaculture. 2° Ed. NRAC
367 Publications. 948p.

368 TLUSTY, M. 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade.
369 *Aquaculture*, 205: 203– 219.

370 TORNHILL, DJ. 2012. Ecological Impacts and Practices of the Coral Reef Wildlife Trade.
371 *Defenders of Wild Life*.

372 UCHIDA, K, T KANEKO, K YAMAUCHI, T HIRANO. 1996. Morphometrical Analysis of
373 Chloride Cell Activity in the Gill Filaments and Lamellae and Changes in Na⁺,K⁺-
374 ATPase Activity During Seawater Adaptation in Chum Salmon Fry. *J. Exp. Zool.*, 276:
375 193-20.

376 VAN DER OOST, R, J BEYER, NPE VERMEULEN. 2003. Fish bioaccumulation and
377 biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ., Toxicol. Pharmacol.*,
378 13: 57-149.

379 VERLAG, GF. 1982. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. Kodansh
380 Ltd. Tokyo.147p.

381 VOLPATO, GL, E GONÇALVES-DE-FREITAS, M FERNANDES-DE-CASTILHO. 2007.
382 Insights into the concept of fish welfare. *Dis. Aquat. Org.*, 75: 165–171.

383 WABNITZ, C, M TAYLOR, E GREEN, T RAZAK. 2003. From Ocean to Aquarium.
384 Cambridge, UK: UNEP-WCMC. 64 p.

385 WITTENRICH, ML. 2007. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium
386 fishes. T.F.H Publications. Neptune city. 301p.

387 YASIR, I, JG QIN. 2009. Effect of light intensity on color performance of false clownfish,
388 *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *J. World Aquacult. Soc.*, 41(3): 337-350.

389 YASIR, I, JG QIN. 2009. Impact of background on color performance of false clownfish,
390 *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *J. World Aquacult. Soc.*, 30(6): 724-734.

391 YASIR, I, JG QIN. 2010. Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false
392 clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. J. World Aquacult. Soc., 41(3): 308-31

1 **2. OBJETIVOS**

2 **2.1 Objetivo Geral**

3 Estudar a produção de juvenis do peixe-palhaço *A. ocellaris* “Black” em
4 diferentes salinidades de água marinha artificial, avaliando o seu desempenho
5 zootécnico e bem estar fisiológico.

6 **2.2 Objetivos Específicos**

7 Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de *A. ocellaris* “Black” em
8 diferentes salinidades;

9 Verificar a histologia das brânquias quanto aos ionócitos em juvenis de *A.*
10 *ocellaris* “Black” em diferentes salinidades;

11 Avaliar a transferência da menor salinidade viável para a criação de juvenis de
12 *A. ocellaris* “Black” para a maior salinidade utilizada na aquariofilia;

13 Observar alterações bioquímicas: atividade da Glutathione S-Transferase, danos
14 lipídicos e a capacidade antioxidante de juvenis *A. ocellaris* “Black” criados em
15 diferentes salinidades e submetidos ao choque hiperosmótico;

16 Avaliar a economia com sal, para produzir juvenis *A. ocellaris* “Black” em
17 salinidade reduzida.

1 **3. CAPÍTULO 1: Efeitos da salinidade sobre juvenis do peixe-palhaço**
2 *Amphiprion ocellaris* variedade “Black” criado em água marinha artificial

3 **3.1 Introdução**

4 De acordo com RHYNE et al. (2012), 11 milhões de peixes ornamentais são
5 retirados por ano das regiões de recife para sustentar o comércio ornamental dos EUA,
6 núcleo desta indústria, que, para espécies marinhas, baseia-se em 97,6% em indivíduos
7 selvagens (SMITH, 2008). Peixes-palhaço, um dos mais representativos peixes
8 ornamentais marinhos, são encontrados na região Oeste dos oceanos Pacífico e Índico
9 (THORNHILL, 2012). O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* é uma espécie ornamental
10 marinha de pequeno porte. Sua produção em cativeiro é de simples execução e ele está
11 amplamente distribuído no mercado da aquarioria (WITTERINCH, 2007) ocupando o
12 quinto lugar no ranking de importações pelos EUA (RHYNE et al., 2012). Sua
13 variedade “Black”, endêmica da província de Darwin, na Austrália (FAUTIN &
14 ALLEN, 1992), atinge maior valor no mercado e exige maior cuidado ambiental pelo
15 seu endemismo (DREW, 2008).

16 A piscicultura marinha ornamental ocorre majoritariamente em regiões afastadas
17 do litoral, necessitando para suas atividades que a água marinha seja transportada, ou
18 que seja feita salinização artificial (TLUSTY, 2002). Dentro deste contexto, estudos da
19 influência da salinidade em peixes-palhaço são necessários e segundo DHANEESH
20 (2012a), são bastante escassos. Vários estudos existem referentes ao efeito da salinidade
21 na sobrevivência e crescimento de outras espécies de peixes marinhos (RESLEY et al.,
22 2006; SAMPAIO et al., 2002; SAMPAIO et al., 2007) e inclusive de representantes da
23 família Amphiprioninae quanto a reprodução (KUMAR & BALASUBRAMANIAN,
24 2009; KUMAR et al., 2010), larvicultura (DHANEESH 2012b) e crescimento (LE et
25 al., 2009). Porém esses estudos não utilizaram água marinha artificial. Para que se possa
26 produzir em regiões distantes do mar, são usados sistemas de recirculação de água, que
27 trazem benefícios como menor uso de água e maior biossegurança (TIMMONS &
28 EBELING, 2010).

29 A manutenção de peixes em águas com salinidade próxima a osmolalidade de
30 seus fluídos corporais pode causar benefícios, inclusive zootécnicos aos peixes, que
31 optam por esta faixa de concentração iônica uma vez que o gasto energético, de 20 a
32 mais de 50%, relacionado ao metabolismo osmorregulatório se reduzido poderia
33 melhorar o desempenho produtivo do animal (BOUEF & PAIN, 2001). No contexto de

34 metabolismo e respiração se observa em organismos a relação entre as espécies pró e
35 antioxidantes, que oscilam seu balanço de acordo com a configuração fisiológica do
36 organismo frente ao ambiente hipo ou hiperosmótico (MARTINEZ-ALVAREZ, 2002;
37 PARK et al., 2011a).

38 Após a comercialização, a indústria ornamental deveria avaliar a mortalidade
39 acumulada e as respostas dos peixes por no mínimo uma semana (LIM, 2003). Isso está
40 relacionado às adaptações genéticas, fisiológicas e bioquímicas que se estabilizam após
41 este período (KANG et al., 2010). Portanto, avaliar a consequência da produção em
42 baixa salinidade, considerando que a aquariofilia marinha ocorre em salinidades de 30-
43 35%, após o período produtivo é necessário. Esta avaliação remete que na produção
44 animal o bem-estar deve ser sempre considerado, uma vez que ele externa as questões
45 fisiológicas de desconforto frente a um empecilho ambiental (BROWN, 2015;
46 VOLPATO et al., 2007).

47 A histologia revela alterações morfológicas que indicam mudanças fisiológicas
48 como o número de ionócitos que correlato a osmorregulação, é considerado um
49 marcador de bem estar (KOLAREVIC et al., 2014). Marcadores bioquímicos, como
50 atividades enzimáticas relacionadas a espécies reativas de oxigênio (EROs), seus
51 prejuízos e a capacidade de um tecido ou organismo neutralizá-las podem ser utilizados
52 para avaliação dos danos causados pelo estresse osmótico tanto quanto marcadores
53 clássicos como cortisol (MARTINEZ-ALVAREZ, 2002). A Glutathione S-Transferase
54 (GST) é uma enzima multifuncional primária que transporta a glutathione, fazendo com
55 que ela exerça suas funções detoxificadoras. A lipoperoxidação (LPO) medida através
56 do método de TBARS, demonstra o dano que o desequilíbrio de EROs causa ao
57 organismo. A capacidade antioxidante frente a um radical peroxil (ACAP) serve como
58 um índice de resistência do organismo frente às diversas formas de geração de EROs
59 que podem causar algum dano decorrente do estresse oxidativo (VAN DER OOST et
60 al., 2003).

61 O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho zootécnico e o bem-
62 estar fisiológico de juvenis de *A. ocellaris* “Black” criados em diferentes salinidades de
63 água marinha artificial e suas respostas frente à transferência direta de salinidade 15%
64 para 35%, além da economia com o uso de sal na produção em salinidade reduzida.

65 3.2 Material e Métodos

66 Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Piscicultura Estuarina e
67 Marinha (LAPEM) do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio
68 Grande (FURG). Os peixes utilizados nesse experimento foram produzidos no LAPEM
69 adaptando as metodologias descritas por HOFF (1996).

70 DESENHO EXPERIMENTAL 1

71 Foram utilizados quatro sistemas de recirculação de água compostos de quatro
72 tanques cilíndricos de parede preta e fundo branco com volume total de 50 L
73 preenchidos com 24 L de água, juntamente com uma caixa de recirculação de 120 L,
74 "skimmer" e um filtro biológico. Cada sistema foi mantido nas salinidades de 5, 15, 25 e
75 35‰, obtidas pela salinização artificial de água potável (decolorada com tiosulfato de
76 sódio 5ppm) de fornecimento da empresa local com sal comercial para aquário (Red
77 Sea, EUA). Três tanques de cada sistema foram utilizados, sendo cada tanque uma
78 réplica de cada salinidade. Para cada tratamento foram utilizados 39 peixes, 13 peixes
79 por tanque, com 40 dias de vida totalizando 117 peixes para todo o experimento. Os
80 peixes foram aclimatados as salinidades experimentais com mudanças graduais de 5‰
81 por dia. O experimento foi realizado em sala climatizada, com um fotoperíodo de 12
82 horas claro: 12 horas escuro mantido com o auxílio de um temporizador, durante o
83 período de 60 dias. A alcalinidade e o pH foram corrigidos com adição de bicarbonato
84 de sódio, para atingir valores similares ao do tratamento controle (35‰). Os peixes
85 foram alimentados com ração comercial 300-500µm (Orange Grow, Inve, EUA) três
86 vezes ao dia, às 9:00, 13:00 e 17:00 h, até a saciedade aparente durante todo o período
87 experimental, exceto nos dias anteriores as coletas (12 horas de jejum).

88 DESENHO EXPERIMENTAL 2

89 Juvenis de *A. ocellaris* "Black" com 40 dias de vida foram transferidos e criados
90 em sistema de recirculação de água por 45 dias nas salinidades 15‰ e 35‰. Para o
91 experimento foram utilizados dois sistemas de recirculação idênticos ao do primeiro
92 delineamento e com esterilizador UV (8W). Cada sistema foi mantido nas salinidades
93 15‰ e 35‰, obtidas pela salinização da água potável local com sal comercial para
94 aquário (Red Sea, EUA). Foram utilizados três tanques do sistema, sendo cada tanque
95 uma réplica de cada salinidade. Os tratamentos foram as transferências da salinidade 15
96 para 15‰ (T15-15‰), considerada como controle, e da salinidade 15 para 35‰ (T15-
97 35‰). Para cada tratamento foram utilizados 27 peixes, mais seis peixes de cada

98 salinidade como controle basal (15‰ e 35‰) totalizando 66 peixes (peso de 604,1±27,1
99 mg; 30,7±0,5 mm de comprimento total). O manejo alimentar dos peixes foi igual ao
100 utilizado no experimento 1.

101 Os peixes criados nas salinidades 15‰ e 35‰ foram transferidos para as
102 mesmas salinidades de produção e ficaram em aclimação por 7 dias. Momentos antes
103 da transferência foram coletados os peixes considerados como controles basais de cada
104 salinidade. Os demais peixes da salinidade 15‰ foram então distribuídos
105 aleatoriamente para a salinidade 15‰ e 35‰ em triplicata para cada salinidade
106 totalizando ao final da transferência 11 peixes em cada tanque. Três peixes de cada
107 tanque foram coletados com puçá 1 h, 24 h e 7 dias após a transferência, eles foram
108 imediatamente eutanasiados em banho de benzocaína (300 ppm), congelados inteiros
109 em nitrogênio líquido e armazenados em ultra-freezer (-80 °C) para análises posteriores.

110

111 ANÁLISE DA QUALIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA

112 A temperatura foi aferida diariamente pela manhã, juntamente com os
113 parâmetros: salinidade (multiparâmetro 556 MPS, YSI, EUA), oxigênio dissolvido
114 (Oxímetro 550A, YSI, EUA) e pH (pHmetro de bancada Five Easy FE20, METTLER
115 TOLEDO, Suíça). A alcalinidade e os nitrogenados: amônia, nitrito e o nitrato foram
116 analisado semanalmente, segundo Baumgarten (2010).

117 A caracterização da água foi realizada ao início e final do experimento. Os íons
118 de sódio e potássio foram medidos através de fotometria de chama (Micronal B462,
119 Brasil). Inicialmente as amostras foram diluídas em triplicata e os valores de leitura
120 foram plotados em curva padrão e multiplicados pelo fator de diluição da amostra.
121 Cálcio e cloreto foram analisados utilizando kits comerciais (Doles, Brasil) com os
122 protocolos adaptados para leitura em microplacas utilizando fluorímetro (Biotek,
123 Synergy HT, EUA). A osmolalidade foi medida com osmômetro de pressão de vapor
124 (Vapro 5600, Wercor Inc., Logan, UT, EUA).

125

126 ANÁLISE DE DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

127 Inicialmente, após 30 dias e no final do experimento, os peixes foram mantidos
128 em jejum de 12h e anestesiados com benzocaína (50ppm) para medida do comprimento
129 total (CT) e comprimento padrão (CP) com paquímetro e do peso em balança (Sartorius
130 TE214S, Brasil) com 0,0001g de precisão, para avaliar o desempenho zootécnico da

131 espécie nas diferentes salinidades. A performance dos peixes nas diferentes salinidades
132 foi avaliada pelos índices de:

133 Sobrevivência:

$$S(\%) = \frac{\text{Número final de peixes}}{\text{Número inicial de peixes}} \times 100$$

134 Taxa de crescimento específico (TCE):

$$TCE(\%) = \frac{(\ln)\text{peso médio final} - (\ln)\text{peso médio inicial}}{\text{período experimental}} \times 100$$

135 Conversão alimentar aparente (CAA):

$$CAA(\%) = \frac{\text{Ração ofertada}}{\text{Ganho de peso}} \times 100$$

136 Fator de condição de Fulton (K):

$$K = \frac{\text{Peso total}}{\text{Comprimento total}^3} \times 100$$

137 Ganho de Peso (GP):

$$GP = \text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}$$

138

139 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

140 Ao final do primeiro experimento, três peixes foram aleatoriamente coletados de
141 cada uma das unidades experimentais, eutanasiados em banho de benzocaína (300
142 ppm), fixados inteiros em Bouin por 24 h e conservados em álcool 70%. As amostras
143 foram processadas em processador automático (PT05 Lupetec, Brasil) e emblocadas em
144 Paraplast, cortados a 5µm de espessura em micrótomo (MRP03 Lupetec, Brasil) e
145 corados com hematoxilina e eosina (HE). A quantificação dos ionócitos ocorreu em
146 microscópio ótico (Nikon, Eclipse E200, Japão) com auxílio de uma ocular
147 micrométrica (CARL ZEISS, Integrating Disc1, 25 points-G49), com a qual foram
148 contados 10 campos de cada lâmina em aumento de 400 ×, para quantificar o número de
149 ionócitos branquiais médio por campo de contagem em cada tratamento de acordo com
150 WEIBEL (1980).

151 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

152 Cinco peixes inteiros de cada réplica foram homogeneizados (diluição 1:4 – p:v)
153 em Ice- Cold buffer (100 mM Tris–HCl, 0,1 mM EDTA e 0,1% triton X-100 (v/v), pH
154 7,8) como descrito por CASTRO et al. (2012) e então centrifugados a 10.000 ×g durante
155 30 minutos a 4 °C (Centrífuga SOLAB SL-703, Brasil). O sobrenadante foi pipetado e
156 estocado a -80 °C até a realização das análises. O nível de proteína total de cada
157 homogeneizado foi determinado pelo método de biureto, utilizando kits comerciais
158 (Doles, Brasil) através de um leitor de microplacas (BioTek, LX 800, EUA) à 550 nm.
159 A atividade antioxidante total frente ao radical peroxil (ACAP) foi medida pelo método
160 de relação da área relativa de fluorescência com e sem 2,20-azobis 2-
161 metilpropianomidina dicloridrato (ABAP; 4 mM; Aldrich) adaptado por MONSERRAT
162 et al. (2014) utilizando o diacetato de 2', 7' diclorofluoresceína (H₂DCF-DA) como
163 fluorocromo na presença de radicais livres gerados pela temperatura de incubação (35
164 °C) e a presença de ABAP, utilizando 10 µL de homogeneizado com 2mg/L de proteína
165 total descrito por AMADO et al. (2009) através da excitação (488 nm) e emissão
166 (525nm) em fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer, EUA). Para avaliação do dano lipídico
167 foi utilizado o protocolo de reação com o ácido til-barbitúrico (TBARS), descrito por
168 OAKES & VAN DER KRAAK (2003), considerando que os 20 µL do homogeneizado
169 utilizado no ensaio, na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) fica
170 lipoperoxidado e gera Malondialdeído (MDA) que reage com o ácido til barbitúrico
171 (TBA) e pode ser lido em fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer, EUA) à 515 nm
172 (excitação) e 580 nm (emissão), sendo os valores plotados em função de uma curva
173 padrão de TMP (1,1,3,3-tetrametoxpropano). A atividade da enzima GlutathioneS-
174 Transferase (GST) foi obtida através da leitura em fluorescência (340 nm) segundo
175 HABIG (1974) utilizando-se 20 µL de homogeneizado reagindo com o conjugado de
176 1mM de glutathione e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

177

178 ANÁLISE DO CUSTO DE SALINIZAÇÃO

179 No final do experimento foi calculado valor percentual da economia com o custo
180 do sal (ECS):

$$ECS = \left(\frac{\text{Custo de salinização do tratamento} \times 100}{\text{Custo de salinização controle}[35\%]} \right) - 100$$

181

182 ANÁLISE ESTATÍSTICA

183

184 EXPERIMENTO 1

185 O delineamento foi inteiramente casualizado, e foram realizadas, após teste de
186 homocedasticidade e normalidade, e transformações dos dados percentuais pelo arco
187 seno da raiz quadrada, análise de variância de uma via para averiguar possíveis
188 diferenças entre os tratamentos, nas variáveis avaliadas. Após observação de diferenças,
189 foi realizado o teste de Tukey com 5% de significância, segundo VIEIRA &
190 HOFFMANN (1989). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão.

191

192 EXPERIMENTO 2

193 O delineamento foi fatorial tempo *versus* tratamento. Após teste de
194 homocedasticidade, normalidade e transformações dos dados percentuais pelo arco seno
195 da raiz quadrada, análise de variância fatoriais foram realizadas para averiguar possíveis
196 diferenças entre os tratamentos, tempos e suas interações, nas variáveis avaliadas.
197 Análises de variância de uma via foram realizadas para confirmar diferenças entre os
198 tratamentos e os controles basais. Confirmadas diferenças foi realizado o teste de Tukey
199 com 5% de significância, segundo VIEIRA & HOFFMANN (1989). Os dados estão
200 expressos em média \pm erro padrão.

201

202 **3.3 Resultados**

203 EXPERIMENTO 1

204 A sobrevivência foi de 0, 95 \pm 4,4, 97 \pm 4,4 e 95 \pm 4,4%, respectivamente para as
205 salinidades 5, 15, 25 e 35%. Portanto os peixes não sobreviveram em 5%, e as mortes
206 ocorreram até 6 dias após o início do experimento, mas nos outros tratamentos as
207 sobrevivências foram acima de 90 % e não diferiram estatisticamente ($p>0,05$).

208 As condições ambientais do experimento estão juntamente com a caracterização
209 iônica e de osmolalidade presentes na tabela 1. Ao final do experimento não houve
210 diferença significativa dos parâmetros zootécnicos avaliados entre os tratamentos
211 ($p>0,05$) (Tabela 2).

212 Tabela 1 – Qualidade de água durante a criação de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion*
 213 *ocellaris* “Black” em diferentes salinidades.

Tratamento	15‰	25‰	35‰	
Salinidade (‰)	15,34±0,03	25,42±0,05	35,31±0,06	‡
Oxigênio (mg O₂/L)	6,96 ± 0,01 ^a	6,57 ± 0,01 ^b	6,24± 0,01 ^c	
Temperatura (°C)	27,3±0,0	27,3±0,0	27,2±0,0	
pH	8,10±0,01 ^a	8,08±0,01 ^a	8,00 ±0,01 ^b	
Alcalinidade (mg CaCO₃/L)	152±2	154±2	153±2	
NAT (mg N- NH₄⁺+NH₃/L)	0,09±0,02	0,10±0,02	0,10±0,02	
Nitrito (mg NO₂/L)	1,55±0,14 ^a	0,99±0,12 ^b	0,74±0,11 ^b	
Nitrato (mg NO₃/L)	1,05±0,72	1,52±0,86	1,70±0,83	
Osmolalidade (mOsm/kg)	431±13	764±10	1060±6	‡
Na⁺(g/L)	7,22±0,05	12,26±0,10	15,46±0,06	‡
Cl⁻(g/L)	8,25±0,01	10,81±0,03	12,70±0,05	‡
K⁺(mg/L)	198,81±0,0	388,1±4,89	430,96±0,0	‡
Ca²⁺(mg/L)	220,47±1,6	353,02±2,14	447,79±2,75	‡

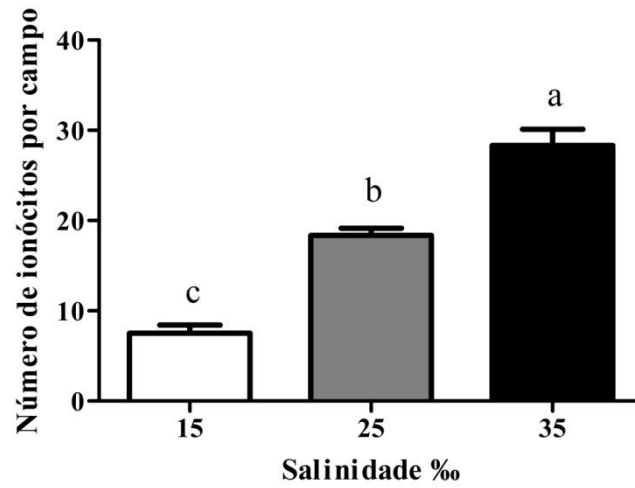
214 Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05). ‡: Variáveis
 215 não submetidas à análise estatística.

216 Tabela 2 – Performance zootécnica de juvenis do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*
 217 “Black” criados em diferentes salinidades.

Tratamento	15‰	25‰	35‰
Peso inicial	88,8 ± 5,2	80,8 ± 4,8	95,2± 4,2
Peso 30 dias	197,2 ± 11,1	181,7 ± 8,8	181,2 ± 10,4
Peso 60 dias	300,1 ± 22,1	287,7 ± 17,8	273,5 ± 17,9
CT inicial	17,1±0,4	16,6±0,3	17,7±0,3
CT 30 dias	20,4±0,7	20,7±0,4	20,5±0,4
CT 60 dias	23,8±0,6	23,4±0,5	23,2±0,5
K	4,4 ± 0,2	4,6 ± 0,1	4,5 ± 0,1
CAA	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,01
TCE	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,3	1,7 ± 0,05
GP	211,1±14,5	208,9±20,6	177,7±9,8

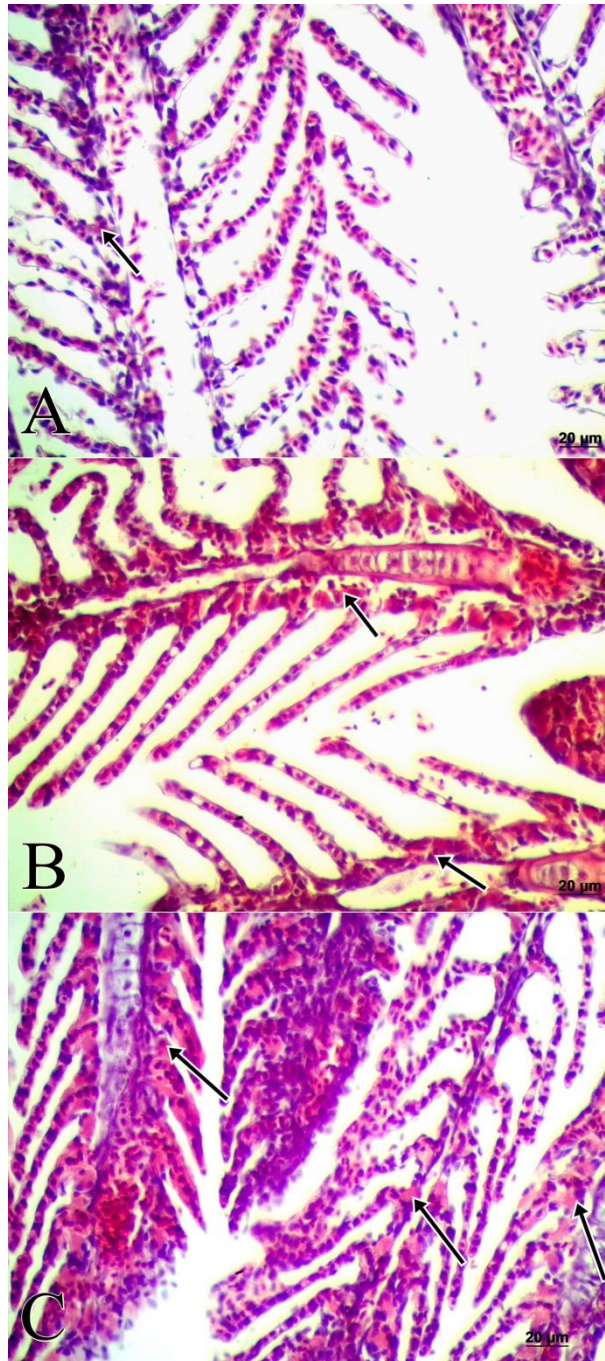
218 Peso (mg); CT: Comprimento total (mm); K: Fator de condição; CAA: Conversão
 219 alimentar aparente; TCE: Taxa de crescimento específico (%/dia), GP: Ganho de peso
 220 (mg) .

221 A economia com o custo de salinização referente ao tratamento 35‰ foi de
 222 28,57% e 57,14% para os tratamentos 25‰ e 15‰, respectivamente. As análises
 223 histológicas demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos,
 224 sendo o número de ionócitos crescente conforme o aumento da salinidade (Figuras 1 e
 225 2). Os resultados dos indicadores bioquímicos como representação do bem-estar
 226 fisiológico diferiram para GST (Figura 3) sendo significativamente menor no
 227 tratamento 25‰ do que em 15‰ e 35‰ ($p < 0,05$). Entretanto não houve diferença
 228 significativa ($p > 0,05$) para ACAP (Figura 4) e TBARS (Figura 5).



229

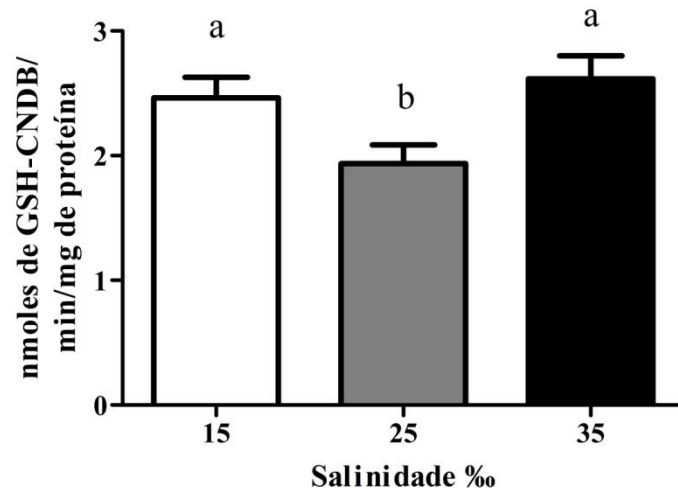
230 Figura 1: Número de ionócitos nas brânquias de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*
231 “Black” criados em diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferenças entre os
232 tratamentos ($p < 0,05$).



233

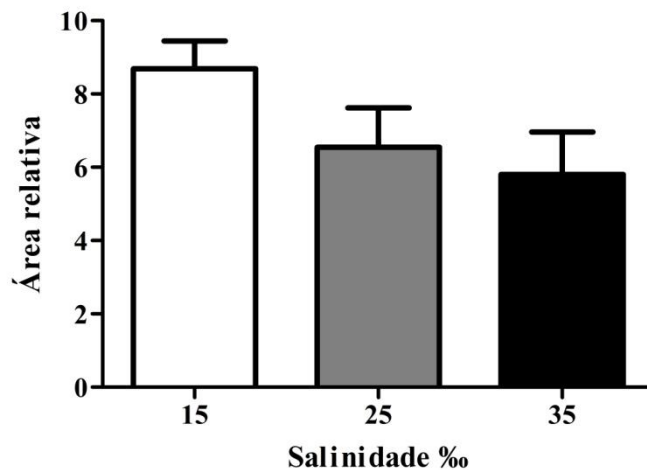
234 Figura 2: Fotos das brânquias de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*
235 “Black” criados em diferentes salinidades. A: salinidade 15‰; B: salinidade 25‰; C:
236 salinidade 35‰. As setas indicam os ionócitos. Coloração: HE. Aumento 400 ×.

237



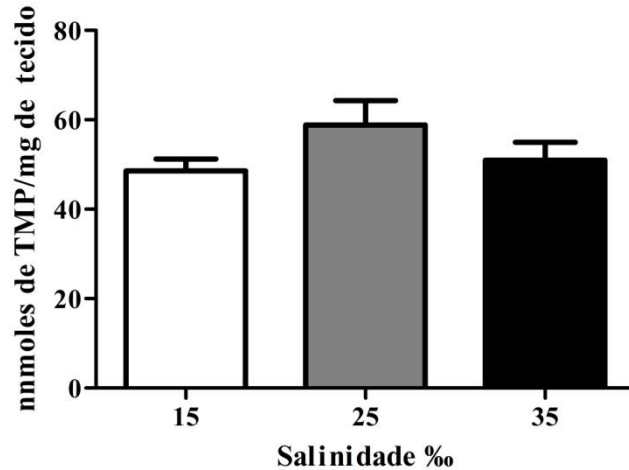
238

239 Figura 3: Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) de juvenis de peixe-palhaço
 240 *Amphiprion ocellaris* “Black” criados em diferentes salinidades. Letras diferentes
 241 significam diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$).



242

243 Figura 4: Capacidade antioxidante total frente a um radical peróxido (ACAP) de juvenis de
 244 peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* “Black” criados em diferentes salinidades. Não
 245 houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).



246

247 Figura 5: Dano lipídico (TBARS) de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*
 248 “Black” criados em diferentes salinidades. Não houve diferença significativa entre os
 249 tratamentos ($p > 0,05$).

250 EXPERIMENTO 2

251 Durante a produção de 45 dias, as salinidades foram efetivamente $15,66 \pm 0,11$ e
 252 $35,47 \pm 0,15$ ‰, e a qualidade de água adequada para a espécie: $\sim 6,5$ mg O_2/L ; $\sim 28^\circ C$;
 253 pH de ~ 8 , 150 mg $CaCO_3/L$ de alcalinidade; $\sim 0,07$ mg N- $NH_4^+ + NH_3/L$; $\sim 0,06$ mg
 254 NO_2/L ; ~ 11 mg NO_3/L . Durante o experimento houve diferença significativa ($p < 0,05$)
 255 para os valores de oxigênio e nitrogênio amoniacal total (NAT), entretanto todos os
 256 parâmetros são considerados adequados (Tabela 3). As sobrevivências foram de 100%
 257 para as transferências entre salinidades 15-15‰ e 15-35‰.

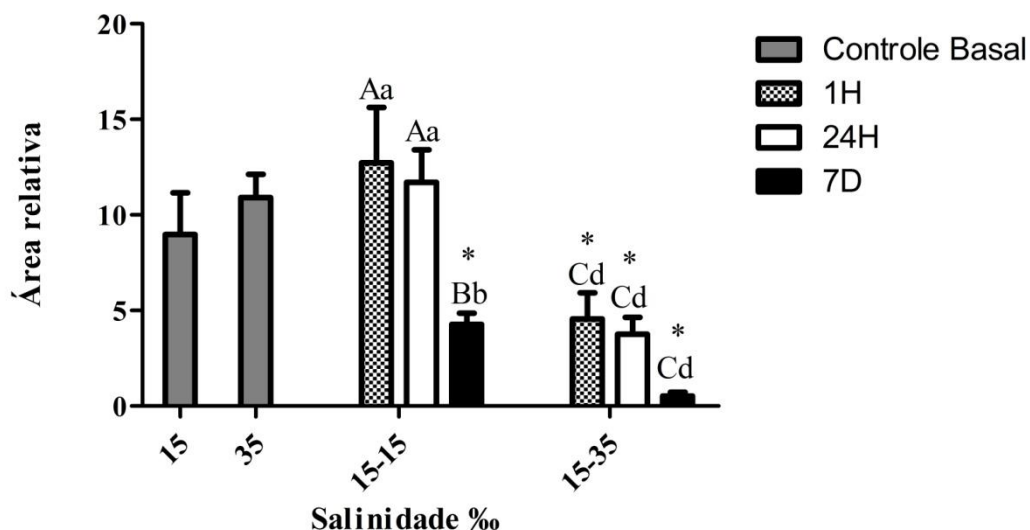
258

259 Tabela 3 – Análise da qualidade de água durante aclimação e o experimento.

Tratamento	Aclimação		Experimento		
	15‰	35‰	15‰	35‰	
Salinidade (‰)	15,73±0,12	35,27±0,14	15,30±0,07	35,23±0,12	‡
Oxigênio (mg O ₂ /L)	6,69±0,04 ^a	6,17±0,06 ^b	7,05 ± 0,03 ^a	6,36± 0,03 ^b	
Temperatura (°C)	28,4±0,1	28,3±0,1	27,7±0,1	27,6±0,0	
pH	8,10±0,01	8,08±0,02	8,20±0,05	8,09 ±0,04	
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	155±2 ^b	165±1 ^a	154±2	157,±2	
NAT (mg N- NH ₄ ⁺ +NH ₃ /L)	0,07±0,01	0,06±0,01	0,04±0,01 ^b	0,07±0,0 ^a	
Nitrito (mg NO ₂ /L)	0,07±0,0	0,06±0,01	0,04±0,0	0,05±0,0	
Nitrato (mg NO ₃ /L)	19,45±1,49	10,95±1,0	20,46±2,5	13,95±2,0	
Osmolalidade (mOsm/kg)	-	-	448±8	1036±12	‡
Na ⁺ (g/L)	-	-	7,83±0,06	15,73±0,25	‡
Cl ⁻ (g/L)	-	-	8,31±0,02	12,30±0,02	‡
K ⁺ (mg/L)	-	-	198,51±0,0	448,82±5,07	‡
Ca ²⁺ (mg/L)	-	-	214,95±0,93	434,98±1,82	‡

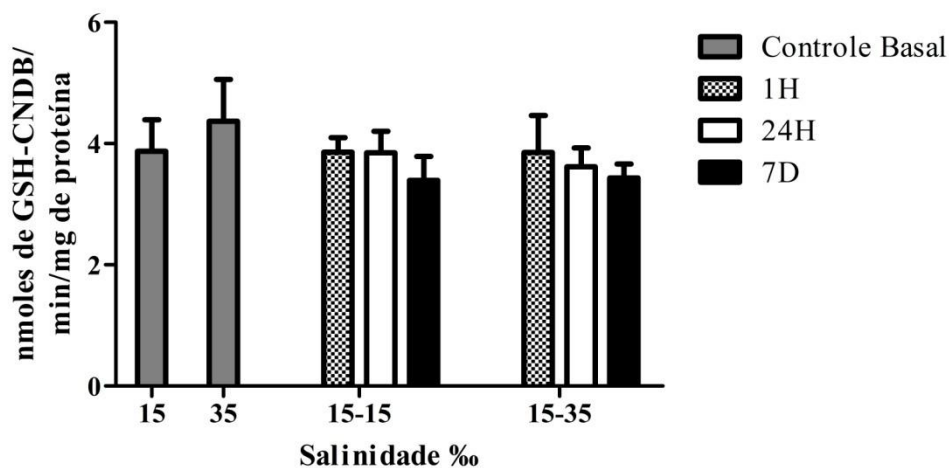
260 Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) para cada
 261 período. ‡: Variáveis não submetidas a análise estatística.

262 Sob os parâmetros bioquímicos avaliados, os peixes estão numa condição igual
 263 quando criados nas salinidades 15‰ e 35‰ (Figuras 6, 7 e 8 – controles basais).
 264 Quando transferidos de 15‰ para 15‰ ou de 15‰ para 35‰ os juvenis de *A. ocellaris*
 265 sofrem alterações fisiológicas relacionadas ao metabolismo oxidativo que promove uma
 266 melhora na ACAP, visto que seu resultado é menor (Figura 6). Entretanto não foram
 267 observadas diferenças significativas na atividade da GST (Figura 7) e TBARS (Figura
 268 8).



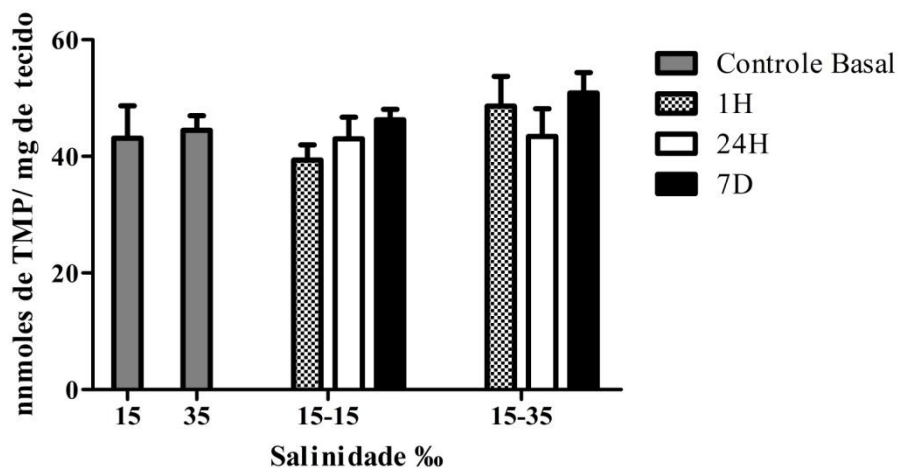
269

270 Figura 6: Capacidade antioxidante total frente um radical peroxil (ACAP) em juvenis de
 271 peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* “Black” transferidos de baixa para alta salinidade
 272 (15-35) e o controle (15-15). Letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre os
 273 tempos do mesmo tratamento, letras minúsculas diferentes significam diferenças entre
 274 os tratamentos no mesmo tempo e os asteriscos significam diferenças para com os
 275 controles basais (15, 35) ($p < 0,05$).



276

277 Figura 7: Glutationa S-Transferase (GST) em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion*
 278 *ocellaris* “Black” transferidos de baixa para alta salinidade. Não houve diferença
 279 significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).



280

281 Figura 8: Dano lipídico (TBARS) em juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*
 282 “Black” transferidos de baixa para alta salinidade. Não houve diferença significativa
 283 entre os tratamentos ($p > 0,05$).

284

285 3.4 Discussão

286

287 EXPERIMENTO 1

288 Os parâmetros de qualidade de água permaneceram adequados durante o período
 289 experimental. Entretanto, evidenciou-se que o processo de nitrificação foi dificultado no
 290 tratamento de salinidade 15‰, com uma elevação das concentrações de nitrito. O nível
 291 de nitrito foi superior na salinidade 15‰, sendo que este é mais tóxico em menor
 292 salinidade (SAMPAIO et al., 2002). O nível de nitrito, apesar de significativamente
 293 superior no tratamento 15‰, está muito abaixo da $CL_{50-96 h}$ de 109 mg/L e dos valores
 294 que causam alterações na natação e danos morfológicos nas brânquias (25 mg/L) para a
 295 espécie do presente estudo (MEDEIROS, 2014). Contudo, não sabemos as
 296 concentrações de nitrito para estas alterações interagindo com a salinidade para peixes-
 297 palhaço.

298 Os peixes não sobreviveram em salinidade 5‰. Isto difere do que ocorre com
 299 *Amphiprion akallopisos* espécie em que, diminuindo diariamente 2‰, 100% de
 300 mortalidade ocorreu em 3‰ e mortes só foram observadas abaixo de 5‰, sendo essa
 301 sua tolerância (DHANEESH et al., 2012a), porém no presente estudo a redução da
 302 salinidade foi mais rápida. O padrão de melhor desenvolvimento de juvenis em
 303 salinidades intermediárias, causado pelo menor custo energético osmorregatório
 304 estabelecido entre 8-20‰ por BOEUF & PAYAN (2001) em sua revisão, não foi

305 verificado no presente estudo. A redução da salinidade até 15‰ não apresentou uma
306 influência no crescimento de *A. ocellaris* “Black”, porém LE et al. (2009), observaram
307 um melhor desempenho zootécnico de *Amphiprion clarkii* na salinidade 15‰, quando
308 comparada com salinidade mais baixa (10‰) ou mais elevadas (20, 25, 30 e 35‰).

309 Com exceção da GST nenhum parâmetro bioquímico apresentou diferença
310 significativa. Os valores de GST superiores no tratamento 15‰ podem estar
311 relacionados ao maior nível de nitrito do tratamento, uma vez que a glutatona é uma
312 das moléculas capazes de diminuir a toxicidade do mesmo (DOBLANDER &
313 LACKNER, 1996) e/ou a maior concentração de oxigênio observada nesta salinidade
314 que pode gerar mais danos oxidativos no organismo (RIFEL et al., 2012). Os valores de
315 GST inferiores da salinidade 25‰ quando comparado a salinidade 35‰ pode ser
316 explicado pelas maiores compensações frente ao maior metabolismo osmorregulatório,
317 sugerido pelo aumento do número de ionócitos dos peixes (UCHIDA, et al., 1996;
318 KANG et al., 2012).

319 Segundo AN (2010), os níveis de enzimas oxidativas, Catalase (CAT),
320 Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx) de *Acanthopagrus*
321 *schlegeli* se elevam frente a transferência para um ambiente hiposmótico (35‰-10‰), e
322 também se observa um dano lipídico. A GPx é uma enzima dependente da glutatona
323 (VAN DER OOST, 2003), logo existe uma relação desta com a GST que foi
324 significativamente superior em 15‰ e 35‰ quando comparada a 25‰. Segundo PARK
325 et al. (2011a), níveis de SOD foram significativamente superiores para o peixe-palhaço
326 canela *Amphiprion melanopus* após transferência de 35‰ para 17,5‰ que se
327 mantiveram elevados após 48h, mas a GPx se eleva e retorna a valores próximos aos de
328 12h de exposição após 48h em ambiente hiposmótico, sendo observado um aumento no
329 dano lipídico (LPO) ao longo do tempo. Mas é importante observar que os dados
330 supracitados estão relacionados a mudanças abruptas e tempos relativamente curtos de
331 exposição.

332 Apesar das diferenças entre as atividades da GST, o fato de não existirem
333 diferenças nos parâmetros ACAP e TBARS levam a crer que mesmo que o organismo
334 utilize mais de uma enzima, seu metabolismo é suficiente para manter os mesmos níveis
335 de danos e a mesma capacidade frente a um desafio. Ou seja, a criação nas três
336 salinidades não causa prejuízo, sob a ótica dos parâmetros avaliados nos peixes.

337 EXPERIMENTO 2

338 Os parâmetros de qualidade de água só diferiram durante a aclimação, na
339 alcalinidade e temperatura, que ainda assim estão dentro de parâmetros aceitáveis para
340 espécie (HOFF, 1996).

341 Embora a transferência de 15 para 35‰ cause um aumento quase imediato na
342 capacidade do organismo em neutralizar radicais peroxil (ACAP), esta não demonstra
343 causar danos indicados pelo método de TBARS e a GST não altera sua atividade.
344 MARTINEZ-ALVAREZ et al. (2002) ao transferirem esturjões adultos, *Acipenser*
345 *nacarii*, de água doce para salinidade 35‰ observaram um aumento nas atividades de
346 catalase (CAT), superóxido-dismutase (SOD), glutatona-Peroxidase (GPx) e nos danos
347 lipídicos, que não retornam aos valores iniciais mesmo após 20 dias da exposição a
348 salinidade 35‰. Não foram encontrados trabalhos que relacionem a ACAP com
349 salinidade, entretanto uma vez que a atividade metabólica e a ativação de enzimas
350 oxidativas estão intimamente ligados em peixes (WILHELM-FILHO et al., 1993) este
351 parâmetro, que representa todo o esforço metabólico enzimático e não enzimático dos
352 peixes para detoxificar o organismo passa a sugerir alterações também em nas enzimas
353 clássicas avaliadas em trabalhos com salinidade.

354 A transferência de 15‰ para 35‰ mostra uma diminuição da área relativa
355 (Figura 6) que representa um aumento da ACAP, logo após 1h. Este fato pode estar
356 correlacionado a biologia do organismo (ERN, 2014), considerando que viver em uma
357 salinidade elevada 35‰, embora seja mais oneroso, é o que ocorre na natureza. O maior
358 metabolismo osmorregulatório, provado pelo aumento do número e alteração de
359 ionócitos e consequentemente trocadores iônicos em salinidade 35‰ é um fator que
360 leva a um aumento na ACAP uma vez que o organismo precisa se proteger mais dos
361 radicais gerados pelo maior metabolismo (KANG et al., 2012; SAKAMOTO &
362 McCORMICK, 2006; PARK, et al., 2011b; HSU et al., 2014; FENG et al., 2002).
363 Segundo KANG (2013) a mudança de salinidade e as consequentes mudanças nos
364 ionócitos passam por diferentes períodos de aclimação sendo o dia 7, o momento onde
365 os novos tipos de ionócitos começam a se proliferar em *Orizians dancena*, após a
366 transferência da água salgada para doce, e este período coincide com o aumento da
367 capacidade antioxidante de *A. ocellaris* do presente estudo. Esta rápida alteração do
368 organismo no intuito de aumentar a capacidade antioxidante total está relacionada
369 principalmente a salinidade. Entretanto o manejo de transferência apresenta um efeito
370 na ACAP uma vez que após 7 dias os valores deste parâmetro nos peixes transferidos de

371 15‰ para 15‰ também difere dos controles basais, o que está correlato ao gasto de
372 moléculas que neutralizam espécies reativas ou danos causados pelo manejo da
373 transferência, levando a crer que ambas respostas são compensatórias uma vez que não
374 são observados danos lipídicos (AMADO et al., 2009).

375 Estes dados demonstram que é possível cultivar peixes-palhaço em salinidade
376 15‰ com os benefícios de sustentabilidade cabíveis, e que a transferência destes para
377 uma maior salinidade (35‰) praticada pelo consumidor final não implica em danos ao
378 mesmo. Entretanto considerando as circunstâncias da produção, os manejos de
379 transporte e salinidade utilizada pela aquariofilia, ainda são necessários estudos sobre a
380 produção em baixa salinidade principalmente sobre as necessidades e suplementações
381 nutricionais com ingredientes e moléculas antioxidantes.

382

383 **3.5 Conclusão**

384 É possível criar peixes-palhaço *A. ocellaris* variedade “Black” em salinidade
385 15‰ de água marinha artificial sem nenhum prejuízo produtivo ou no bem-estar
386 fisiológico, diminuindo custos referentes à salinização na fase de recria em 57%, além
387 do que estes toleram transferências abruptas de 15 para 35‰ sem aumento na
388 mortalidade nem danos ao bem-estar sob a ótica dos parâmetros avaliados.

389

390 **3.6 Referências Bibliográficas**

391 AMADO, LL, ML GARCIA, PB RAMOS, RF FREITAS, B ZAFALON, JLR
392 FERREIRA, JS YUNES, JM MONSERRAT. 2009. A method to measure total
393 antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to
394 evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.*, 407: 2115–212.

395 AN, KW, NN KIM, HS SHIN, GYUNG-SUK KIL, CY CHOI. 2010. Profiles of
396 antioxidant gene expression and physiological changes by thermal and hypoosmotic
397 stresses in Black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). *Comp. Biochem. Physiol. A*,
398 156: 262–268.

399 BANERJEE, R. *Redox Biochemistry*. 2008. Wiley. 339 p.

400 BAUMGARTEN, MGZ, JMB ROCHA, LFH NIENCHESKI. 1996. *Manual de*
401 *Análises em Oceanografia Química*. Editora da FURG. Rio Grande, RS. 172p.

402 BROWN, C. 2015. Fish intelligence, sentience and ethics. *Anim. Cogn.*, 18:1–17.

403 CASTRO, C, A PÉREZ-JIMÉNEZ, I GUERREIRO, H PERES, M CASTRO-CUNHA,
404 A OLIVA-TELES. 2012. Effects of temperature and dietary protein level on
405 hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp.*
406 *Biochem. Physiol. A*, 163: 372–378.

407 DHANEESH, KV, KN DEVI, TTA KUMAR, T BALASUBRAMANIAN, K
408 TISSERA. 2012a. Breeding, embryonic development and salinity tolerance of
409 Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. *J. King Saud Univ. – Sci.*, 24: 201-209.

410 DHANEESH, KV, TTA KUMAR, G SWAGAT, T BALASUBRAMANIAN. 2012b.
411 Breeding and mass scale rearing of clownfish *Amphiprion percula*: feeding and
412 rearing in brackishwater. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 30(4): 528-534.

413 DOBLANDER, C, R LACKNER. 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by
414 trout hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1289: 270-274.

415 DREW, J, GR ALLEN, L KAUFMAN, PH BARBER. 2008. Endemism and Regional
416 Color and Genetic Differences in Five Putatively Cosmopolitan Reef Fishes.
417 *Conservat. Biol.*, 22(4): 965–975.

418 EBELING, JM, MB TIMMONS, JJ BISOGNI. 2006. Engineering analysis of the
419 stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of
420 ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257: 346–358

421 ERN, R, DTT HUONG, NV CONG, M BAYLEY, T WANG. 2014. Effect of salinity
422 on oxygen consumption in fishes: a review. *J. Fish Biol.*, 84: 1210–1220.

423 FAUTIN D, GR ALLEN. 1992. Anemonefishes and their host sea anemones. *Western*
424 *Australian Museum, Perth*, 160 p.

425 FENG, S-H, J-H LEU, C-H YANG, M-J FANG, C-J HUANG, P-P HWANG. 2002.
426 Gene expression of Na⁺-K⁺-ATPase α 1 and α 3 subunits in gills of the teleost
427 *Oreochromis mossambicus*, adapted to different environmental salinities. *Mar.*
428 *Biotechnol.*, 4: 379-391.

429 HABIG, WH, MJ PABST, WB JAKOBY. 1974. Glutathione S-transferases: the first
430 enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130–7139.

431 HOFF JR, F.H. 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on
432 marine clownfish. 1^o ed. *Aquaculture Consultants Inc. Dade City*. 212p.

433 HSU, H-H, L-Y LIN, Y-C TSENG, J-L HORNG, P-P HWANG. 2014. A new model
434 for fish ion regulation: identification of ionocytes in freshwater- and seawater-
435 acclimated medaka (*Oryzias latipes*). *Cell Tissue Res.*, 357: 225–243.

436 KANG, C-K, H-J TSAI, C-C LIU, T-H LEE, P-P HWANG. 2010. Salinity-dependent
437 expression of a Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter in gills of the brackish medaka *Oryzias*
438 *dancena*: A molecular correlate for hyposmoregulatory endurance. *Comp.*
439 *Biochem. Physiol. A*, 157: 7–18.

440 KANG, C-K; F-C LIU, W-B CHANG, T-H LEE. 2012. Effects of low environmental
441 salinity on the cellular profiles and expression of Na^+ , K^+ -ATPase and Na^+ , K^+ ,
442 2Cl^- cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine
443 fish *Monodactylus argenteus*. *Fish Physiol. Biochem.* 38: 665–678.

444 KANG, C-K, W-K YANG, S-T LIN, C-C LIU, H-M LIN, H-H CHEN, C-W CHENG,
445 T-H LEE, P-P HWANG. 2013. The acute and regulatory phases of time-course
446 changes in gill mitochondrion-rich cells of seawater-acclimated medaka (*Oryzias*
447 *dancena*) when exposed to hypoosmotic environments. *Comp. Biochem. Physiol.*
448 *A*, 164: 181–191.

449 KROUPOVA, H, J MACHOVA, Z SVOBODOVA. 2005. Nitrite influence on fish: a
450 review. *Vet. Med.-CZECH*, 50: 461-471.

451 KUMAR, TTA, T BALASUBRAMANIAN. 2009. Broodstock development, spawning
452 and larval rearing of the false clown fish, *Amphiprion ocellaris* in captivity using
453 estuarine water (Research Communications). *Current Sci.*, 97(10): 1483-1486.

454 KUMAR, TTA, SK SETU, P MURUGESAN, T BALASUBRAMANIAN. 2010.
455 Studies on captive breeding and larval rearing of clown fish [a¹], *Amphiprion sebae*
456 (Bleeker, 1853) using estuarine water. *Indian J. Mar. Sci.*, 39: 114-119.

457 LIM, LC, P DHERT, P SORGELOOS. 2003. Recent developments and improvements
458 in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquacult. Res.*, 34: 923-935.

459 MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, RM, MC HIDALGO, A DOMEZAIN, AE MORALES, M
460 GARCÍA-GALLEGO, A SANZ. 2002. Physiological changes of sturgeon
461 *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.*, 205:
462 3699–3706.

463 MEDEIROS, RS. 2014. Toxicidade aguda da amônia e do nitrito em juvenis do peixe-
464 palhaço *Amphiprion ocellaris*. Dissertação de mestrado, Rio Grande. 39p.

465 MONSERRAT, JM, ML GARCIA, J VENTURA-LIMA, M GONZÁLEZ, ML
466 BALLESTEROS, KSB. MIGLIORANZA, MV AMÉ, DA WUNDERLIN. 2014.
467 Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia*
468 *multidentata* (Anablápidae) and its influence on endosulfan accumulation and
469 toxicity. *Pestic. Biochem. Phys.*, 108: 8–15.

470 OAKES, KD, GJ VAN DER KRAAK. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting
471 oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to
472 pulp mill effluent. *Aquatic Toxicol.*, 63: 447-463.

473 PARK, MS, HS SHIN, CY CHOI, NN KIM, D-W PARK, G-S KIL, J LEE. 2011a.
474 Effect of hypoosmotic and thermal stress on gene expression and the activity of
475 antioxidant enzymes in the cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*. *Anim.*
476 *Cells Syst.*, 15(3): 219-225.

477 PARK, MS, HS SHIN, G-S KIL, J LEE, CY CHOI. 2011b. Monitoring of Na⁺/K⁺-
478 ATPase mRNA expression in the cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*,
479 exposed to an osmotic stress environment: profiles on the effects of exogenous
480 hormone. *Ichthyol. Res.*, 58: 195–201.

481 RESLEY, MJ, KA WEBB Jr., G J HOLT. 2006. Growth and survival of juvenile cobia,
482 *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system.
483 *Aquaculture*, 253: 398–407.

484 RHYNE, AL, MF TLUSTY, PJ SCHOFIELD, L KAUFMAN, JA MORRIS Jr. 2012
485 Revealing the appetite of the marine aquarium fish trade: the volume and
486 biodiversity of fish imported into the United States. *PLoS ONE* 7: e35808.

487 RIFFEL, APK, LO GARCIA, IA FINAMOR, EMH SACCOL, M MEIRA, C
488 KOLBERG, A HORST, W PARTATA, S LLESUY, B BALDISSEROTTO, MA
489 PAVANATO. 2012. Redox profile in liver of *Leporinus macrocephalus* exposed to
490 different dissolved oxygen levels. *Fish Physiol. Biochem.*, 38:797–805.

491 SAKAMOTO, T, SD McCORMICK. 2006. Prolactin and growth hormone in fish
492 osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 147: 24–30.

493 SAMPAIO, LA, LS FREITAS, MH OKAMOTO, LR LOUZADA, RV RODRIGUES,
494 RB ROBALDO. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys*
495 *orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture*, 262: 340–346.

496 SAMPAIO, LA, W. WASIELESKY, KC MIRANDA-FILHO. 2002. Effect of Salinity
497 on Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Juvenile *Mugil platanus*. *Bull.*
498 *Environ. Contam. Toxicol.* 68: 668–674.

499 SMITH, KF, MD BEHRENS, LM MAX, P DASZAK. 2008. U.S. Drowning in
500 Unidentified Fishes: Scope, Implications, and Regulation of Live Fish Import.
501 *Conserv. Lett.*, 1: 103–109.

502 TIMMONS, MB, JM EBELING. 2010. *Recirculating Aquaculture*. 2^o Ed. NRAC
503 Publications. 948p.

504 TLUSTY, M. 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium
505 trade. *Aquaculture*, 205: 203–219.

506 TORNHILL, DJ. 2012. Ecological Impacts and Practices of the Coral Reef Wildlife
507 Trade. *Defenders of Wild Life*. 179p.

508 UCHIDA, K, T KANEKO, K YAMAUCHI, T HIRANO. 1996. Morphometrical
509 Analysis of Chloride Cell Activity in the Gill Filaments and Lamellae and Changes
510 in Na⁺,K⁺-ATPase Activity During Seawater Adaptation in Chum Salmon Fry. *J.*
511 *Exp. Zool.*, 276:193-200.VAN DER OOST, R, J BEYER, NPE VERMEULEN.
512 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a
513 review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.

514 VIEIRA, S, R HOFFMANN.1989. *Estatística Experimental*. Editora Atlas, São Paulo,
515 SP.179p.

516 VOLPATO, GL, E GONÇALVES-DE-FREITAS, M FERNANDES-DE-CASTILHO.
517 2007. Insights into the concept of fish welfare. *Dis. Aquat. Org.*, 75: 165–171.

518 WABNITZ C, TAYLOR M, GREEN E, RAZAK T. 2003. From ocean to aquarium.
519 UNEP World Conservation Monitoring Centre, Cambridge, UK: UNEP-WCMC.
520 66p.

521 WEIBEL, E.R. 1980. *Stereological Methods*. London: Academic, 2:253–257.

522 WILHELM-FILHO, D, C GIULIVI, A BOVRRI. 1993. Antioxidant defences in marine
523 fish-I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 106 (2): 409-413.

524 WINSTON, GW, F REGOLI, AJ DUGAS Jr, JH FONG, BLANCHARD KA. 1998. A
525 rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of
526 antioxidants and biological fluids. *Free Radic. Biol. Med.*, 24: 480–93.

527 WITTENRICH, ML. 2007. *The complete illustrated breeder's guide to marine*
528 *aquarium fishes*. T.F.H Publications. Neptune city. 301p.

529 YANG, K, Q FAN, L ZHANG, B LI, Y GAO, K ZENG, Q WANG, S ZHU, G FANG.
530 2014. Effect of dissolved oxygen levels on growth performance, energy budget and
531 antioxidant responses of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson).
532 *Aquacult. Res.*, 1–9.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- 1
- 2 Peixes-palhaço *A. ocellaris* “Black” não sobrevivem em salinidade 5‰.
- 3 A criação nas salinidades 15, 25 ou 35‰ não causa diferença no desempenho
- 4 zootécnico.
- 5 Há um aumento proporcional no número de ionócitos com o aumento da salinidade.
- 6 Existem diferenças significativas na GST de peixes produzidos nas diferentes
- 7 salinidades, mas não nos danos, portanto não há prejuízo para os mesmos.
- 8 A transferência de 15 para 35‰ não causa mortalidade nos peixes.
- 9 Os peixes transferidos de salinidade 15 para 35‰ sofrem alterações na ACAP, mas não
- 10 nos danos, logo esta transferência não exige aclimação.
- 11 Peixes-palhaço podem ser criados em água artificial com salinidade 15‰ com
- 12 economia de 57% dos custos referentes à salinização.