UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

USO DIETÉTICO DE PIGMENTOS CAROTENOIDES EM ORGANISMOS AQUÁTICOS SUL-AMERICANOS

DANIEL PEREIRA DA COSTA

Belo Horizonte

2019

DANIEL PEREIRA DA COSTA

USO DIETÉTICO DE PIGMENTOS CAROTENOIDES EM ORGANISMOS AQUÁTICOS SUL-AMERICANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Doutorado em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho

Belo Horizonte

2019

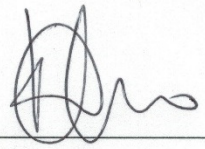
Costa, Daniel Pereira da, 1980-
C837u Uso dietético de pigmentos carotenóides em organismos aquáticos sul-americanos / Daniel Pereira da Costa. – 2019.
110p. : il.

Orientador: Kleber Campos Miranda Filho
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

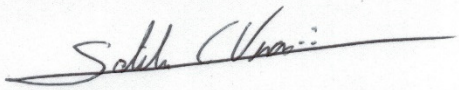
1. Aquicultura – Teses. 2. Suplementos dietéticos – Teses. 3. Camarão – Nutrição – Teses. 4. Peixe – Nutrição – Teses. 5. Molusco – Nutrição – Teses. 7. Corantes em alimentos – Teses. I. Miranda Filho, Kleber Campos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.3

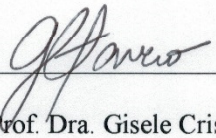
TESE defendida e aprovada no dia 15/02/2019 pela comissão avaliadora composta pelos seguintes membros:



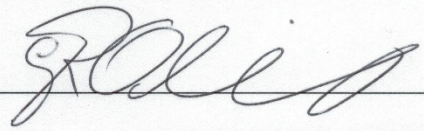
Presidente: Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho



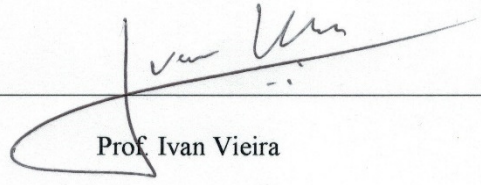
Prof. Dr. Galileu Crovatto Veras



Prof. Dra. Gisele Cristina Favero



Pesq. Dr. Giovanni Resende de Oliveira



Prof. Ivan Vieira

Dedico

Aos povos nativos do Continente Americano em especial aos da América do Sul, que souberam viver e conviver com a natureza de forma responsável e sustentável durante milênios. Presto meus sentimentos pelas condições que vivem hoje no nosso país e em diversos outros locais que não sabem respeitar e cuidar dessas pessoas. Esses povos tiveram uma vida dedicada a natureza, dominando espaços, construindo comunidades, aprendendo a aproveitar nossos animais e plantas nativos e seguir os ciclos próprios de vida e morte no ambiente selvícola.

Seus costumes, cultura, modo de vida, língua e víveres estão hoje ameaçados pela ocupação e dominação tecnológica irresponsável do mundo globalizado. Onde o indivíduo se vê obrigado a adaptar-se a um modo de vida consumista, descartável e insustentável.

A destruição dos espaços naturais como florestas e rios, o acúmulo de lixo, os vícios e problemas de caráter das classes dominantes vêm exterminando as antigas formas de organização comunitárias que antes eram livres e sustentáveis. Trocando tudo pela dependência de recursos industrializados, de custos elevados e pouco saudáveis.

Tentando resgatar um pouco da sabedoria e arte antiga dos nossos ancestrais e contextualizar ao modo de vida atual eu me coloquei o compromisso de sempre trabalhar com recursos da nossa fauna e flora nesta tese. Com isso pretendo mostrar às gerações futuras que o que necessitamos está e sempre esteve aqui. Que se voltarmos a pensar na vida como os antigos, poderemos um dia ter um mundo melhor em todos os aspectos.

"...mirou triste e apontou o morro, dizia: – 'Estou sempre pensando que lá por detrás dele acontecem outras coisas, que morro está tapando de mim, e que eu nunca hei de poder ver...' "

"...eu às vezes tenho uma saudade de uma coisa que eu não sei o que é, nem de donde, me afrontando..."

"Tudo que é bonito é absurdo."

"Eu quase que nada sei, mas desconfio de muita coisa."

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

"A gente quer passar um rio a nado, e passa: mas vai dar na outra banda é um ponto muito mais em baixo, bem diverso do em que primeiro se pensou. Viver nem não é muito perigoso?"

"Um vagalume se apaga descendo ao fundo do mar. - 'Mãe, que é que é o mar, Mãe?' Mar era longe, muito longe dali, espécie duma lagoa enorme, um mundo d'água sem fim, Mãe mesma nunca tinha avistado o mar, suspirava. -'Pois, Mãe, então mar é o que a gente tem saudade?"

"A gente olhava Mãe, imaginava saudade. Miguilim não sabia muitas coisas. — "Mãe, a gente então nunca vai poder ver o mar, nunca?" Ela glosava que quem-sabe não, iam não, sempre, por pobreza de longe. - "A gente não vai, Miguilim." O Dito afirmou: -"Acho que nunca! A gente é no sertão. Então por que é que você indaga" — "Nada não, Dito. Mas às vezes eu queria avistar o mar, só para não ter uma tristeza..."

"O homem nasceu para aprender, aprender tanto quanto a vida lhe permita."

João Guimarães Rosa

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador pelo apoio constante, por acreditar sempre no meu trabalho e pela liberdade que sempre nos dá para fazer nossas escolhas.

Ao co-orientador Prof. Dr. Afonso de Liguori Oliveira pelo apoio e auxilio com as análises de coloração no Laboratório de Carnes da instituição.

Ao co-orientador Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz pelo apoio e por fornecer espécimes de peixes para o trabalho.

A Embrapa – Amapá e todos seus colaboradores em especial ao pesquisador Dr. Jô de Farias Lima que foi um grande parceiro e proporcionou o perfeito desenvolvimento de nossos trabalhos acadêmicos com crustáceos e a bolsista Claudiana Lima Castilho que se empenhou tanto para auxiliar-me nas tarefas.

A Profa. Dra. Daniela Chemim de Melo Hoyos e ao bolsista MSc. Raphael Nogueira Bahiense pelo apoio e por fornecer espécimes de moluscos para o trabalho.

Aos membros das bancas de defesa e qualificação pela prestatividade.

Aos funcionários e professores da Pós-Graduação em Zootecnia e áreas correlatas da UFMG que deram seu apoio e contribuição para minhas atividades acadêmicas.

A Minas Camarão pelo apoio e disponibilização da estrutura e espécimes de crustáceos para o trabalho.

A todos da Maricultura que contribuíram e conviveram durante o doutorado.

A CAPES pela concessão da minha bolsa de doutorado.

Ao CNPq pela concessão de recursos ao projeto do qual fui participante na ocasião das pesquisas na Embrapa – Amapá.

A Poli-Nutri, a DSM Brasil e a Nanoplastic pelo fornecimento de material para pesquisa.

Aos meus pais, meus filhos, minha namorada e família em geral pelo apoio, companheirismo e toda a felicidade que me proporcionaram nesses anos.

E a todos que me deram apoio e ajudaram nesse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2
2.1 PIGMENTOS E COLORAÇÃO 2
2.2 APLICAÇÃO E ESPÉCIES POTENCIAIS 7
2.3 CONSIDERAÇÕES 9
3. OBJETIVOS 9
3.1 OBJETIVO GERAL 9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 9
4. REFERÊNCIAS 10
5. ARTIGO 1 - Uso de extrato de Urucum *Bixa orellana* e níveis de sombreamento no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos 17
6. ARTIGO 2 - Suplementação de astaxantina em ração comercial extrusada na alimentação de *Pomacea diffusa* 39
7. ARTIGO 3 - Efeito de carotenoides dietéticos em reprodutores de camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum* 54
8. ARTIGO 4 - Efeitos do uso dietético de astaxantina sintética na alimentação do pacamã *Lophiosilurus alexandri* um peixe siluriforme neotropical 82
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS 109

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - Uso de extrato de Urucum *Bixa orellana* e níveis de sombreamento no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água medidos durante o teste nos raceways em dois sombreamentos (%). 25

Tabela 2. Correlação entre os carotenoides totais contidos nos bioflocos e os níveis de clorofila a, coloração dos camarões in natura e cozidos..... 28

ARTIGO 2 - Suplementação de astaxantina em ração comercial extrusada na alimentação de *Pomacea diffusa*

Tabela 1. Índices zootécnicos mensurados nos diferentes tratamentos com adição de astaxantina sintética na alimentação de ampulária dourada *Pomacea diffusa* 48

ARTIGO 3 - Efeito de carotenoides dietéticos em reprodutores de camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum*

Tabela 1. Concentração de nutrientes e pigmentos na Matéria Seca (MS) das dietas experimentais de reprodutores de camarões da Amazônia..... 59

Tabela 2. Índices zootécnicos de camarões da Amazônia alimentados com dietas contendo diferentes fontes de pigmentos. 68

Tabela 3. Índices corporais e fator de condição relativo dos camarões da Amazônia cultivados com diferentes fontes de pigmentos. 69

Tabela 4. Composição centesimal dos camarões da Amazônia cultivados com diferentes fontes de pigmentos em matéria natural (MN). 70

Tabela 5. Índices reprodutivos das fêmeas de camarão da Amazônia cultivados com diferentes pigmentantes nas dietas. 70

ARTIGO 4 - Efeitos do uso dietético de astaxantina sintética na alimentação do pacamã *Lophiosilurus alexandri* um peixe siluriforme neotropical

Tabela 1. Índices zootécnicos de juvenis de Pacamã *L. alexandri* alimentados por 62 dias com ração comercial contendo diversos níveis de astaxantina sintética 91

Tabela 2. Parâmetro sanguíneos de juvenis de Pacamã *L. alexandri* alimentados por 62 dias com ração comercial contendo diversos níveis de astaxantina sintética 92

Tabela 3. Correlação entre os níveis teciduais e plasmáticos da carotenoids totais analizados pelo teste R de Speraman.....94

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1 – Uso de extrato de Urucum *Bixa orellana* e níveis de sombreamento no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

Figura 1. Relação entre o tempo de imersão da ração pigmentada em solução de água destilada com NaCl (25‰, pH 6,0 e 30°C) e o nível de bixina medido. 26

Figura 2. Relação entre pigmentos dos bioflocos com base na matéria seca (MS) e o tempo do experimento em dias sendo (A) carotenoides totais e (B) clorofila *a*. 27

Figura 3. Figura 3. Média (SD ±) da coloração medida nos camarões *L. vannamei* in natura L* (A) a* (B) b* (C) e cozidos L* (D) a* (E) b* (F) em diferentes dias de inclusão de urucum na ração.....31

ARTIGO 2 - Suplementação de astaxantina em ração comercial extrusada na alimentação de *Pomacea diffusa*

Figura 1. Padrões básicos de pigmentação em *Pomacea difusa* 43

Figura 2. Pontos de medições em *Pomacea diffusa*. 45

Figura 3. Concentração corporal de astaxantina em *Pomacea diffusa* alimentada com ração comercial de camarões com diversos níveis de incusão se astaxantina sintética após 60 dias de cultivo 49

Figura 4. Fator de condição (Kr) de *Pomacea diffusa* alimentada com ração comercial de camarões ao início do experimento (0), com 30 e com 60 dias de cultivo.....50

ARTIGO 3 - Efeito de carotenoides dietéticos em reprodutores de camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum*

Figura 1. Número de espermatóforos liberados (EL) por machos de camarão da Amazônia (n=6) durante 24 horas pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±). 71

Figura 2. Percentagem de espermatozoides vivos (EV) por machos de camarão da Amazônia (n=6) durante 24 horas pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±).....72

Figura 3. Concentração corporal de astaxantina (CCA) em fêmeas de camarão da Amazônia (n=3) pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±).....72

Figura 4. Concentração corporal de astaxantina (CCA) em machos de camarão da Amazônia (n=3) pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±).....73

Figura 5. Concentração de astaxantina em ovos (CAO) de camarão da Amazônia (n=6) após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±).....73

ARTIGO 4 - Efeitos do uso dietético de astaxantina sintética na alimentação do pacamã *Lophiosilurus alexandri* um peixe siluriforme neotropical

Figura 1. Carotenóides totais no plasma sanguíneo de *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética 93

Figura 2. Carotenoides totais no tegumento de L. alexandri alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética 93

Figura 3. Carotenoides totais no músculo de *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética 94

Figura 4. Retenção de carotenoides totais (%) no músculo de *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética.....94

Figura 5. Proporção de carotenoides totais do tegumento em relação ao músculo (x:y) em *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética 95

Figura 6. Fotomicrografia de fígado de juvenis de pacamã *L. alexandri* submetido a dietas com diferentes níveis astaxantina. Sendo 0 (A), 25 (B), 50 (C), 100 (D), 200 (E) e 400 mg/kg (F) de pigmento 96

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
ALC	Alcalinidade
N-AT	Nitrogênio na forma de Amônia Total
CAA	Conversão Alimentar Aparente
CAO	Concentração de Astaxantina nos Ovos
CCA	Concentração Corporal de Astaxantina
CE	Condutividade Elétrica
CIELAB	Espaço de cores definido pela Comissão Internacional de Iluminação
CNZ	Cinzas
DPF	Desovas Por Fêmea
EA	Eficiência Alimentar
EL	Espermatozóides liberados
EV	Espermatozoides Vivos
GB	Ganho de Biomassa
GC	Ganho de Comprimento
GP	Ganho de Peso
IGA-S	Índice Gastro-Somático
IGON-S	Índice Gonado-Somático
IHEP-S	Índice Hepato-Somático
Kr	Fator de condição relativo
LPT	Lipídeos Totais
OD	Oxigênio Dissolvido
O[g]F	Ovos por grama de Fêmea
R-FILÉ	Rendimento de Filé
R-DESCAB	Rendimento Descabeçado
SAL	Salinidade
SOB	Sobrevivência
SS	Sólidos Solúveis
TCE	Taxa de Crescimento Específico
TDS	Sólidos Solúveis Totais
UMD	Umidade

RESUMO

Uso dietético de pigmentos carotenoides em organismos aquáticos sul-americanos

Esse trabalho teve como objetivo conhecer as implicações do uso dietético de pigmentos carotenoides em alguns organismos aquáticos nativos da América do Sul com potencial aquícola. Os artigos se pautaram em: Testar a influência do uso de extrato de urucum *Bixa orelana* na dieta final de camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* no sistema de bioflocos em fazenda de cultivo comercial na pigmentação do produto final; Testar o uso de astaxantina sintética na dieta do molusco ornamental Ampulária *Pomacea diffusa* na fase de crescimento e suas implicações; Determinar a acumulação de carotenoides e implicações no desempenho reprodutivo em reprodutores de Camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum* mediante o uso de extratos de buriti *Mauritia flexuosa*, urucum *Bixa orelana* e astaxantina sintética; Determinar a influência do uso de astaxantina sintética na dieta de Pacamã *Lophiosilurus alexandri* no desenvolvimento, pigmentação, parâmetros sanguíneos e hepáticos. Os resultados dos experimentos demonstraram que a bixina aspergida na superfície da ração de camarão sofre lixiviação para a água salgada em níveis significativos a partir de 2 h de imersão. Os carotenoides presentes no biofloco do cultivo de camarão branco do Pacífico tiveram baixa correlação com a coloração (L*a*b*) dos camarões. O tratamento com sombreamento de 80% e alimentação com ração contendo 1.235 mg/Kg de bixina durante foi o que apresentou resultados mais estáveis na coloração dos camarões in natura e cozidos nas várias coordenadas do sistema CIELAB. As ampulárias alimentadas com ração comercial de camarão marinho apresentaram melhor conversão alimentar, elevados valores de eficiência alimentar e fator de condição acima da média inicial, o que demonstra que esse alimento pode ser utilizado para seu cultivo. A suplementação dietética de astaxantina sintética não resultou em aumento

significativo da concentração desse pigmento na musculatura do molusco gastrópode. A alimentação com ração comercial melhora o fator de condição de reprodutores de camarão da Amazônia, principalmente no caso das fêmeas. A adição de pigmentos carotenoides na dieta desses crustáceos proporciona maior produção de espermatóforos e sobrevivência de espermatozoides. Dietas contendo bixina natural e astaxantina sintética contribuem para a acumulação de astaxantina corporal nos camarões e nos ovos. Não foi observada nenhuma diferença no desempenho dos animais testados com os diferentes pigmentantes. O pacamã consegue aproveitar a astaxantina da dieta para deposição de carotenoides no músculo e tegumento, contudo, sem influenciar no seu desenvolvimento e condição nutricional na fase de vida estudada pelo período de cultivo de dois meses. Desta forma, altas doses desse pigmento parecem contribuir para a redução dos níveis da enzima hepática AST sem influenciar a condição histológica do fígado. Para o melhor aproveitamento da astaxantina sintética como pigmentante e coloração mais equilibrada entre o músculo e o tegumento recomenda-se o nível de inclusão na dieta do pacamã de 100mg/Kg desse carotenoide.

Palavras-Chave: Aditivos, camarão, cor, molusco, peixe, pigmentação.

ABSTRACT

Dietary use of carotenoid pigments in south americans aquatic organisms

This work aimed to know the implications of the dietary use of carotenoid pigments in some aquatic organism's native to South America with aquaculture potential. The articles were based on: Testing the influence of the use of anatto extract *Bixa orelana* on the final diet of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the BFT system on commercial farm in pigmentation of the final product; To test the use of synthetic astaxanthin in the diet of the ornamental mollusk Ampularia *Pomacea diffusa* in the growth phase and its implications; To determine the accumulation of carotenoids and reproductive performance in breeding of Amazonia shrimp *Macrobrachium amazonicum* using the extracts of buriti *Mauritia flexuosa*, anatto *Bixa orelana* and synthetic astaxanthin; To determine the influence of the use of synthetic astaxanthin on the diet of Pacamã *Lophiosilurus alexandri* in the development, pigmentation, blood and liver parameters. The results of the experiments demonstrated that bixin sprinkled on the surface of the shrimp feed undergo leaching to salt water at significant levels from 2 h of immersion. The carotenoids present in the biofloc of the *L. vannamei* culture had a low correlation with the shrimp (L * a * b *) coloration. The treatment with 80% shading and feed containing 1,235 mg/Kg of bixin for 14 days was the one that presented the best results in the coloration of the shrimps in natura and cooked in the various coordinates of the CIELAB system. The ampularias fed commercial shrimp feed had better feed conversion, high feed efficiency and condition factor above the initial average, which demonstrates that this feed can be used for their cultivation. Dietary supplementation of synthetic astaxanthin did not result in a significant increase in the concentration of this pigment in the musculature of the gastropod mollusc. Feeding with commercial feed improves the condition factor of Amazon shrimp breeders, especially in the case of females. The addition of carotenoid pigments in the diet of these crustaceans provides greater production of spermatophores and sperm survival. Diets

containing natural bixin and synthetic astaxanthin contribute to the accumulation of body astaxanthin in shrimp and eggs. No differences were observed in the performance of the animals tested with the different pigmenters. Pacamã is able to take advantage of dietary astaxanthin for deposition of carotenoids in muscle and integument. However, it did not influence its development and nutritional condition in the life stage studied by the two-month growing period. However, high doses of this pigment appear to contribute to the reduction of levels of the AST liver enzyme without influencing the histological condition of the liver. For the best use of synthetic astaxanthin as a pigment and more balanced staining between the muscle and the integument, the level of inclusion in the pacaman diet of 100 mg/Kg of this carotenoid is recommended.

Keywords: Additives, shrimp, color, mollusk, fish, pigmentation.

1. INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos possuem diversas cores que são determinadas pelas substâncias pigmentantes acumuladas no seu organismo, que podem ser da cor preta dada pela melanina, cores metalizadas dadas por bases nitrogenadas, cores fosforescentes dadas por proteínas luminescentes e outras provenientes de xantofilas e antocianinas (Price et al. 2008; Mahalwar et al. 2014). Dentre as cores do pescado, a mais explorada na aquicultura é a vermelha e suas variações de tonalidade que vão ao laranja ou amarelo. A coloração vermelha de peixes, crustáceos e moluscos é um fator determinante na escolha do pescado pelo consumidor. Para as variedades pigmentadas de organismos aquáticos, a cor da pele é um atrativo no mercado, que estimula seu consumo principalmente pela presença de astaxantina (3,3'-dihidroxi-β-caroteno-4,4diona), um carotenoide não sintetizável por esses animais, que deve ser incluído nas suas dietas em sistemas de cultivo (Kamata et al. 1990).

Na pele dos peixes e de outros organismos aquáticos, os cromatóforos são os responsáveis pelo armazenamento dos carotenoides e pela expressão da cor, dando as características que podem ser verificadas visualmente pelo consumidor para uma boa apresentação de pratos, principalmente com peixes frescos. Já a coloração muscular de peixes, crustáceos e moluscos se dá pelo acúmulo de carotenoides em depósitos de gordura intramuscular ou abaixo do exoesqueleto, no caso dos crustáceos. É comum verificar predileção de consumo por filés bem pigmentados em salmonídeos, bem como de crustáceos com a carapaça colorida e de moluscos que apresentem também cor pronunciada (Daniel et al. 2017). No caso de espécies ornamentais, a coloração se faz ainda mais determinante para a atração estética pelo espécime.

Algumas espécies de peixes tropicais da América do Sul como, a pirarara *Phractocephalus hemioliopterus*, a piracanjuba *Brycon orbignyanus* e o surubim *Pseudoplatystoma fasciatum*, possuem a capacidade de pigmentação muscular, sendo que a última espécie tem uma pigmentação característica comprovadamente estimulada pela inclusão de milho na dieta (Bicudo et al. 2012).

No caso dos camarões, a coloração vermelha do produto cozido parece dar ao consumidor a impressão de um produto mais atrativo e é comum na maioria das espécies consumidas. O camarão marinho do Pacífico *Litopenaus vannamei* e outros camarões peneídeos têm a capacidade de depositar carotenoides da dieta e a intensidade de cor pode ser

manipulada, assim como a dos salmonídeos para obter o produto com a tonalidade desejada de acordo com o mercado (Daniel et al. 2017).

Nos moluscos, a cor está presente tanto no corpo quanto na concha e pode ser um atrativo para o consumidor, tanto para alimentação quanto para quem deseja adquirir animais ornamentais. A presença de pigmentos nos ovos de moluscos é uma estratégia comum e visa aumentar a proteção frente aos processos oxidativos (Tsushima et al. 1997).

A possibilidade de poder elaborar e oferecer produtos diferenciados e variados pela manipulação da coloração do pescado é uma estratégia de mercado que já é explorada na salmonicultura e na carcinicultura, bem como na produção de alimentos para peixes ornamentais e tem um grande potencial para ser explorado em outros ramos da aquicultura. Além do apelo da cor, a quantidade de astaxantina presente nestes produtos está relacionada com a manutenção da saúde do consumidor, uma vez que essa substância tem elevado poder antioxidante e outras propriedades que a fazem ser um importante suplemento alimentar (Yang et al. 2011).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PIGMENTOS E COLORAÇÃO

A pigmentação dos peixes em geral é influenciada pelas fontes de carotenoides (sua estrutura química e concentração dietética), bem como pela espécie em questão, condições ambientais e pelos lipídios da dieta (Ingle de la Mora et al. 2006; Yanar et al. 2011; Hynes et al. 2009; Lee et al. 2010). O valor de mercado desses animais pode ser fortemente influenciado pela sua cor (Harpaz e Padowicz 2007).

Os carotenoides desempenham diversas funções no organismo de peixes, crustáceos e moluscos como: estimular o sistema imunológico, aumentar a resistência ao estresse, promover o desenvolvimento embrionário, crescimento e maturação das gônadas (Petit et al. 1991; Olson 1993; Menasveta et al. 1994; Mantiri et al. 1995; Niu et al. 2011) e aumentar significativamente o desempenho e a precocidade reprodutiva (Scabini et al. 2011; Vilchez et al. 2011).

A astaxantina possui a maior atividade antioxidante entre os carotenoides naturais, possuindo um potencial de quelação de radicais livres, superior ao da vitamina E (Miki 1991). Adicionalmente, inibe a peroxidação lipídica mitocondrial e contribui para a estabilidade da membrana celular (Goto et al. 2001). Yang et al. (2013) classificaram as funções da astaxantina no organismo humano como anti-inflamatória, hepato-protetiva, antidiabética e preventiva de doenças cardiovasculares.

A deficiência de astaxantina na dieta de camarões cultivados pode comprometer o seu desempenho produtivo e proporcionar o aparecimento de doenças (Howell e Mattheus 1991; Kurmaly 1993; Arango 1999; Wang et al. 2018). No cultivo comercial de larvas de *L. vannamei*, as exigências de carotenoides são supridas com o consumo de microalgas e náuplios de artêmia, além de alimentos comerciais micronizados ricos em pigmentos. Uma vez suspenso o fornecimento de alimento vivo, a ração é a única fonte de pigmentos para as pós-larvas e juvenis de camarão durante o processo de engorda (Aguirre-Hinojosa et al. 2012).

A cor vermelha evidenciada nos camarões de corte só aparece com a desnaturação das carotenoproteínas, pois a astaxantina é liberada da molécula proteica e fica visível neste espectro (Howell e Matthews 1991).

Na musculatura dos moluscos pode-se identificar a presença de cromatóforos repletos de cor avermelhada ou alaranjada, proveniente de pigmentos carotenoides, os quais são adquiridos pela dieta do animal (Tsushima et al. 1997). Como o valor e a importância dos organismos ornamentais está geralmente ligada, dentre outros fatores, à sua cor, um acréscimo na pigmentação pode ser interessante do ponto de vista comercial dando melhor aspecto e aproveitando todo o potencial de expressão da cor naturalmente inerente nos moluscos (Daniel et al. 2017).

A capacidade da transformação de pigmentos precursores em astaxantina, processo comumente observado em camarões e em alguns peixes, varia de acordo com a espécie de organismo aquático, podendo ser inexistente, ou possível, a partir de carotenos ou de algumas xantofilas, por meio da sua rota metabólica (Latscha 1991; Schiedt et al. 1993; Gouveia et al. 2003; Güroy et al. 2012).

Algumas fontes de astaxantina são utilizadas na alimentação de organismos aquáticos com eficiência, temos como exemplo as algas unicelulares *Haematococcus pluvialis* (Chien e Shiau 1998) e *Chlorella zofingiensis* (Liu et al. 2013), a levedura *Phaffia rhodozyma* (Andrews e Starr 1976; Johnson et al. 1980), e os resíduos do processamento industrial de crustáceos como carapaça e cefalotórax (Chen e Meyers 1982).

Outra opção é o uso de astaxantina sintética proveniente de indústrias químicas, com um custo elevado, chegando a US$ 2.500,00 a 3.000,00/kg (Yang et al. 2011), o que acaba comprometendo sua utilização em rações comerciais para o pescado de corte, pela elevação do custo de produção das dietas.

Formas alternativas para aumentar a quantidade de astaxantina no pescado têm sido estudadas atualmente. Uma delas é a adição de carotenoides precursores de astaxantina, com os

quais os peixes e crustáceos consigam fazer suas transformações e suprir as suas necessidades. Para isso, tem-se utilizado principalmente vegetais superiores como: páprica *Capsicum* sp. (Arredondo-Figueiroa et al. 2004; Göçer et al. 2006), flor de cravo amarelo *Tagetes erecta* (Vernon-Carter et al. 1996; Arredondo-Figueiroa et al. 1999; Lucien-brun e Vidal 2006; Aguirre-Hinojosa et al. 2012), raiz de cenoura *Daucus carota* (Baron et al. 2008; Kop et al. 2010), cianobactéria *Spirulina* (Chien e Shiau 1998; Regunathan e Wesley 2006; Güroy et al. 2012) e a levedura *Rhodotorula* spp. (Frengova e Beshkova 2006).

Contudo, a eficiência desses alimentos, comparada com a utilização de fontes diretas de astaxantina é inferior, pois a capacidade de conversão de carotenoides dos camarões peneídeos é limitada (Niu et al. 2011). Por isso esforços são direcionados para buscar novas tecnologias de produção deste carotenoide a baixo custo e em larga escala para atender essa demanda.

O gênero *Adonis* possui uma anomalia que o faz ter em suas espécies dois genes que participam dos processos bioquímicos de cetolação por reações diferentes das de outras plantas, produzindo astaxantina a partir do betacaroteno (Cunningham e Gantt 2005; 2011). O adonis vermelho possui teores acima de 80% de astaxantina no seu perfil de carotenóides totais nas formas livres, quais sejam, monoéster e diéster (Kamata et al., 1990; Maoka et al. 2011).

Kamata et al. (1990) foram os primeiros a testar a eficiência dessa planta como fonte de astaxantina para a aquicultura. Trabalhando com a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* como espécie de referência, os referidos autores estudaram a inclusão das pétalas frescas de *Adonis aestivalis* em ração, bem como o seu extrato (isolado por solventes orgânicos) de carotenoides, obtendo aumento no incremento de pigmento nos músculos dos peixes com ambos os aditivos em relação ao controle. Contudo, foi evidenciada uma expressiva mortalidade (30%) dos peixes alimentados com pétalas devido à presença de glicosídeos tóxicos. Portanto, para a utilização prática dessas plantas faz-se necessário a determinação de métodos eficientes e viáveis de processamento das pétalas de *Adonis* para eliminar sua toxicidade, tal qual, a extração por solventes orgânicos como o hexano, acetona e álcool.

Até pouco tempo atrás se acreditava ser exclusividade do gênero *Adonis* a produção de astaxantina em vegetais superiores. Atualmente um estudo de Banerjee et al. (2017) revelou que diversas espécies de mangue também produzem esse pigmento em suas folhas, e em maiores concentrações nas que se encontram submersas e em alta salinidade. Revelaram também a diferença entre espécies do potencial de produção do pigmento que segue em ordem da maior para a menor temos Sundari (*Heritiera fomes*) > Api-api (*Avicennia alba*) > mangue branco (*Avicennia marina*) > mangue indiano (*Avicennia officinalis*) > mangue maçã

(*Sonneratia apetala*). Isto chama a atenção para o potencial da produção de plantas aquáticas para extração de astaxantina em substituição à produção por algas que tem alto custo de operação.

Outra forma de buscar a produção de astaxantina e outros ceto-carotenóides por vegetais superiores é por modificação genética como feito por Mann et al. (2000) implantando genes da alga clorófita *Haematococcus pluvialis* em tabaco (*Nicotiana tabacum*), o que abre a possibilidade futura de se fazer algo semelhante em frutíferas e outras plantas alimentares.

As análises da coloração dos alimentos e de organismos aquáticos podem ser feitas por diferentes métodos, sendo os mais comuns os de colorimetria ou de espectrofotometria. De acordo com Skrede (1987), a análise colorimétrica da pele, da superfície muscular dos peixes e da superfície corporal dos camarões, geralmente é realizada por espectroscopia reflexiva utilizando colorímetro digital ou aparelho similar de acordo com o sistema CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) L*a*b*; onde L= luminosidade; a= espectro vermelho a verde; b= espectro amarelo a azul. Normalmente são amostrados vários pontos no animal estudado, sendo a média dos valores nos diversos pontos, considerada para análise estatística. No método de espectrofotometria, as análises quantitativas de astaxantina são feitas nos moldes da metodologia proposta por Aguirre-Hinojosa et al. (2012), procedendo a extração do carotenoide por solventes e fazendo a leitura quantitativa em espectrofotômetro.

Outros métodos mais dispendiosos e menos comuns também podem ser utilizados nas análises, como o de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna, como descrito por Dissing et al. (2011).

Vegetais utilizados como alimento na Região Amazônica, tais como, o buriti *Mauritia flexuosa* e o urucum *Bixa orellana* são ricos em pigmentos (Saini et. al. 2015). Estes têm a possibilidade de promover efeitos positivos como precursores de astaxantina.

O urucum, como é conhecido o corante da semente do urucuzeiro (*Bixa* spp.), é largamente utilizado na indústria alimentícia em todo o mundo para coloração de queijos, carnes, temperos e outros usos. Suas principais substâncias pigmentantes são: a bixina (vermelha), responsável por cerca de 80% dos carotenoides e a nor-bixina (amarela), ambas lipossolúveis na forma natural, sendo a última hidrossolúvel na forma salina industrializada. A planta, originária da América do Sul e, utilizada inicialmente pelos povos nativos, atualmente é o corante alimentício mais utilizado no Brasil (Food Ingredients Brasil 2009).

Devido ao seu poder de pigmentação e fácil obtenção por cultivo comercial em larga escala, essa espécie já foi testada para alimentação animal em aves com bons resultados para

produção de ovos e pele pigmentados (Silva et al. 2006). Na aquicultura, o urucum já foi testado em algumas espécies obtendo resultados positivos na pigmentação de pele em kinguio *Carassius auratus* (Fries et al. 2014) e de filé em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Safari e Atash 2015).

A possibilidade do uso do urucum como fonte de pigmentos para a aquicultura pode minimizar custos com pigmentos artificiais importados, proporcionando a substituição dessas substâncias por um produto natural e com potencial para produção orgânica.

O buriti é um fruto de polpa amarelada que apresenta potencial para comercialização como alimento e possui em sua composição destacada concentração de α e β caroteno e de vitamina C. Vem sendo utilizado como alimento funcional para estimular a imunidade e como fonte de retinóides (Sandri et al. 2017). Estudos têm sido realizados para se testar o uso desse ingrediente na alimentação de peixes (Palacios et al. 2006). Contudo, ainda não foi determinada a sua contribuição efetiva para o fornecimento de pigmento e conversão deste em astaxantina por organismos aquáticos.

Outros pigmentos além da astaxantina conferem cor e contribuem com os processos de desenvolvimento e reprodução de organismos aquáticos, conforme a espécie e a fase de desenvolvimento. Kyrychuk e Muzyka (2017) observaram que moluscos de água doce apresentavam diferentes níveis de betacaroteno e xantofilas de acordo com o sexo, fase de desenvolvimento e estágio reprodutivo de gastrópodes (*Lymnea stagnalis* e *Planorbarius purpura*) e bivalves (*Unio pictorum* e *Anodonta cygnea*). Tabakaeva e Tabakaev (2015) observaram que esta diferença de acumulação de pigmentos também ocorre nos tecidos dos moluscos podendo ser diferente no manto, na musculatura esquelética, na musculatura adutora e nos órgãos internos de *Anadara broughtoni*.

Xantofilas, como a zeaxantina, luteína, cantaxantina e o carotenoide betacaroteno, são fequentemente encontradas em organismos aquáticos e segundo sua importância espécie-específica contribuem para o bem-estar e pigmentação desses animais da mesma forma que a astaxantina em outros (Tsushima et al. 2002; Niu et al. 2011; Bicudo et al. 2012). A cantaxantina é uma xantofila que tem seu uso limitado em alguns países do mundo. A União Europeia suspendeu seu uso na alimentação de salmonídeos e outros peixes animais de corte em 2015 e permite apenas o uso para peixes e aves ornamentais na quantidade máxima de 100 mg/kg de ração (EFSA 2018). Isto se deve principalmente pelo efeito genotóxico cumulativo dessa substância (EFSA 2014). Não se tem notícia de outros carotenoides que possuam efeito deletério, sendo seu uso em geral irrestrito e benéfico.

2.2 APLICAÇÃO E ESPÉCIES POTENCIAIS

O camarão branco do Pacífico, conhecido também como *Litopenaeus vannamei*, é cultivado desde a década de 90 no Brasil (MPA 2010), sendo a espécie de crustáceo mais cultivada para fins de consumo alimentar no país. O início da produção de *L. vannamei* ocorreu nos estados da região Nordeste do Brasil e destinava-se em sua maioria ao mercado externo, mas atualmente tem encontrado no mercado nacional um maior consumo e aceitação. A forma mais comum de venda desse crustáceo, no interior do país, é cozida e congelada, quando deve ter um aspecto avermelhado uniforme.

A espécie é endêmica da costa americana do Oceano Pacífico entre o México e o Peru e foi introduzida no Brasil na década de 80, por se tratar da principal espécie de crustáceo interesse zootécnico do Hemisfério Ocidental. Entre as características produtivas mais interessantes estão: rusticidade, rápido crescimento, boa proporção de musculatura em relação ao corpo, aceitação de alimentos variados, boa conversão alimentar, tolerância a variáveis condições ambientais e baixa agressividade (ABCC 2014).

L. vannamei está presente na maioria dos estabelecimentos que comercializam pescado na Região Sudeste do Brasil. Estudos indicam que sua coloração mais acentuada tendendo a cor laranja é preferencial ao consumidor final, o que facilita sua aceitação no mercado podendo proporcionar maior precificação de mercado (Parisenti et al. 2011). De acordo com Paibulkichakul et al. (2008), a astaxantina é o principal pigmento acumulado pelos camarões e possui papel fundamental no desempenho reprodutivo de *Penaeus monodon*, outro camarão da família Penaeidae.

Os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* demonstram melhor desempenho reprodutivo em reposta ao uso de alimentos ricos em carotenoides na sua dieta (Tizkar et al. 2014). O camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum* é uma das espécies mais produzidas na Região Norte do Brasil, tanto pela pesca artesanal para consumo direto, quanto pelo cultivo relacionado a recria e engorda de juvenis provenientes da pesca em gaiolas (Marques et al. 2012). Sua ocorrência natural é na região de clima de monções da Amazônia e já foi introduzido para cultivo comercial em diversos pontos da América do Sul (Silva et al. 2017). Esta espécie quando cozida também apresenta coloração avermelhada devido à acumulação dos pigmentos no seu organismo.

As ampulárias, moluscos gastrópodes do gênero *Pomacea*, são amplamente difundidas para o uso como espécies ornamentais (Ng et al. 2016). Existem populações desse gênero (com

crescimento expressivo) tidas como espécies invasoras, introduzidas em alguns países asiáticos, europeus e do continente americano (Morrison e Hay 2011; Accorsi et al. 2014; Horgan et al. 2014; Karraker e Dudgeon 2014).

As ampulárias mais comuns no aquarismo são das linhagens coloridas da espécie *Pomacea diffusa*, a qual tem destacado apelo estético como organismo ornamental e, pelo seu hábito alimentar de consumir perifíton e bentos, tem utilidade como organismo limpador de aquários. Sua origem é amazônica e tem ampla distribuição no mundo (Ishikawa 2018). Os padrões de cor da concha e da musculatura desses moluscos chamam a atenção e determinam a escolha do espécime a ser adquirido pelos compradores e cultivadores dessa espécie no aquarismo.

Uma característica comum dos filés dos siluriformes é a pigmentação natural amarelada (Bicudo et al. 2012), a qual pode dar um aspecto positivo ao produto final, servindo como característica para diferir o produto de outros similares. Esses peixes possuem a capacidade de armazenar diversos carotenoides que dão aspecto natural à pele e ao músculo (Tsushima et al. 2002). Contudo, existe a necessidade de se pesquisar uma forma de utilização de aditivos nas rações desses peixes siluriformes visando uma pigmentação atrativa que estimule o consumidor a dar preferência a estas espécies. Como no caso do pacamã *Lophiosilurus alexandri*, que é uma espécie que apresenta características que a indicam como potencial para o cultivo comercial segundo Costa et al. (2014), esta pode ser estudada e programas alimentares podem desenvolvidos para proporcionem cor atrativa próxima a dos exemplares selvagens.

Como exemplo, podemos destacar o pargo vermelho (*Pagrus pagrus*), peixe marinho conhecido por sua coloração vermelha intensa na pele, e estudos têm sido direcionados para otimizar essa característica na sua produção comercial, dando aspecto natural semelhante aos peixes provenientes da pesca. Sem a adição de carotenoides na alimentação, a referida espécie se apresenta com a coloração pálida (Tejera et al. 2007) e tem prejuízos no seu desenvolvimento normal. Esses resultados são visíveis também em outras espécies de peixes marinhos como o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), o qual apresenta melhor desenvolvimento de formas jovens quando alimentado com dietas contendo fontes de carotenoides naturais ou sintéticas (Sallam et al. 2017).

Moluscos bivalves, como o mexilhão (*Mytilus* spp.), têm a capacidade de absorção rápida (1 a 3 dias) e acumulação de carotenoides suplementados na alimentação (Graydon et al. 2012). Esta característica pode ser interessante para o uso de pigmentos ao final do cultivo para dar melhor aspecto ao produto a ser comercializado.

Pham et al. (2014) observaram que o uso de fontes naturais de carotenoides com páprica e a microalga *Haematococcus* promoveram a pigmentação da pele, aumento na concentração de carotenoides e da atividade antioxidante de forma semelhante ao uso de astaxantina sintética no linguado japonês *Paralichthys olivaceus*.

O potencial de utilização de novas fontes de carotenoides para a aquicultura e as espécies que empregam esses pigmentos, para expressar cor e melhorar o seu desempenho produtivo, formam uma linha de pesquisa que tem importância crescente na produção de organismos aquáticos para consumo humano e para fins de ornamentação.

2.3 CONSIDERAÇÕES

A coloração de peixes, crustáceos e moluscos tem papel fundamental para a qualidade visual do pescado, sendo a cor vermelha, a de principal importância para a aquicultura. A sua intensificação é feita promovendo o aumento na quantidade de astaxantina e/ou outros pigmentos presentes no pescado através da alimentação. Esses carotenoides têm outras funções no metabolismo do animal que beneficiam seu desenvolvimento e podem enriquecê-lo como alimento para uso humano ou para uso ornamental.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer as implicações do uso dietético de pigmentos carotenoides em alguns organismos aquáticos nativos da América do Sul com potencial aquícola.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a influência do uso de extrato de urucum *Bixa orelana* na dieta final de camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* no sistema de bioflocos em fazenda de cultivo comercial na pigmentação do produto final.

- Testar o uso de astaxantina sintética na dieta do molusco ornamental ampulária *Pomacea diffusa* durante a fase de crescimento e suas implicações.

- Determinar a acumulação de carotenoides e implicações no desempenho reprodutivo em reprodutores de camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum* mediante o uso de extratos de buriti *Mauritia flexuosa*, urucum *Bixa orelana* e astaxantina sintética.

- Determinar a influência do uso de astaxantina sintética na dieta de Pacamã *Lophiosilurus alexandri* no desenvolvimento, pigmentação, parâmetros sanguíneos e hepáticos.

4. REFERÊNCIAS

ABCC – Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (2014) Estatísticas da criação de camarões no Brasil, 2014. Disponível em: http://abccam.com.br/site/category/s1-abcc/c4-publicacoes/ /09/2018. Acesso em 25/01/2019.EFSA

Accorsi A, Ottaviani E, Malagoli D (2014) Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata*. Fish Shellfish Immunol 38:56-64.

Aguirre-Hinojosa E, Piña-Valdez P, Garza-Aguirre MC, Guzmán-Ramirez LD, Montoya-Olvera R, Torres-Quiroga J, Nieves-Soto M (2012) Efecto de las xantofilas de la flor de cempaschúhil *Tagetes erecta L.* em la acumulación de astaxantina y la sobrevivência de postlavas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Rev Mex Ing Quím 11:249-257.

Andrews AG, Starr MP (1976) (3R3'R) - Astaxanthin from yeast *Phaffia Rodozyma*. Phytochemistry 15(6):1009-1011.

Arango J (1999) Resumen del evaluacion de la utilizacion de astaxantian en la nutricion de camarones. In: Avances em nutrición aquícola III. Memórias del tercer simpósio internacional de nutricion y tecnologia de alimentos. Monterrey. 423-432.

Arredondo-Figueiroa JL, Pedrosa-Islas R, Ponce-Palafox JT, Vernon-Carter EJ. (2004) Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaus vannamei*, Boone 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chile (*Capsicum annum*) in comparsion to astaxanthin. Rev Mex Ing Quím 2:101-108.

Arredondo-Figueiroa JL, Vernon-Carter EJ, Ponce-Palafox JT (1999) Dose response to unesterified Aztec marigold (*Tagetes erecta*) pigments of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed various dietary concentrations of carotenoids. Crustac Issues 12:481-487.

Banerjee K, Chowdhury GR, Mitra A (2017) Astaxanthin level of dominant mangrove floral species in Indian Sundarbans. MOJ Biorg Org Chem 1(2):25-28.

Baron M, Davies S, Alexander D, Snellgrove D, Sloman KA (2008) The effect of dietary pigments on the coloration and behavior of flame red dwarf gourami, *Colisa lalia*. Anim Behav 75:1041-1051.

Bicudo AJA, Borghesi R, Dairiki JK, Sado RY, Cyrino JEP (2002) Performance of juvenile of *Pseudoplatystoma fasciatum* fed graded levels of corn gluten meal. Pesq Agropec Bras 47(6):838-84.

Chen H-M, Meyers SP (1982) Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. J Food Sci 47(3):892-896.

Chien YH, Shiau WC (1998) The effects of *Haematococcus pluvialis*, *Spirulina* pacific and synthetic astaxanthin on the pigmentation, survival growth and oxygen consumption of Kuruma praw, *Penaeus japonicus* Bate in: Book of abstracts of Word Aquaculture 98. World Aquaculture society, Baton Rouge: 156.

Costa, DP, Leme, FOP, Takata, R, Costa, DC, Silva, W S, Melillo-Filho, R, Miccoli, GA, Luz, RK (2014). Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. Aquac Res 47(6), 1706-1715.

Cunningham FXJ, Gantt E (2005) A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. Plant J 41:478-492.

Cunningham FXJ, Gantt E (2011) Elucidation of the pathway to astaxanthin in the flowers of *Adonis aestivalis*. Plant Cell 23:3055-3069.

Daniel N, Sivaramakrishnan T, Subramaniyan S, Faizhullah MM, Hino F (2017) Application of carotenoids on coloration of aquatic animals. Int J Fish Aquac 2:1-7.

Dissing BS, Nielsen ME, Ersbøll BK, Frosch S (2011) Multispectral imaging for determination of astaxanthin concentration in salmonids. PLoS One 6(5):1-8.

EFSA - European Food Standards Agency (2014) Scientific opinion on the safety and efficacy of canthaxanthin as a feed additive for poultry and for ornamental birds and ornamental fish. EFSA J 12(1)3587.

EFSA – European Food Standards Agency (2018) Animal Feed Additives. https://www.food.gov.uk/business-guidance/animal-feed-additives Publicado em 15 jan 2018. Acess: 25/01/2019.

Food Ingredients Brasil (2009) Dossiê corantes. Food Ingredients. Brasil. 9:40-59.

Frengova GI, Beshkova DM (2009) Carotenoids from *Rodhotorula* and *Phaffia*: Yeast of biotechnological importance. J Ind Microbiol Biotechnol 36:163-180.

Fries GM, Bitarello AC, Zaminhan M, Signor A, Feiden A, Boscolo WR (2014) Urucum em dietas para alevinos de kinguios *Carassius auratus*: Desempenho produtivo e pigmentação da pele. Semina: Cienc Agrar 35:3401-3414.

Göcer M, Yanar M, Kumulu M, Yanar Y (2006) The effects of red pepper, marigold flower and syntetic astaxanthin on pigmentation, growth and proximate composition of *Penaeus semisulcatus*. Turk J Vet Anim Sci 30:359-365.

Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita G, Terada H (2001) Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochim Biophys Acta 1512: 251-258.

Gouveia L, Pereira O, Empis J (2003) Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquac Nutr 9:123-129.

Graydon C, Robinson SMC, Scheibling RE, Cooper JA (2012) Cantaxanthin as a potential tracer of salmon feed in mussels (*Mytilus* spp.) and sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). Aquaculture 366-367:90-97.

Güroy B, Sahin I, Mantoelv S, Kayali S (2012) *Spirulina* as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail ciclid *Pseudotropheus algi*. Aquac Int 20:869-878.

Harpaz S, Padowicz D (2007) Color enhancer in the ornamental dwarf cichild *Microgeophagus ramirezi* by addition of plant carotenoids to the fish diet. Isr J Aquac 59:195-200.

Horgan FG, Felix MI, Portalanza DE, Sánchez L, Moya Rios WM, Farah SE, Wither JA, Andrade CI, Espin EB (2014) Responses by farmers to the apple snail invasion of Ecuador's rice fields and attitudes toward predatory snail kites. Crop Prot 62:135-143.

Howell BK, Matthews AD (1991) The carotenoids of wild and blue disease affected farmed tiger praw (*Penaeus monodon* Fabricius). Comp Biochem Physiol, 98B:375-379.

Hynes N, Egeland ES, Koppe W, Baardsen G, Kiron V (2009) *Calanus* oil as a natural source for flesh pigmentation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquac Nutr 15:202-206.

Ingle de la Mora G, Arredondo-Figueroa JL, Ponce-Palafox JT, Barriga-Soca IA, Vernon-Carter JE (2006) Comparison of red chilli (*Capsicum annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation. Aquaculture 258:487-495.

Ishikawa W (2018) Variedades de cor em "*Pomacea diffusa*". Disponível em: http://www.planetainvertebrados.com.br/index.asp?pagina=artigos_ver&id=87 acesso: 16/06/2018.

Johnson EA, Villa TE, Lewis MJ (1980) *Phaffia Rodozyma* as an astaxanthin source in animal diets. Aquaculture 20:123-134.

Kamata T, Neamtu G, Tanaka Y, Sameshima M, Simpson KL (1990) Utilization of *Adonis aestivalis* as a dietary pigment source for rainbow trout *Salmo gairdneri*. Nippon Suisan Gakk 783-788.

Karraker NE, Dudgeon D (2014) Invasive apple snails (*Pomacea canaliculata*) are predators of amphibians in South China. Biol Invasions 16(9):1785-1789.

Kop A, Durmaz Y, Hekimoglu M (2010) Effect of natural pigment sources on colouration of ciclid (*Cichlasoma severum* sp. Hekel, 1840). J Anim Vet Adv 9:566-569.

Kurmaly K (1993) Increase in harvest yeld and net benefit usisng carophyll pink (astaxanthin) shrimp feed. Aquac News 2(1):1.

Kyrychuc GY, Muzyka LV (2017) Peculiarities of carotenoid pigments distribution in organism of the freshwater mollusks. Hydrobiol J 53(5):92-102.

Latsha T (1991) Crustacean Pigments. Crustacean Nut News 7:53-60.

Lee C-R, Pham MA, Lee S-M (2010) Effects of dietary paprika and lipid levels on growth and skin pigmentation of pale chub (*Zacco platypus*). Asian-Australian J Anim Sci 23:724-732.

Liu J, Sun Z, Zhong Y, Gerken H, Huang J, Chen F (2013) Utilization of cane molasses towards cost-saving astaxanthin production by *Chorella zofingiensis* mutant. J Appl Phycol 25:1447-1456.

Lucien-Brun HY, Vidal F (2006) Alfalfa concentrate: natural shrimp color enhancer. Glob Aquac Advocate 35-37.

Mahalwar P, Walderich B, Sing AP, Nüsslein-Vollard C (2014) Local reorganization of xanthopores, fine tannings and colors the striped pattern of zebrafish. Science 345(6202):1362-1364.

Mann V, Harker M, Pecker I, Hurschberg J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. Nat Biotech 18:889-892.

Maontiri DM, Negre-Sadargues G, Castillo R, Trilles JP (1995) Evolution of carotenoid metabolic compatibilities during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758). Comp Biochem Physiol 111B:553-558.

Maoka T, Etoh T, Kishimoto S, Sakata S (2011) Carotenoids and their fatty acid esters in the petals of *Adonis aestivalis*. J Oleo Sci 60:47-52.

Marques HLA, Barros HP, Mallasen M, Boock MV, Valenti PMCM (2012) Influence of stocking densities in the nursery phase on the growth of *Macrobrachium amazonicum* reared in net pens. Aquaculture 358-359:240-245.

Menasveta P, Choosuwap J, Piyatirathivorakul S, Fast A, Latscha T (1994) Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and apawning of giant tiger prawn (*Penaus monodon* Fabricius) in: The third Asian fisheries forum. Asian Fisheries Society, p.713-716.

Miki W (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl Chem 63:141-146.

Morrison WE, Hay ME (2011) Feeding and growth of native, invasive and non-invasive alien apple snails (Ampullariidae) in the United States: Invasives eat more and grow more. Biol Invasions 13 (945):945-955.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura (2010) Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2008-2009.

Ng TH, Tan SK, Wong WH, Meier R, Chan S-Y, Tan HH, Yeo DCJ (2016) Molluscs for Sale: Assessment of freshwater gastropods and bivalves in the ornamental pet trade. PLoS One 11(8):1-23.

Niu J, Tian L, Lin HY, Liu Y (2011) Carotenoids in aquaculture, an overview. J Anim Sci Biotechnol 2:44-58.

Olson JA (1993) Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological Context. J. Nut. Sci. Vitamins 39:57-65.

Paibulkichakul C, Piyatiratitivorakul S, Sorgeloos P, Menasveta P (2008) Improved maturation of pond reared black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. Aquaculture 282:83-89.

Palácios ME, Dabrowski K, Abiado MAG, Lee K-J, Kohler C (2006) Effects of diets formulated with native peruvian plants on growth and feeding efficiency of red pacu (*Piaractus brachypomus*) juvenile. J World Aquac Soc 37(3):246-255.

Parisenti J, Beirão LH, Tramonte VLCG, Ourique F, Brito CCS, Moreira CC (2011) Preference ranking of color in raw and cooked shrimps. Int J Food Sci 46:2558-2561.

Petit H, Sances S, Negre-Sadargues G, Castillo R, Trilles JP (1991) Ontogeny of carotenoids metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* Bat (1888) (Crustacea, Penaeidae). A qualitative approach. Comp Biochem Physiol 99B:667-671.

Pham MA, Byum H-G, Kim K-D, Lee S-M (2014) Effects of dietary carotenoid source and level on growth, skin pigmentation, antioxidant activity and chemical composition of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 431:65-72.

Price AC, Weadick CJ, Shin J, Rood H (2008) Pigments, patterns, and fish behavior. Zebrafish 5(4):297-307.

Regunthan C, Wesley SG (2006) Pigment deficiency correction in shrimp brooodstock using *Spirulina* as carotenoid source. Aquac Nut 12:425-432.

Safari O, Atashi MMS (2015) The effects of dietary supplement of annatto (*Bixa orellana*) seed meal on blood carotenoid content and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 937:275-281.

Saini RK, Nile SH, Park SW (2015) Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. Food Res Int 76:735-750.

Sallam AE, Mansour AT, Srour TM, Goda AMA (2017) Effects of different carotenoid supplementation sources with or without sodium taurocholate on growth, feed utilization, carotenoid content and antioxidant status in fry of European seabass, *Dicentranchus labrax*. Aquac Res 48:3848-3858.

Sandri DO, Xisto ALRP, Rodrigues EC, Morais EC, Barros WM (2017) Antioxidant activity and physicochemical characteristics of buriti pulp (*Mauritia flexuosa*) collected in the city of Diamantino. Rev Bras Frutic 39(3):864.

Scabini V, Fernandez-Palacios H, Robaina L, Kalinowski T, Izquierdo MS (2011) Reproductive performance of gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) fed two combined levels of carotenoids from paprika oleoresin and essential fatty acids. Aquac Nut 17:304-312.

Schiedt K, Bischof S, Glinz, E. (1993) Metabolism of carotenoids and *in vivo* rancemization of (3S, 3'S)-Astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. Methods Enzymol 214:148-168.

Silva JHV, Silva EL, Jordão-Filho J, Ribeiro MLG, Costa FGP (2006) Resíduo da semente de urucum (*Bixa orellana* L.) como corante da gema, pele, bico e ovário de poedeiras avaliado por dois métodos analíticos. Ciênc Agrotec 30(5):988-994.

Silva RC, Jacobucci GB, Mossolin EC. (2017) Reproductive biology of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) in a reservoir situated in Minas Gerais state, Southeaster Brazil. Lat Am J Aquat Res 45:776-786.

Skrede G (1987) Rapid analysis in food processing and food control. Proceeding of the fourth European conference on food chemistry, Loen, 1987.

Tabakaeva OV, Tabakaev AV (2015) Tissue carotenoid composition of the forest bivalve mollusk *Anadara broughtonii*. Chem Nat Comp 51(6):1171-1173.

Tejera N, Cejas JR, Rodríguez C, Bjerkene B, Jerez S, Bolaños A, Lorenzo A (2007) Pigmentation, carotenoids, lipid peroxide and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources. Aquaculture 270:218-230.

Tizkar B, Seidavi A, Ponce-Palafox JT, Parastoo P. (2014) The effect of astaxanthin on resistence of juvenile praws *Macrobachium niponnense*. (Decapoda: Palaemonidae) to physical and chemical stress. Int J Trop Biol 62:1331-1341.

Tsushima M, Ikuno Y, Nagata S, Kodama K, Matsuno T (2002) Comparative biochemical studies of carotenoids in catfishes. Comp Biochem Physiol 136:147-148.

Tsushima M, Katsuyama M, Matsuno T (1997) Metabolism of carotenoids in the apple snail, *Pomacea canaliculata*. Comp Biochem Physiol 118:431-436.

Vernon-Carter EJ, Ponce-Palafox JT, Pedrosa-Islas R (1996) Pigmentation of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) using Aztec marigold (*Tagets erecta*) extracts as the carotenoids source. Archiv Latina Nut 46:243-246.

Vilchez C, Forjan E, Cuaresma M, Bedmar F, Garbayo I, Vega J (2011) Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. Mar Drugs J 9:319-333.

Wang W, Ishikawa M, Koshio S, Yokohama S, Hossain MDS, Moss AS (2018) Effect of dietary astaxanthin supplementation on juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture 491:197-204.

Yanar Y, Göçer M, Yanar M, Kücükgulmez A. 2011. Differences in nutrition composition between cultured and wild green shrimp (*Penaeus semisulcatus*) Ita J Food Sci 23:436-441.

Yang Y, Kim B, Lee J-H (2013) Astaxanthin Structure, Metabolism, and Health benefits. J Human Nutr Food Sci 1:1003.

Yang Y, Seo JM, Nguyen A, Pham TX, Park HJ, Park Y, Kim B, Bruno RS, Lee J (2011) Astaxanthin-rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein E knockout mice. J Nutr 141(9):1611-1617.

5. ARTIGO 1

Uso de extrato de Urucum *Bixa orellana* **e níveis de sombreamento no cultivo do camarão branco do Pacífico** *Litopenaeus vannamei* **em sistema de bioflocos**

Daniel Pereira da Costa[a], Afonso de Liguori Oliveira[b], Leonardo Vaz Pereira[c], Kleber Campos Miranda Filho[a*].

[a]Laboratório de Aquacultura, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
[b]Laboratório de Ciência da Carne, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
[c]Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Parauapebas, Parauapebas, PA, Brasil.

Formatado nas normas da revista *Aquaculture* para submissão.

Uso de extrato de Urucum *Bixa orellana* e níveis de sombreamento no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

Resumo

A coloração dos camarões é um fator determinante na escolha do consumidor pelo produto. Os camarões *L. vannamei* têm a capacidade de converter diversos tipos e carotenoides em astaxantina e acumular no seu corpo. O que dá a característica de cor avermelhada desejada. Nesse estudo foi utilizada ração comercial com Urucum *Bixa* sp., dois tipos de sombreamento (50% e 80%) e quatro tempos de administração do alimento (0, 7, 14 e 21 dias), para avaliar a eficiência dos 8 tratamentos na qualidade da cor dos camarões na despesca. Adicionalmente foi testada a lixiviação do pigmento bixina na água salgada e a influência dos pigmentos dos bioflocos sobre a coloração dos camarões. Segundo os resultados dos testes, a bixina aspergida na superfície da ração sofre lixiviação para a água salgada em níveis significativos a partir de 2 h de imersão ($p<0,05$). Os carotenoides presentes no biofloco tiveram baixa correlação com a coloração (L*a*b*) dos camarões pelo test *R*. O tratamento com sombreamento de 80% e alimentação com ração contendo 1.235 mg/kg de bixina durante 14 dias foi o que apresentou resultados mais significativos na coloração dos camarões in natura e cozidos nas várias coordenadas do sistema CIELAB ($p<0,05$).

Palavras-chave: bixina, carotenoide, cor, clorofila, lixiviação, raceway.

1. Indrodução

A cor vermelha normalmente é um fator determinante na escolha do pescado pelo consumidor. Esta cor é proporcionada principalmente pela astaxantina, 3,3'-dihidroxi-β-caroteno-4,4diona, um carotenoide não sintetizável por esses animais que deve ser incluído nas suas dietas em sistemas de cultivo (Kamata et al., 1990). A cor vermelha evidenciada nos camarões de corte aparece após o cozimento ou outros processos térmicos de preparação do alimento, pois com a desnaturação das carotenoproteínas, a astaxantina é liberada da molécula proteica e fica visível neste espectro (Howell e Matthews, 1991).

Os carotenoides desempenham diversas funções no organismo dos crustáceos como estimular o sistema imunológico, aumentar a resistência ao estresse, promover o desenvolvimento embrionário, o crescimento do animal e a maturação das gônadas (Petit et al., 1991; Olson, 1993; Menasveta et al., 1994; Mantiri et al., 1995).

A astaxantina possui a maior atividade antioxidante entre os carotenoides naturais, possuindo um potencial de quelatação de radicais livres, superior ao da vitamina E (Mike, 1991). Adicionalmente, inibe a peroxidação lipídica mitocondrial e contribui para a estabilidade da membrana celular (Goto et al., 2001). A deficiência de astaxantina na dieta de camarões cultivados pode comprometer o seu desempenho produtivo e proporcionar o aparecimento de doenças (Howell e Mattheus, 1991; Kurmaly, 1993; Arango, 1999).

No cultivo comercial de larvas, protozoeas e misis de *L. vannamei*, as exigências de carotenoides são supridas com o consumo de microalgas e náuplios de artêmia, além de alimentos comerciais micronizados, ricos em pigmentos. Uma vez suspenso o fornecimento de alimento vivo, a ração é a única fonte de pigmentos para as pós-larvas e juvenis de camarão em sistemas de águas claras (Aguirre-Hinojosa et al., 2012).

A capacidade da transformação de pigmentos precursores em astaxantina varia de acordo com a espécie de organismo aquático, podendo ser inexistente, ou possível a partir de carotenos ou de algumas xantofilas, processo comumente observado em camarões e em alguns peixes (Latscha, 1991; Schiedt et al., 1993; Gouveia et al., 2003; Güroy et al., 2012)

O camarão branco do Pacífico *L. vannamei* possui a capacidade de assimilar e converter os carotenoides presentes no alimento em astaxantina e acumular essa substância em seu organismo (Baron et al., 2008; Kop et al., 2010)**.** Contudo, para haver uma pigmentação eficiente do produto cozido é necessário que haja na alimentação do camarão uma porção suficiente de carotenoides que possibilite tal processo. Caso seja baixa essa proporção, o

crustáceo vai apresentar cor pálida no final do processo de cocção (Göçer et al., 2006, Aguirre-Hinojosa et al., 2012)**.**

Os bioflocos possuem destacada diversidade biológica. Entre algas, cianobactérias e leveduras produtoras de carotenoides, zooplâncton que consome esses elementos do fitoplâncton, além de protozoários e bactérias. O consumo destes itens alimentares pelo camarão, além da ração fornecida, pode proporcionar os carotenoides necessários ao seu metabolismo e, quando não assimilado, são passíveis de sofrer acumulação. Contudo, a composição dos bioflocos é bastante heterogênea e varia de acordo com o local, condições climáticas, alimentação, sombreamento ou qualidade e composição da água dos viveiros de produção comercial (Avinimelech et al., 2015; Samocha et al., 2017).

O urucum, como é conhecido o corante da semente do urucuzeiro (*Bixa* spp.), é largamente utilizado na indústria alimentícia em todo o mundo para coloração de queijos, carnes, temperos e outros usos. Suas principais substâncias pigmentantes são a bixina (vermelha) responsável por cerca de 80% dos carotenoides e a nor-bixina (amarela), ambas lipossolúveis na forma natural, sendo esta última hidrossolúvel na forma salina industrializada. A planta originária da América do Sul e utilizada inicialmente pelos povos nativos, atualmente é o corante alimentício mais utilizado no Brasil (*Food Ingredients* Brasil, 2009).

Devido ao seu poder de pigmentação e fácil obtenção, o urucum já foi testado para alimentação animal em aves, para produção de ovos e pele pigmentados (Silva et al., 2006). Na aquicultura, o urucum foi empregado com algumas espécies, obtendo resultados positivos na pigmentação da pele em kinguio *Carassius auratus* (Fries et al., 2014) e na musculatura de truta arco íris *Oncorhynchus mykiss* (Safari e Atash, 2015).

A possibilidade do uso do urucum como fonte de pigmentos para a aquicultura pode ser uma solução para minimizar custos com pigmentos artificiais importados, proporcionar a substituição dessas substâncias por um produto natural e com potencial para produção orgânica. Levantando a possibilidade nova utilização a esse pigmento já tradicionalmente utilizado na indústria alimentícia e outros fins.

O presente estudo objetivou mensurar as variáveis de coloração dos camarões in natura e cozidos em produzidos em "raceways" de criação comercial sob estufa, em diferentes tempos de alimentação com ração comercial, após ser aspergida com extrato de urucum em alta concentração e empregando sombreamentos de 50 e 80% para testar o tempo de resposta visando uma inclusão do pigmento no período final de cultivo.

2. Material e métodos

2.1. Estrutura e Local

O experimento foi conduzido em dois tanques metálicos suspensos revestidos de manta de PVC atóxico com trama interna de 100 m^3 de capacidade útil, construídos no formato de "raceway" com divisória central e extremidades arredondadas medindo 5 metros de largura por 20 metros de comprimento. Estes tanques foram dispostos lado a lado numa estufa de madeira coberta com filme agrícola. A aeração do sistema foi realizada com injetores venturi tipo "nozzle" ligados a bombas centrífugas, dispostos em número de 20 unidades por tanque, criando uma leve circulação da água. A unidade de produção da Minas Camarão LTDA – ME, onde foi conduzido o estudo, está localizada no distrito de Estiva, no Município de Sete Lagoas - MG, Brasil: 19°36'58,94S, 44°25'75,08'W, a 600 km do Oceano Atlântico e 766 metros de altitude.

2.2. Preparação e condições experimentais

Os tanques foram preenchidos com água proveniente de poço superficial, salinizada artificialmente e cobertos com sombrite 50 e 80%. Passaram por uma maturação com inóculo de bioflocos 50% de 4 dias e receberam 70.000 juvenis de camarão com 0,5 g (± 0,1 g). Em cada tanque foi empregada a densidade de 700 camarões/m^3.

O cultivo pré-experimento foi realizado durante 90 dias, no período de inverno (24 a 32ºC). No período experimental, os animais foram alimentados 4 vezes ao dia (8, 12, 16 e 20 h), com ração comercial extrusada com nível de carotenoides totais analisado de 8,4 mg/kg ± 0,3 (Poti Guaçu AD, 35% CP, Guabi®, Guabi Nutrição Animal, Campinas, SP, Brasil) com inclusão de 1.235 mg/kg de bixina (valor medido após processamento e secagem). A bixina foi obtida na forma de extrato de urucum em etanol (24.114 mg/L de bixina na solução), fabricada a partir de semente de urucum e adquirida no comércio local. Desta forma, intencionamos testar a influência da administração de ração com elevada concentração de carotenoide em curto período de tempo sobre os juvenis de *L. vannamei*.

A adição de açúcar de cana quando necessário na proporção de 20:1 da quantidade mensurada de amônia total (N-AT) foi feita de forma fracionada nos horários de 10, 14, 18 e 22 h. As clarificações do sistema com decantador foram realizadas sempre quando o valor dos Sólidos Sedimentáveis (SS) excedia 15 mL/L até o valor mínimo de 10 mL/L.

Utilizou-se para esse estudo um delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2 x 4. Foram coletados 16 camarões de cada tanque, em quatro oportunidades distintas.

Na primeira coleta não houve adição de pigmento na ração. As demais coletas foram realizadas depois 7, 14 e 21 dias, de arraçoamento com alimento inerte contendo urucum. Desta forma, levando em consideração as duas condições de sombreamento (50 e 80%), foram testados 8 tratamentos, divididos em dois sombreamentos e os quatro tempos de administração da ração pigmentada de 0, 7, 14 e 21 dias (50-0, 50-7, 50-14, 50-21, 80-0, 80-7, 80-14 e 80-21).

2.3. Parâmetros de água

Os parâmetros de qualidade de água, temperatura, oxigênio dissolvido (OD), pH e salinidade foram medidos com sonda multiparâmetros AK88, (AKSO®, Akso Produtos Eletrônicos Limitada, São Leopoldo, RS, Brasil). A amônia total (N-AT), nitrito ($N\text{-}NO_2^-$), nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) e fosfato ($P\text{-}PO_4^{-3}$), foram determinados segundo a metodologia descrita pela UNESCO (1983). Para a alcalinidade foi utilizado o método APHA (1998) e para os sólidos sedimentáveis (SS), a leitura direta em sedimentador tipo cone de Imhoff.

2.4. Teste de lixiviação

Para o teste de lixiviação com a bixina aspergida na ração e posteriormente imersa em água, amostras homogeneizadas da mesma ração experimental fornecida aos camarões foram coletadas, trituradas em gral de porcelana, pesadas (1,0 g) e analisadas em quadruplicata pela metodologia de determinação de bixina descrita no item 2.5. Para a condição controle, a determinação foi realizada sem imersão da ração em meio aquoso. Outras amostras desse material foram colhidas e imersas em tubos de ensaio com 10 mL de solução de água destilada, com salinidade 25‰, pH 6,0 e temperatura de 30°C, durante 15, 30, 60 e 120 minutos em banho termostatizado sob agitação. Em seguida foram submetidas à mesma análise para determinar a diferença entre a concentração do pigmento na ração em diferentes tempos de imersão em água. Este tipo de teste em laboratório foi desenvolvido para eliminar o efeito bioquímico sobre as amostras que poderia se manifestar caso fosse utilizada água de cultivo que contém agentes biológicos diversos presentes no meio. A temperatura utilizada foi próxima à encontrada no sistema de cultivo para simular a situação natural. O pH não foi controlado assumindo o valor da água destilada e salinizada no momento do teste.

2.5. Análises de pigmentos

As rações para análise de pigmentos foram coletadas e pesadas na quantidade de 1 g por amostra em quadruplicata por cada tipo de ração. As análises quantitativas de carotenóides

foram feitas adaptando a metodologia proposta por Rodriguez-Amaya (2001). Quatro amostras de ração foram maceradas em gral de porcelana até formar uma pasta fina. Uma porção de um grama de peso foi separada em tubo de ensaio para extração dos carotenoides em álcool etílico anidro e depois filtrada em papel filtro quantitativo deixando repousar protegida da luz até a medição. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Os extratos foram corrigidos no seu volume até a solução obter uma amostra de 5 mL para análise. A quantidade de bixina foi determinada espectrofotometricamente pelo aparelho Libra S22 (Bichrom®, Cambridge, Reino Unido), a 457 nm (ABS 457), utilizando o coeficiente de extinção específico em cubeta de 1cm de caminho ótico E1%, 1 cm = 2100 de acordo com o cálculo descrito por Weber (1988). Equação 1:

$$\mu g\ bixina\ /g = \frac{ABS\ 457\ x\ FD\ x\ V}{3443\ x\ g}$$

Onde:

ABS 457= Absorbância da bixina na solução de etanol a 457nm

FD = Fator de diluição

V = Volume

3443 = Coeficiente de absorção da astaxantina

g = gramas de amostra utilizada

Nos testes com os bioflocos, as amostras foram preparadas coletando os sólidos em malha de 20 µm e fazendo uma filtragem inicial até a perda de aproximadamente 90% da água. Em seguida, resfriando o material a 5°C por até 4 h para transporte e desidratados em estufa com ventilação forçada a 55°C durante 24 h para eliminação total da umidade. Procedendo então os testes de determinação de concentração de pigmentos com base na matéria seca (MS) dos bioflocos.

Para determinação da clorofila total com base na quantidade de clorofila *a* foi utilizada a equação 2, adaptada de Kuroda et al. (2005):

$$\text{µg clorofila } a/\text{g} = 27{,}9 \text{ x } (ABS\ 665 - ABS\ 750)x\ \frac{1.000\ x\ FD}{V\ x\ 1}$$

Onde:

27,9 = Coeficiente de absorção do beta caroteno em etanol

ABS 665 = Absorbância da clorofila na solução de etanol a 665 nm

ABS 750 = Absorbância da clorofila na solução de etanol a 750 nm

FD = Fator de diluição

V = Volume da amostra em g

1 = comprimento ótico da cubeta

As quantidades de carotenoides totais nas amostras de biofloco seco e ração foram determinadas espectrofotometricamente, a 452 nm (ABS 452), utilizando o coeficiente de extinção específico de E1%, 1 cm = 2100 com base na quantidade de beta caroteno de acordo com a mesma equação da astaxantina, porém subtraindo o valor da clorofila para evitar interferência. Equação 3:

$$\mu g\ carotenóides\ totais\ /g = \frac{(ABS\ 452 - ABS\ 665) x\ FD\ x\ V}{2100\ x\ g}$$

2.6. Análises de cor

Após realizada cada coleta (item 2.2), os camarões foram pesados em balança de precisão 0,01g BL series, SHIMADZU®, (Shimadzu do Brasil Comércio Limitada, Barueri, SP, Brasil), resfriados em gelo (5°C) em sacos plásticos individuais e levados ao laboratório de aquicultura da Universidade Federal de Minas Gerais, LAQUA/UFMG. O peso médio dos camarões utilizados no estudo foi de 6,5 g (± 1,39).

A análise colorimétrica da superfície corporal dos camarões foi realizada por espectroscopia reflexiva utilizando colorímetro digital Minolta Color Reader CR-400 de acordo com o sistema CIELAB (L*a*b), sendo L = iluminação, a = cor vermelha e b = cor amarela (CIE, 1976; Skrede, 1987). Para fins de padronização, as leituras foram realizadas na região abdominal da pleura entre o primeiro e o segundo somito, em cada animal amostrado. Após a cocção por um minuto, a temperatura aproximada de 100°C, os mesmos animais foram avaliados novamente pelo mesmo método.

2.7 Análise estatística

Para análise do efeito dos tratamentos foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis por pares. Quando foi possível a análise paramétrica utilizou-se ANOVA e o teste de comparação de médias de Tukey. As diferenças significativas foram comparadas ao nível de significância de 5% de probabilidade. As regressões entre as variáveis foram feitas para avaliar a relação entre os parâmetros. Para os testes de correlação foi utilizado o teste *R* de Spearman.

As análises foram realizadas pelo software INFOSTAT versão 2017 conforme manual (Casanoves et al. 2012).

3. Resultados

Os parâmetros de qualidade da água avaliados nos dois "raceways", durante todo o teste (21 dias) estão expressos na tabela 1. A temperatura, oxigênio dissolvido (OD), sólidos suspensos (SS) e fosfato ($P\text{-}PO_4^{-3}$) não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$). Enquanto, o potencial hidrogeniônico (pH), salinidade, amônia total (N-AT), nitrito ($N\text{-}NO_2^-$), nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) e alcalinidade apresentaram diferenças significativas ($P<0,05$).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água medidos durante o experimento de criação de camarões marinhos em raceways empregando BFT e dois sombreamentos (%).

Parâmetro	50% sombra	80% sombra
Temperatura (°C)*	28,65 ± 1,88	29,43 ± 1,86
pH	7,70 ± 0,11^b	7,60 ± 0,16^a
OD (mg L^{-1})*	5,60 ± 2,35	5,62 ± 0,93
Salinidade (‰)	22,09 ± 8,99^a	25,93 ± 0,55^b
N-AT (mg/L)*	0,69 ± 0,80^b	0,26 ± 0,34^a
$N\text{-}NO_2^-$ (mg/L)	0,68 ± 2,34^a	2,58 ± 0,39^b
$N\text{-}NO_3^-$ (mg/L)	16,33 ± 1,10^a	60 ± 21,38^b
Alcalinidade (mg $CaCO_3$/L)	299,18 ± 0,91^b	294 ± 3,63^a
SS (mL/L)*	10,32 ± 5,38	12,59 ± 3,23
$P\text{-}PO_4^{-3}$ (mg/L)*	2,38 ± 0,26	2,26 ± 0,32

Letras diferentes representam diferenças significativas ($P<0,05$) pelo teste de pares não paramétrico de Kruskal-Wallis. Parâmetros marcados com * foram avaliados pelo teste de paramétrico de Tukey, letras diferentes representam diferenças significativas ($P<0,05$).

O teste de lixiviação, conforme o gráfico na figura 1, demonstrou haver influência do tempo de imersão da ração em água salgada (25‰, 30°C e pH 6,0), na proporção do pigmento bixina presente na ração. Após duas horas de imersão, a quantidade de carotenoide sofreu perda significativa para a solução líquida em relação à ração não imersa (controle) ($P<0,05$).

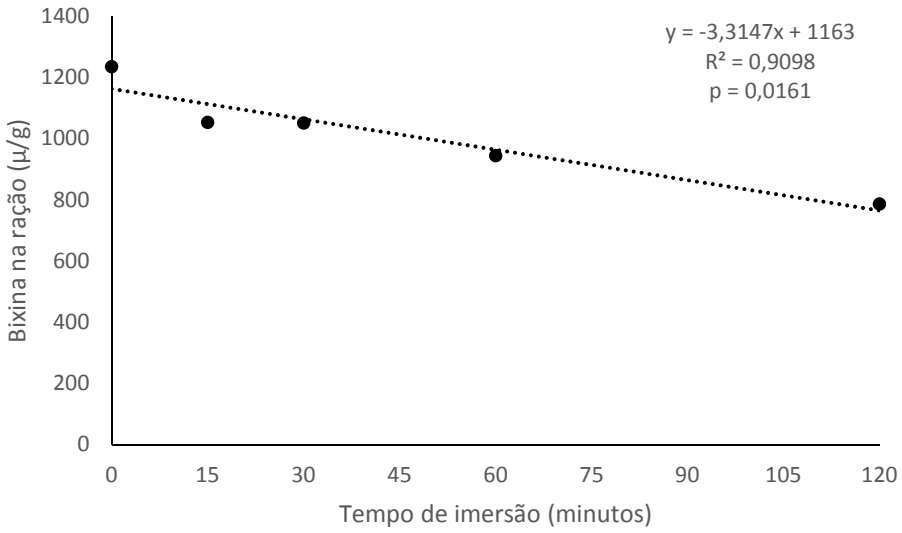
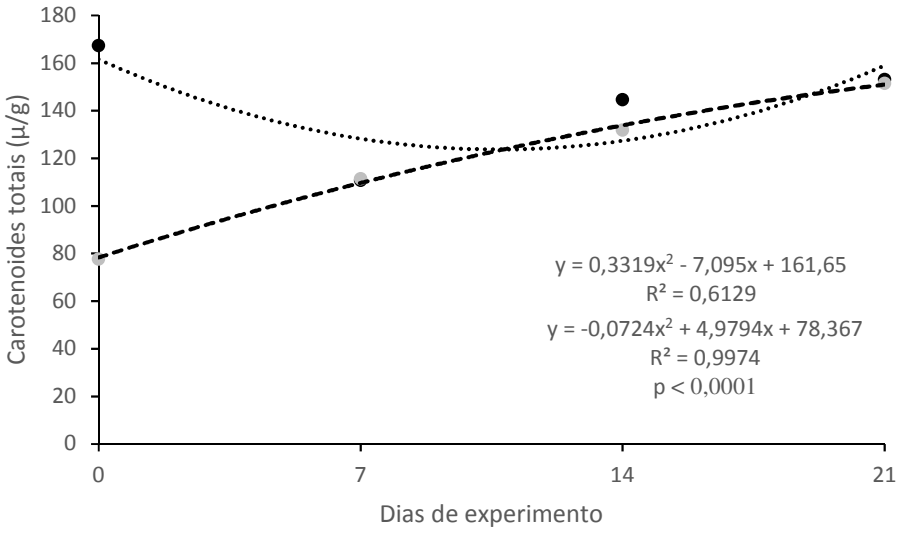


Figura 1. Relação entre o tempo de imersão da ração pigmentada em solução de água destilada com NaCl (25‰, pH 6,0 e 30°C) e o nível de bixina medido.

Na avaliação dos pigmentos contidos na matéria seca (MS) dos bioflocos, a quantidade de carotenoides totais, como demonstrado na figura 2A, foi maior no tanque com sombreamento de 50% comparado ao tanque de 80% de sombreamento, no dia inicial ou 0 ($P<0,05$). Contudo, foi observada uma redução significativa ($P<0,05$) na quantidade de carotenoides do tanque de 50% de sombreamento 7 dias apósb e um aumento no tanque de 80% de sombreamento ($P<0,05$). A partir de então, continuaram a aumentar as concentrações de carotenoides totais, sem diferir significativamente na quantidade entre os dois tanques, até o final do teste ($P>0,05$).

A quantidade de clorofila *a*, como visto na figura 2B, foi mais baixa no tanque 80% de sombreamento em relação ao tanque de 50% de sombreamento, o qual foi maior durante todo o experimento proporcionalmente a cada semana ($P<0,05$).

A



B

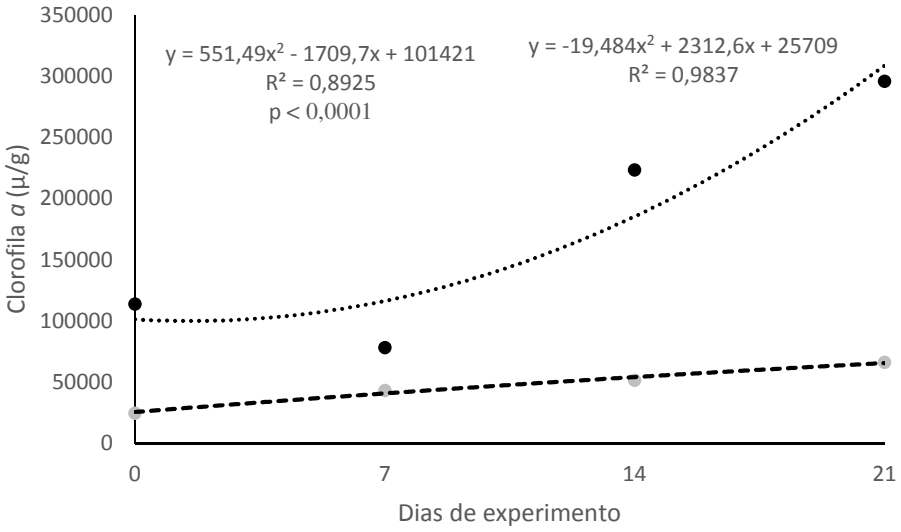


Figura 2. Relação entre pigmentos dos bioflocos com base na matéria seca (MS) e o tempo do experimento em dias sendo (A) carotenoides totais e (B) clorofila a. Linha (**.....**) representa sombreamento de 50% e linha (----) representa sombreamento de 80%. Experimento de criação de camarões marinhos em raceways empregando BFT e dois sombreamentos (%).

Na tabela 2 estão expressas as correlações entre os carotenoides totais do biofloco, clorofila *a* e das coordenadas L*a*b* medidas nos camarões in natura e cozidos. O coeficiente R de Spearman demonstrou correlação média entre a quantidade de carotenoides totais e clorofila *a* (P<0,0001), correlação baixa entre os carotenoides totais e as coordenadas L*

(P=0,187), a* (P=0,0003) dos camarões in natura e b* (P=0,2800) e dos camarões cozidos. As avaliações das coordenadas de cor, medidas nos camarões, estão descritas na figura 3.

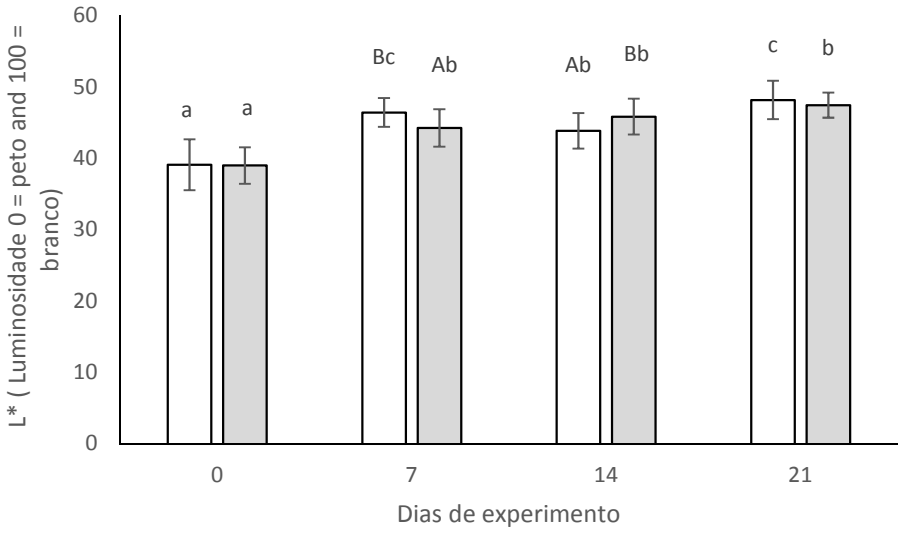
Tabela 2. Correlação entre os carotenoides totais contidos nos bioflocos e os níveis de clorofila a coloração dos camarões in natura e cozidos.

Correlação entre	**R**	**valor de P**
Caroteinoides do biofloco vs clorofila	0,71	<0,0001
Caroteinoides do biofloco vs L* camarões in natura	0,11	0,2118
Caroteinoides do biofloco vs a* camarões in natura	-0,29	0,0010
Caroteinoides do biofloco vs b* camarões in natura	-0,06	0,4865
Caroteinoides do biofloco vs L* camarões cozidos	0,08	0,3879
Caroteinoides do biofloco vs a* camarões cozidos	0,08	0,3879
Caroteinoides do biofloco vs b* camarões cozidos	0,17	0,0491

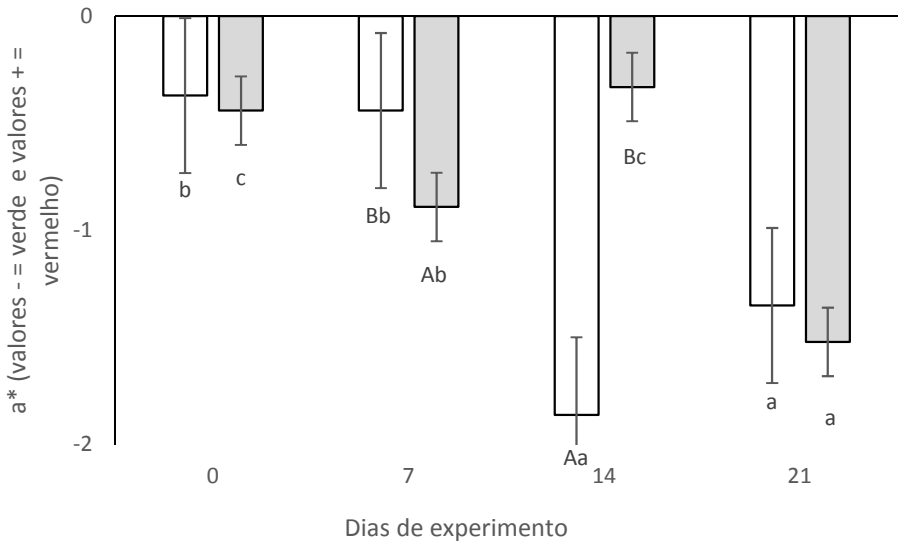
Os valores de L* (luminosidade), a* (Vermelho) e b* amarelo correspondem ao sistema CIELAB de coodenadas de cor.

Podemos observar que a luminosidade dos camarões in natura L* (Fig. 3A) foi maior nos animais submetidos à alimentação com a ração pigmentada com urucum independente do sombreamento (P<0,05). A coloração verde dos camarões in natura a* (Fig. 3B) está mais acentuada nos tratamentos 50-14, 50-21, 80-21 e 80-7 (P<0,05). No gráfico que representa a coloração dos camarões in natura b* (Fig. 3C), o tratamento 80-14 apresentou coloração amarelada mais acentuada que os demais tratamentos (P<0,05). A representação com camarões cozidos L*(D), a luminosidade do tratamento 80-14 foi inferior aos demais tratamentos (P<0,05), que não diferiram entre si (P>0,05). A coloração vermelha dos camarões cozidos representada em a* (Fig. 3E) mostrou-se mais acentuada no tratamento de 80-14, em relação aos tratamentos 50-7, 50-14, 50-21 (P<0,05). Os demais tratamentos não diferiram entre si (P>0,05). Em b* (Fig. 3F), a coloração amarela dos camarões cozidos foi mais acentuada nos tratamentos 50-21, 80-0, 80-14, 80-21 do que os tratamentos 50-7 e 50-14 (P<0,05). Os demais tratamentos não diferiram significativamente entre si (P>0,05).

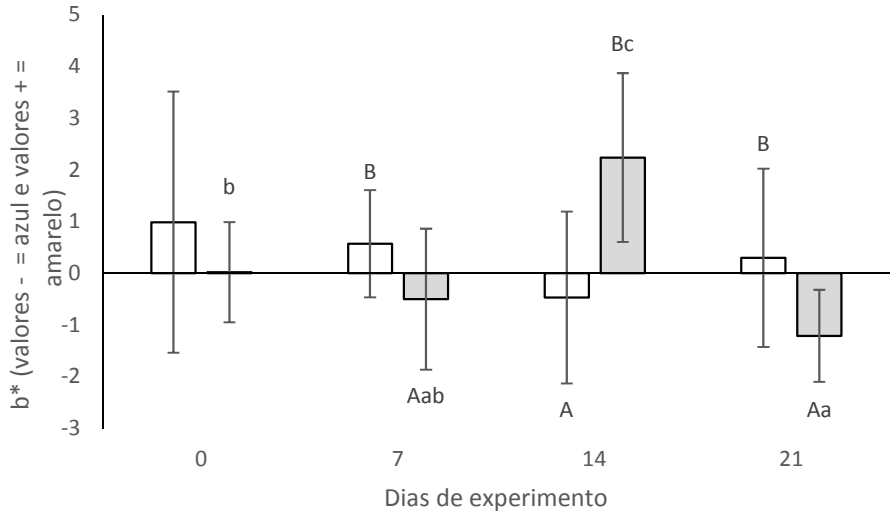
A


L* (Luminosidade 0 = peto and 100 = branco)
60
50
40
30
20
10
0
a
a
Bc
Ab
Ab
Bb
c
b
0
7
14
21
Dias de experimento

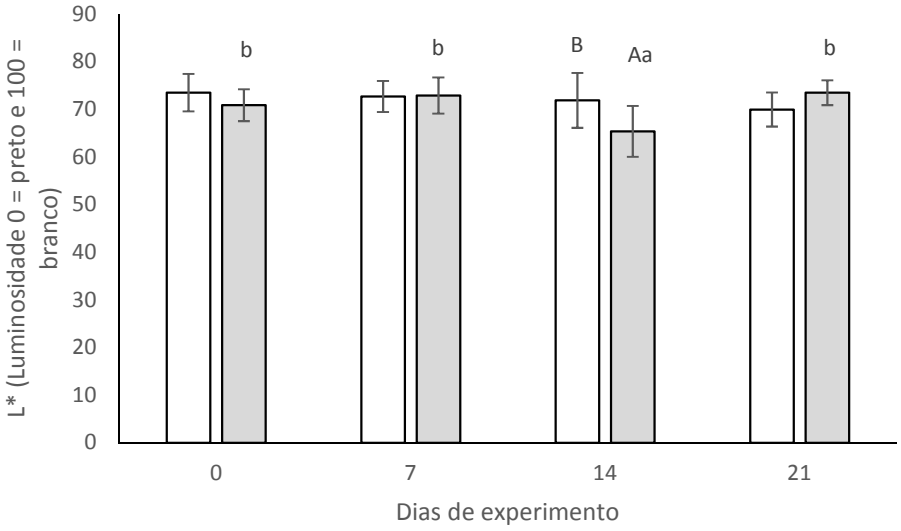
B


a* (valores - = verde e valores + = vermelho)
0
-1
-2
b
c
Bb
Ab
Aa
Bc
a
a
0
7
14
21
Dias de experimento

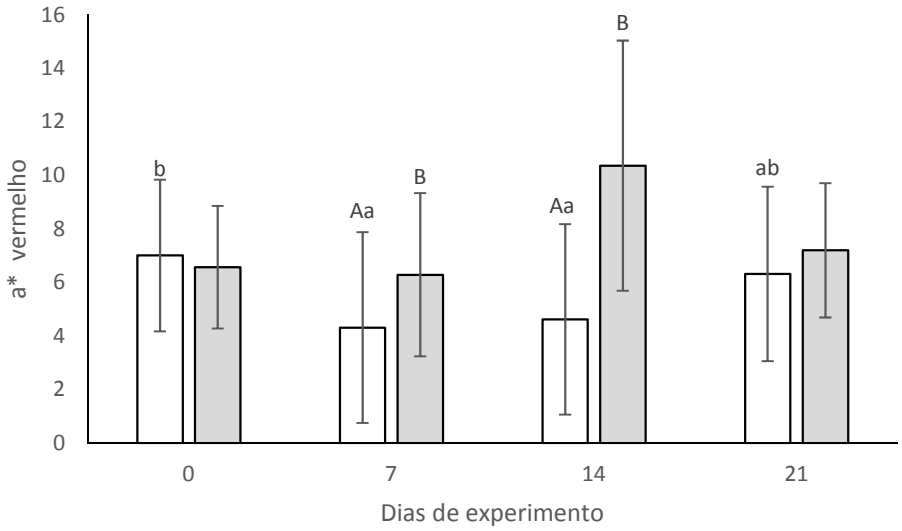
C


b* (valores - = azul e valores + = amarelo)
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
b
B
Aab
Bc
A
B
Aa
0
7
14
21
Dias de experimento

D


L* (Luminosidade 0 = preto e 100 = branco)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
b
b
B
Aa
b
0
7
14
21
Dias de experimento

E



F

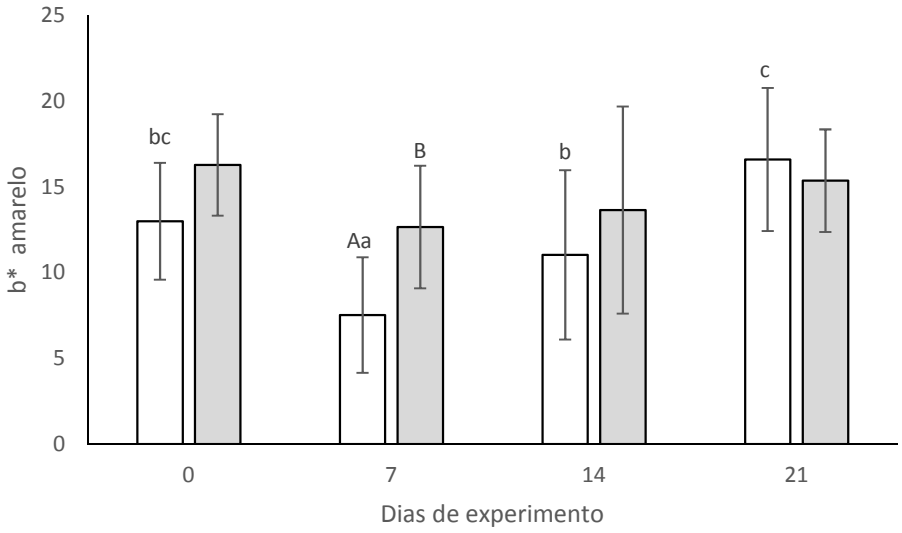


Figura 3. Média (SD ±) da coloração mensurada nos camarões *L. vannamei* in natura L* (A) a* (B) b* (C) e cozidos L* (D) a* (E) b* (F) com inclusão de urucum na ração em dois sobremaentos. Colunas brancas representam tratamentos com 50% de sombreamento e colunas em cinza representam tratamentos com 80% de sombreamento. Letras MAIÚSCULAS diferentes representam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de pares não paramétrico de Kruskal-Wallis para sombreamento e letras minísculas para tempo de cultivo no mesmo sombreamento.

4. Discussão

Os parâmetros de qualidade da água medidos estão próximos aos comumente encontrados em sistemas de bioflocos citados na literatura, sendo evidente a característica

heterogênea entre diferentes tanques que estão no mesmo local com características semelhantes. Acreditamos que as diferenças observadas se devam a possíveis efeitos da microbiota presente em cada tanque individualmente e provavelmente influenciada pelas diferentes condições de sombreamento no presente estudo (Krummenauer et al., 2014; Avinimelech et al., 2015; Samocha et al., 2017).

Considerando o objetivo de manter um ambiente mais equilibrado e favorável ao desenvolvimento dos flocos bacterianos como discutido por Avinimelech et al. (2015) e o fato de que a intensa atividade autotrófica não aumentou a disponibilidade de pigmentos eficientes na pigmentação dos camarões, é preferível a utilização de um sombreamento de 80% ao invés de 50% para o seu cultivo. Dando assim a possibilidade de melhor desenvolvimento da biota heterotrófica e da que consome compostos nitrogenados (quimioautotrófica) em detrimento dos autotróficos.

A quantidade de clorofila *a* no biofloco indica a intensidade da produção primária no sistema (Arst et al., 2008). No presente estudo, a clorofila *a* demonstra uma correlação positiva com a quantidade de carotenoides presentes na matéria seca dos bioflocos ($P<0,05$). O sombreamento de 80% pode ter causado redução na taxa fotossintética como sugerido por Rosa e Galvan (1999), reduzindo a quantidade de clorofila *a* presente semanalmente durante todo o experimento em relação ao sombreamento de 50% ($P<0,05$), contudo não determinou a redução dos carotenoides em termos proporcionais.

O provável motivo para essa resposta é que as fontes de carotenóides nesse estudo são diversas e não apenas provenientes dos organismos fotossintetizantes. De acordo com Yagi et al. (2001), os carotenóides podem estar também bioacumulados no zooplâncton, ser proveniente de leveduras e outros microrganismos não clorofilados (Andrews et al., 1976; Johnson et al., 1980), ou terem lixiviado da própria ração experimental, a qual apresentou perdas significativas de bixina a partir de 2 h de imersa na água salgada ($P<0,05$). O sombreamento pode ser uma forma de controle do tipo de microbiota desejável nos meios em bioflocos. Sendo que o maior sombreamento pode favorecer os organismos heterotróficos em relação aos autotróficos como discutido por Samocha et al. (2017).

Contudo, existe baixa ou nenhuma correlação da coloração apresentada nos camarões (L*a*b*) com o nível de carotenoides totais encontrado nos bioflocos, podendo, esses carotenoides serem insuficientes para suprir as necessidades do camarão ou apenas parcialmente disponíveis por estarem protegidos pela parede celular do alimento consumido o qual não passou por um processamento que os liberasse para o meio extracelular para serem

absorvidos. Conforme relatado por Chien e Shiau (1998). Outra possibilidade está ligada ao consumo dos bioflocos pelos camarões, pois o mesmo pode não ter sido ingerido em quantidade significativa a ponto de suprir suas necessidades por carotenóides. Além da diferença na eficiência espécie-específica da capacidade de conversão de carotenoides precursores em astaxantina e acumulação corporal desse pigmento nos camarões. (Latscha, 1991; Schiedt et al., 1993; Gouveia et al., 2003; Güroy et al., 2012).

Na coloração dos camarões in natura, os tratamentos com adição de extrato de urucum tiveram mais luminosidade (L*) em relação aos dois tratamentos sem pigmentos, característica desejável para o consumidor final, que segundo Parisenti et al. (2011), também indicaram a coloração vermelho alaranjada como ideal após a cocção dos camarões. Tal característica pode ser evidenciada nas coordenadas a* e b* com valores positivos, nos quais os tratamentos 80-7 está entre os melhores resultados, e o tratamento 80-14 foi superior a 50-14 na coloração vermelha, enquanto na amrela o tratamento 50-21 foi superior a 50-7 e 50-14, e isoladamente como melhor resultado nas características L* cozido com coloração mais escura, e b* in natura com coloração mais amarelada ($P<0,05$).

Observa-se que alguns tratamentos com 80% de sombreamento que tiveram duração maior ou igual ao tratamento em 14 dias, mesmo podendo oferecer quantidade maiores ou semelhantes de bixina aos camarões, não tiveram o mesmo efeito de aumento na pigmentação pós-cocção, podendo ser resultado da resposta fisiológica do animal, que após a saturação da capacidade de absorção/acumulação do pigmento, passa a reduzir sua capacidade acumulativa como relatado por Choubert (2010) e Safari e Atash (2015). Em determinados casos, a suplementação de carotenoides pode não ser tão eficiente devido ao custo metabólico da transformação molecular necessária do pigmento precursor em astaxantina e acumulação no organismo de camarões peneídeos (Latscha, 1991).

A diferença na coloração dos camarões entre o mesmo tempo de tratamento e os sombreamentos pode ser explicado por influência da luminosidade na acumulação de astaxantina em *L. vannamei* como demonstrado por You et al. (2006) e pelo mimetismo natural dos crustáceos em diferentes condições ambientais (Bedini, 2002; Bedini, 2006). Estes aspectos fazem com que o camarão manifeste cores distintas para se proteger de fatores ambientais ou para imitar o ambiente a sua volta, reduzindo uma possível predação quando em ambiente natural, podendo manifestar-se também em ambiente de cultivo.

O urucum se mostrou como potencial suplemento alimentar para melhora da pigmentação em *L. vannamei* a partir do sétimo de dia de ensaio, a exemplo de outras plantas

que possuem alta concentração de pigmentos carotenóides na sua composição (Verno-Carter et al., 1996; Arredondo-Figueiroa et al., 1999; Arredondo-Figueiroa et al., 2004), podendo ser utilizado para essa finalidade na concentração de 1235 mg/kg na ração em curtos períodos de tempo nas semanas finais de cultivo. Contudo não foi possível afirmar que ele aumentasse a pigmentação vermelho/amarelo em relação ao primeiro dia (0), no qual já havia um aporte de carotenoides no biofloco, e só foi eficiente sua utilização depois de reduzida essa quantidade natural, sendo observada diferença de coloração primeiro no tanque de 80% de sombreamento e ao fim do teste no de 50%.

5. Conclusões

Recomenda-se o tratamento com sombreamento de 80% e alimentação com ração contendo 1.235 mg/kg de bixina para obter resultados mais estáveis na coloração dos camarões in natura e cozidos cultivados em bioflocos. A adição de extrato de urucum não proporcionou aumento na coloração em comparação ao inicio do estudo, mas sim quando houve diminuição dos carotenoides no biofloco. A bixina aspergida na superfície da ração sofre lixiviação para a água salgada em níveis significativos a partir de 2 h de imersão.

Agradecimentos

Agradecemos a Minas Camarão LTDA-ME, pela disponibilização do espaço, estrutura e dos animais para os testes e a Anderson Correia pela tradução do artigo.

Referências

Aguirre-Hinojosa, E., Piña-Valdez, P., Garza-Aguirre, M. C., Guzmán-Ramirez, L. D., Montoya-Olvera, R., Torres-Quiroga, J., Nieves-Soto, M., 2012. Efecto de las xantofilas de la flor de cempaschúhil *Tagetes erecta L.* em la acumulación de astaxantina y la sobrevivência de postlavas del camarón blanco *Litopenaus vannamei* (Boone, 1931). Ver. Mex. de Ing. Quím., 11, 249-257.

American Public Health Association (APHA), 1998. Standard metods for the examination of water and wastewater. American Public Healt Association, American Water Works Association. Water Enviromental Federation, 20.

Andrews, A. G., Starr, M. P., 1976. (3R3'R) – Astaxanthin from yeast *Phaffia Rodozyma*. Phytochemistry, 1009-1011.

Arango, J., 1999. Resumen del evaluacion de la utilizacion de astaxantian en la nutricion de camarones. In: Avances em nutrición aquícola III. Memórias del tercer simpósio internacional de nutricion y tecnologia de alimentos. Monterrey. 423-432.

Arredondo-Figueiroa, J. L., Pedrosa-Islas, R., Ponce-Palafox, J. T., Vernon-Carter, E. J., 2004. Pigmentation of pacific White shrimp (*Litopenaus vannamei*, Boone 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chile (*Capsicum annum*) in comparsion to astaxanthin. Rev. Mex. de Ing. Quím., 2, 101-108.

Arredondo-Figueiroa, J. L., Vernon-Carter, E. J., Ponce-Palafox, J. T., 1999. Dose response to unesterified Aztec marigold (*Tagets erecta*) pigments of Pacific White shrimp (*Litopenaus vannamei*) fed various dietary concentrations of carotenoids. Crustac Issues, 12, 481-487.

Arst, H., Nõges, T., Nõges, P., Paavel, B., 2008. Relation of Phytoplankton *in situ* primary production, chlorophyll concentration and underwater irradiance in turbid lakes. Hidrobiologia, 599, 169-176.

Avnimelech, I., De-Schryver, P., Emmerenciano, M. G. C., Kuhn, D., Ray, A., Taw, N., 2015. Biofloc Tecnology. Apratical guide book. World Aquaculture Society, 3.

Baron, M., Davies, S., Alexander, D., Snellgrove, D., Sloman, K. A., 2008. The effect of dietary pigments on the coloration and behavior of flame red dwarf gourami, *Colisa lalia*. Anim. Behav., 75, 1041-1051.

Bedini, R., 2002. Colour change and mimicry from juvenile to adult: *Xantho poresa* (Olivi, 1792) (*Brachyura, Xanthidae*) and *Carcinus Maenas* (Linaeus, 1758) (*Brachyura, Portunidae*). Crustaceana, 75 (5), 703-710.

Bedini, R. 2006. Polymorphism of colour patterns related to Environmental factors: Correlation between habitat, sight, and mimicry in *Sirpus Zariquieyi* Gordon, 1953. Crustaceana, 75 (5), 703-710.

Casanoves F., Balzarini M. G., Di Rienzo J. A., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W., 2012. InfoStat. User Manual, Córdoba, Argentina.

Chien, Y. H., Shiau, W. C., 1998. The effects of *Haematococcus pluvialis*, Spirulina pacific and syntetic astaxanthin on the pigmentation, survival growth and oxygen consumption of Kuruma praw, *Penaeus japonicus* Bate in: Book of abstracts of Word Aquaculture 98. World Aquaculture society, Baton Rouge: 156.

Choubert, G., 2010. Response of rainbow trout (*Oncorrhychus mykiss*) to varing dietary astaxanthin/canthaxanthin ratio: colour and carotenoid retention of the muscle. Aquac. Nutr., 16, 528-535.

Commision Interntionale de lÉclairage (CIE), 1976. Colorimetry. Publication n. 15, Bureau Central de la CIE, Viena, Austria.

Food Ingredients Brasil, 2009. Dossiê corantes. Food Ingredients Brasil, 9, 40-59.

Fries, G. M., Bitarello, A. C., Zaminhan, M., Signor, A., Feiden. A., Boscolo, W. R., 2014. Urucum em dietas para alevinos de kinguios *Carassius auratus*: Desempenho produtivo e pigmentação da pele. Semina: Ciênc. Agrár., 35 (6), 3401-3414.

Göcer, M., Yanar, M., Kumulu, M., Yanar, Y., 2006. The effects of red pepper, marigold flower and syntetic astaxanthin on pigmentation, growth and proximate composition of *Penaeus semisulcatus*. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 30, 359-365.

Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama., Yamashita, G., Terada, H., 2001. Efficient radical trapping at the surfasse and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potente antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochim. Biophys. Acta, 1512, 251-258.

Gouveia, L., Pereira, O., Empis. J., 2003. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquac. Nutr., 9, 123-129.

Güroy, B., Sahin, I., Mantoelv, S., Kayali, S., 2012. Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail ciclid *Pseudotropheus algi*. Aquac. Int., 20, 869-878.

Howell, B. K., Matthews, A. D., 1991. The carotenoids of wild and blue disease affected farmed tiger praw (*Penaeus monodon fabricius*). Comp Biochem Physiol, 98B, 375-379.

Johnson, E. A., Villa, T. E., Lewis, M. J., 1980. *Phaffia Rodozyma* as an astaxanthin source in animal diets. Aquaculture, 20, 123-134.

Kamata, T., Neamtu, G., Tanaka, Y., Sameshima, M., Simpson, K. L., 1990. Utilization of *Adonis aestivalis* as a dietary pigment source for raibow trout *Salmo gardineri*. Nippon Suisan Gakk., 783-788.

Kop, A., Durmaz, Y., Hekimoglu, M., 2010. Effect of natural pigment sources on colouration of ciclid (*Cichlasoma severum* sp. Hekel, 1840). J Anim Vet Adv., 9, 566-569.

Krummenauer, D., Samocha, T. M., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky Jr, W., 2014. The reuse of water on the culture of pacific white shrimp *Litopenaus vannamei* in BFT System. J. World Aquacult. Soc., 45 (1), 3-14.

Kurmaly, K., 1993. Increase in harvest yeld and net benefit usisng carophyll pink (astaxanthin) Shrimp Feed. Aquaculture News, 2, (1).

Kuroda, E. K., Santos, A. C. A., Qeiroz, L. A., Calijuri, M. C., Bernardo, L. D., 2005. Determinação de clorofila pelo método espectrofotométrico visando o monitoramento da eficiência do tratamento de água para abastecimento. In Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e ambiental. Saneamento ambiental brasileiro: Utopia ou Realidade? ABES, 1-13.

Latsha, T., 1991. Crustacean Pigments. Crustacean Nutrition Newsletter, 7, 53-60.

Mantiri, D. M., Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Trilles, J. P., 1995. Evolution of carotenoid metabolic compatibilities during the early development of the european lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758). Compendium of Biochemical and Pysiology, 111B, 553-558.

Menasveta, P., Choosuwap, J., Piyatirathivorakul, S., Fast, A., Latscha, T., 1994. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaus mondon fabricius*) in: The third Asian fisheries forum. Asian Fisheries Society, 713-716.

Mike, W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl Chem. v. 63, p. 141-146.

Olson, J. A., 1993. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological Context. J. Nut. Sci. Vitamins, 39, 57-65.

Parisenti, J., Beirão. L. H., Tramonte, V. L. C. G., Ourique, F., Brito, C. C. S., Moreira, C. C., 2011. Preference ranking of color in raw and cooked shrimps. International J. Food Sci., 46, 2558-2561.

Petit, H., Sances, S., Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Trilles, J. P., 1991. Ontogeny of carotenoids metabolism in the prawn *Penaeus japonicas* Bat (1888) (*crustacea, peneidae*). A qualitative approach. Comp Biochem Physiol, 99B, 667-671.

Rodriguez-Amaya D. B., 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: Internacional Life Sciences Institute Press, 2001. 64 p.

Rosa, L., Galván, F., 1999. Interation between saline stress and photoinhibition of photosynthesis in the freshwater green algae Chlamydomonas reinhardtii. Implications for glycerol photoproducion. Plant. Physiol. Bioch., 33, 7-8.

Safari, O., Atashi. M. M. S., 2015. The effects of dietary supplement of annatto (*Bixa Orellana*) seed meal on blood carotenoid content and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss).* Aquaculture, 937, 275-281.

Samocha, T. M., Prangnell, D., Hanson, T. R., Treece, D. G., Morris, T. C., Castro, L. F., Starensinic, N., 2017. Design and operation of super-intensive biofloc-dominated systems for indor prodution of the pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. World Aquaculture Society.

Schiedt, K., Bischof, S., Glinz, E., 1993. Metabolism of carotenoids and in vivo rancemization of (3S, 3'S) Astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. Meth. Enzymol., 214, 148-168.

Silva, J. H. V., Silva, E. L., Jordão-Filho, J., Ribeiro, M. L. G., Costa. F. G. P., 2006. Resíduo da semente de urucum (*Bixa Orellana* L.) como corante da gema, pele, bico e ovário de poedeiras avaliado por dois métodos analíticos. Ciênc. Agrotec., 30 (5), 988-994.

Skrede, G., 1987. Rapid analysis in food processing and food control. Proceeding of the fourth European conference on food chemistry, Loen.

Tocchini, L., Mercadante, A. D., 2001. Extração e determinação, por clae, de bixina e norbixina em colorífícos. Ciênc. Tecnol. Aliment., 21, (3).

United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), 1983. Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring. Manual and Guides. Intergovernmental Oceanographic Commissiony, Paris, France.

Vernon-Carter, E. J., Ponce-Palafox, J. T., Pedrosa-Islas, R., 1996. Pigmentation of Pacific White shrimp (*Penaeus vannamei*) using Aztec marigold (*Tagets erecta*) extracts as the carotenoids source. Arch Latinoam Nutr, 46, 243-246.

Weber, S., 1998. Determination of stabilized, added astaxanthin in fish feeds and premixes with HPLC. In Analytical Methods for Vitamins and Carotenoids in Feeds. Roche Publication no 2264, 1998.

You, K., Yang, H., Liu, Y., Zhou, Y., Zhang, T., 2006. Effects of different light sources and illumination methods on growth and body color of shrimps *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 265, 557-565.

6. ARTIGO 2

Suplementação de astaxantina em ração comercial extrusada na alimentação de *Pomacea diffusa*

Daniel Pereira da Costa[a], Raphael Nogueira Bahiense[a], Ricardo Marcelo Geraldi[a], Sérgio Rodrigues da Silva[a], Leonardo Vaz Pereira[b], Tainára Cunha Gemaque[a], Daniela Chemim de Melo Hoyos[a], Kleber Campos Miranda Filho[a]

[a]Laboratório de Aquacultura, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[b]Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Parauapebas, Parauapebas, PA, Brasil.

Publicado como capítulo no livro: Engenharia de Aquicultura no Brasil: Pesquisas, tendências e atualidades. Anita Rademaker Valença; Poliana Alberto dos Santos (Org.). Florianópolis: CCA/UFSC, 2018, p. 83-95.

Suplementação de astaxantina em ração comercial extrusada na alimentação de *Pomacea diffusa*

RESUMO

Popularmente conhecidos como ampulárias esses moluscos gastrópodes são usualmente cultivados como organismos ornamentais em várias partes do mundo. A coloração desses animais é um dos pontos que atrai os seus admiradores e estimula sua aquisição no mercado. O pigmento mais difundido como suplemento para intensificação de cor em organismos aquáticos é a astaxantina. Ainda não existem rações específicas para a ampulária, reforçando a necessidade de testar alternativas de alimentos e suplementos que melhorem o desempenho produtivo e a atratividade do animal. Os objetivos desse estudo foram mensurar a capacidade de acumulação de astaxantina sintética em diferentes níveis de inclusão na dieta de *Pomacea diffusa* em sua influência na concentração do pigmento e nos índices zootécnicos ao final do cultivo e verificar a influência da mudança da dieta de ração de peixes para ração de camarão na condição corporal dos moluscos em comparação com o início do trabalho. Foram testados seis tratamentos com ração suplementada com 0, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg de astaxantina sintética em animais de 0,60±0,23 g de peso. Durante os 60 dias de cultivo foram mensurados os índices zootécnicos: Taxa de crescimento específico, conversão alimentar aparente, eficiência alimentar, ganho de peso, ganho de altura, ganho de comprimento e também auferidas a concentração de astaxantina muscular e fator de condição (Kr). As ampulárias alimentadas com ração comercial extrusada para camarão marinho apresentaram melhores índices de conversão alimentar, altos índices de eficiência alimentar e fator de condição acima da média inicial, o que demonstra que esse alimento pode ser utilizado para seu cultivo. A suplementação dietética de astaxantina sintética não resultou em aumento significativo da concentração desse pigmento na musculatura do gastrópode.

Palavras-chave: ampulária; moluscos; gastrópodes; pigmentos; carotenoides.

ABSTRACT

Popularly known as apple snail these gastropod mollusks are usually grown as ornamental organisms around the world. The coloring of these ornamental animals is one of the points that attracts their admirers and stimulates their acquisition in the market. The most widespread pigment as a supplement for color enhancement in aquatic organisms is astaxanthin. There are still no specific rations for the apple snail reinforcing the need to test alternatives of food and supplements that improve the productive performance and attractiveness of the animal. The objectives of this study were to measure the accumulation capacity of synthetic astaxanthin at different levels of inclusion in the diet of *Pomacea diffusa* in its influence on the pigment concentration and the zootechnical indexes at the end of the culture. And in parallel to verify the influence of the diet change from fish feed to extruded shrimp feed on the body condition of the mollusks compared to the beginning of the work. Six treatments were tested with feed supplemented with 0, 25, 50, 100, 200, 400, 400 mg/kg of synthetic astaxanthin in animals of 0.60± 0.23 g in weight. During the 60 days of cultivation were measured the zootechnical indexes: Specific growth rate, apparent feed conversion, feed efficiency, weight gain, height gain, length gain. Astaxanthin and muscle concentration and condition factor (Kr) were also obtained. Apple snails fed commercial shrimp feed had low feed conversion rates, high feed efficiency and condition factors above the initial average, which demonstrates that this feed can be used for their cultivation. Dietary supplementation of synthetic astaxanthin did not result in a significant increase in the concentration of this pigment in the musculature of this mollusk.

Keywords: apple snail; mollusks; gastropods; pigments; carotenoids.

1. INTRODUÇÃO

As ampulárias do gênero *Pomacea* são amplamente difundidas para o uso como espécies ornamentais (NG et al., 2016). Existem populações desse gênero com crescimento expressivo como espécies invasoras introduzidas em alguns países asiáticos, europeus e do continente americano (MORRISON e HAY, 2011; ACCORSI et al., 2014; HORGAN et al., 2014; KARRAKER e DUDGEON, 2014). As ampulárias mais comuns no aquarismo são das linhagens coloridas da espécie *Pomacea diffusa*, a qual tem destacado apelo estético como organismo ornamental e pelo seu hábito alimentar de consumir perifíton e organismos que compõem os bentos, assim sendo, as ampulárias são utilizadas como organismo limpador de aquários. Sua origem é amazônica e tem ampla distribuição no mundo (ISHIKAWA, 2018).

Os padrões de cor da concha e da musculatura desses moluscos chamam a atenção e determinam a escolha do espécime a ser adquirido pelos compradores e criadores dessa espécie no hobby do aquarismo. Na figura 1 podemos observar os padrões de coloração de *P. diffusa* disponíveis. Basicamente temos dois tipos de cor principal no músculo em *Pomacea*, sendo claro (albino ou amarelo) e escuro com a presença de pigmento (YUSA, 2004). Também pode haver variações de mistura entre os referidos padrões e vários tipos de cor da concha que são resultado provável da mistura de pigmentos amarelo/laranja e violeta como em outros moluscos (KOSMINSKY e LEZIN, 2006). A cor da concha ainda é influenciada pela cor de fundo que é dada pela coloração do tegumento do animal, já que a concha possui certo grau de transparência e também pelas listras que podem ou não estarem presentes (ESTEBENET et al., 2006).

Na musculatura desses moluscos pode-se identificar a presença de cromatóforos repletos de cor avermelhada ou alaranjada, proveniente de pigmentos carotenoides os quais são adquiridos pela dieta do animal (TSUSHIMA et al., 1997). Como o valor e a importância dos organismos ornamentais estão geralmente ligadas à sua cor, um acréscimo na pigmentação pode ser interessante do ponto de vista comercial, dando melhor aspecto e aproveitando todo o potencial de expressão da cor naturalmente inerente nos moluscos (DANIEL et al., 2017).

Para organismos aquáticos em geral, o principal pigmento utilizado para aumentar a coloração vermelha é a astaxantina. Esse pigmento na forma artificial é o mais utilizado na produção comercial de organismos aquáticos tanto ornamentais quanto de corte (DANIEL et al., 2017).

A astaxantina possui a maior atividade antioxidante entre os carotenoides naturais, possuindo um potencial de quelatação de radicais livres, superior ao da vitamina E (MIKE,

1991). Adicionalmente, ela inibe a peroxidação lipídica mitocondrial e contribui para a estabilidade da membrana celular (GOTO et al., 2001).

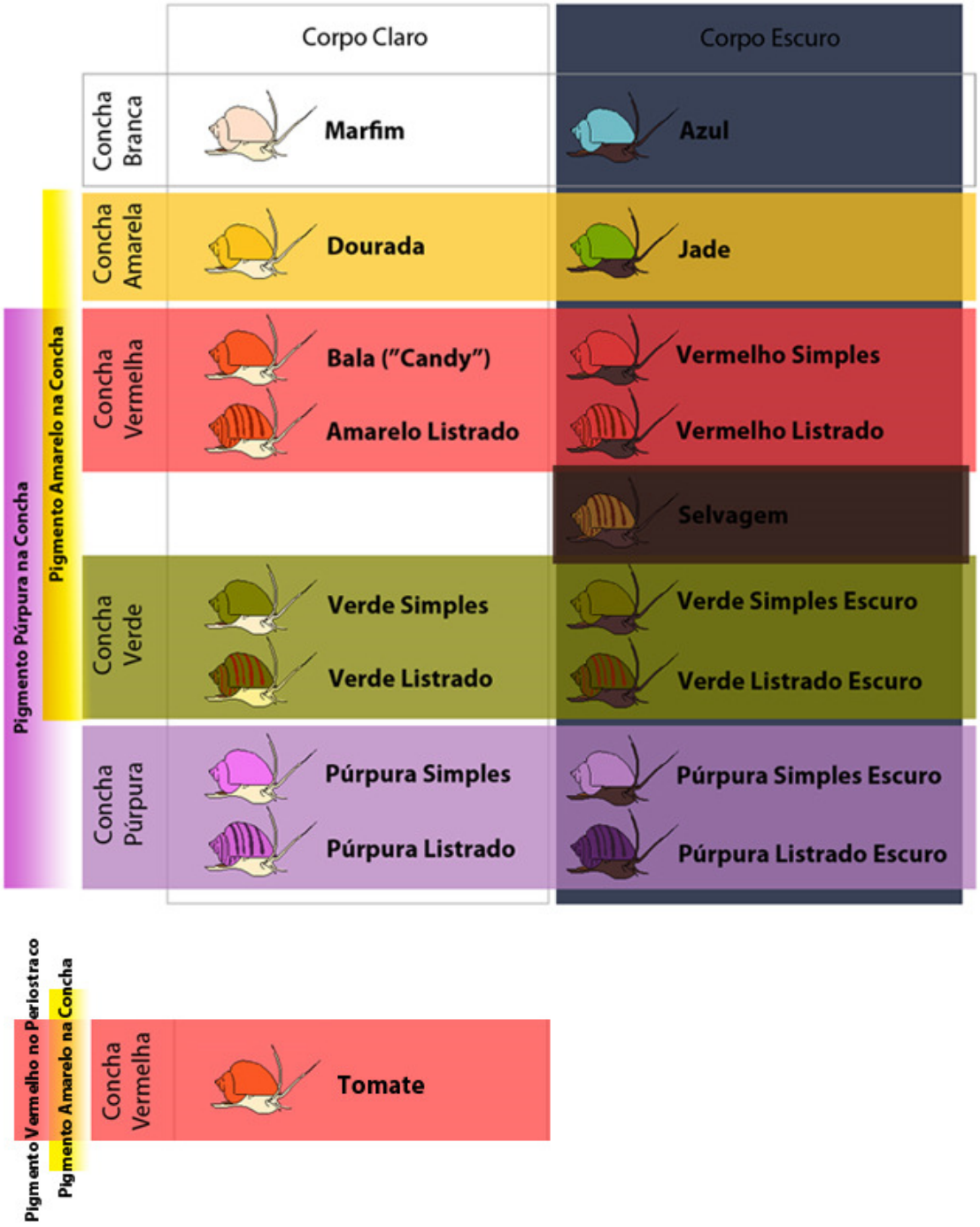


Figura 1. Padrões básicos de pigmentação em *Pomacea diffusa*. Fonte: Ishikawa (2018)

A capacidade de transformação de pigmentos precursores em astaxantina varia de acordo com a espécie de organismo aquático, podendo ser inexistente, ou possível a partir de carotenos

ou de algumas xantofilas, processo comumente observado em moluscos, crustáceos e peixes (LATSCHA, 1991; SCHIEDT et al., 1993; GOUVEIA et al., 2003; GÜROY et al., 2012).

De acordo com TSUSHIMA et al. (1997), *Pomacea caniculata* apresenta baixa concentração de astaxantina em relação a outros carotenoides. Portanto, não se sabe se o fornecimento suplementar de astaxantina para *P. diffusa* traria benefícios de desempenho e incremento de coloração para esses moluscos. Sendo que para tanto, a capacidade de acumulação desse pigmento necessita ser testado nos animais.

A alimentação artificial fornecida em ensaios pode influenciar a condição corporal dos moluscos. Como o gênero *Pomacea* é naturalmente consumidor de alimentos com alta umidade e/ou restos de ração de peixes, como fauna secundária em aquários, estes animais podem sofrer influência positiva se alimentados com rações de invertebrados como de camarões marinhos.

Os objetivos desse estudo foram mensurar a capacidade de acumulação de astaxantina sintética em diferentes níveis de inclusão na dieta de *Pomacea diffusa* e sua influência na concentração do pigmento e nos índices zootécnicos ao final do cultivo e, em paralelo, verificar a influência da mudança da dieta, de ração de peixes para ração de camarão, na condição corporal e produtiva dos moluscos em comparação com o início do trabalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Maricultura do LAQUA (Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária da UFMG). Num delineamento inteiramente casualizado foram utilizados 180 ampularias *Pomacea diffusa* da linhagem dourada provenientes do laboratório peixes ornamentais e criados com ração de peixes 2,4 mm com 35% de proteína bruta (Guabi® Nutrição e Saúde Animal S.A., Sales Oliveira, SP, Brasil) com o peso médio 0,60±0,23 g divididos em seis tratamentos com três repetições de 10 indivíduos para cada tanque de 15 litros em sistema de recirculação de água com filtragem por mídias flutuantes por aeração MBBR (Nanoplastic®, São Paulo, SP, Brasil). Os tratamentos empregados foram: controle alimentado uma vez por dia com ração comercial extrusada de 2,4mm para camarão marinho (35% de proteína bruta, Guabi®, Sales Oliveira, SP, Brasil) sem adição de pigmentos e nos demais foi utilizada a astaxantina sintética Carophyll Pink 10% (DSM® - Heerlen, Países Baixos) aspergida nas rações nas proporções de 25, 50, 100, 200 e 400 mg/Kg de ração por 60 dias consecutivos.

Foram mensuradas as seguintes variáveis para composição dos índices zootécnicos do estudo: peso inicial, aos 30 e 60 dias foi auferido com balança de precisão 0,01 g BL series (SHIMADZU®, Barueri, SP, Brasil), o comprimento e altura da concha foram auferidos nos mesmos dias do parâmetro anterior com paquímetro digital com precisão de 1 mm conforme indicado na figura 2. Por fim, foi estimada a quantificação da ração consumida pelos animais por pesagem diária e recolhimento de sobras posteriormente secadas em estufa e pesadas.

Os parâmetros de qualidade de água, temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido (OD) foram medidos com sonda multiparâmetros COMBO pH e EC e medidor de OD HI 9146 (Hanna Instruments®, Rhode Island, EUA), respectivamente. As concentrações de Amônia Total (N-AT) e Nitrito ($N\text{-}NO^{2-}$) foram monitoradas segundo a metodologia descrita pela UNESCO (1983). Para a alcalinidade foi utilizado o método APHA (1998). Os indicadores de qualidade de água mensurados no experimento se mantiveram sem variações expressivas ($P>0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Duncan já que o sistema de recirculação mantinha a mesma água e o sistema de filtragem foi eficiente para manter a estabilidade em todos os tratamentos. Os valores médios foram: temperatura 31,5 ± 1,06°C, pH 6,84 ± 0,42, oxigênio dissolvido 6,24 ± 0,56 mg/L, salinidade 0,38 ± 0,07, alcalinidade 53,33 ± 4,88 mg/L $CaCO_3$, amônia 0,58 ± 0,29 mg/L N-AT, nitrito 0,26 ± 0,11 mg/L $N\text{-}NO_2^-$.

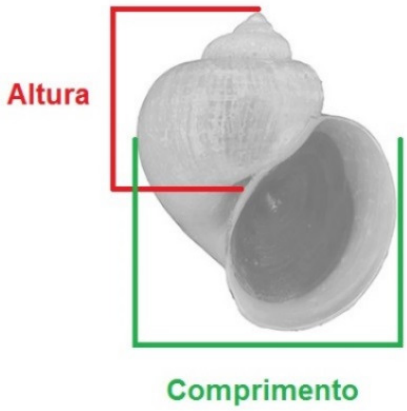


Figura 2. Pontos de medições em *Pomacea diffusa.*

O cálculo dos índices zootécnicos foi feito baseado nas seguintes equações: taxa de crescimento específico (TCE) – relativo ao crescimento diário dos animais, em valores percentuais. Para seu cálculo, utilizou-se a seguinte expressão (1):

$$TCE\ (\%\ /dia) = \frac{\ln peso\ final\ (g)\ - \ln peso\ inicial\ (g)}{tempo\ (dias)}\ x\ 100$$

conversão alimentar aparente (CA-A) – equivalente à quantidade de ração necessária para o animal ganhar 1 kg de peso vivo (2):

$$CA - A = \frac{ração\ consumida\ (g)}{peso\ final\ (g) - peso\ inicial\ (g)}$$

eficiência alimentar (EA) – constitui o ganho de peso médio por molusco no grupo, dividido pelo consumo médio de ração por indivíduo. Demonstra a eficiência que o animal teve para converter a ração consumida em peso vivo (3):

$$EA\ (\%) = \frac{ganho\ de\ massa\ (g)}{quantidade\ de\ ração\ ingerida\ (g)}\ x\ 100$$

ganho de peso (GP) – é o peso final do animal menos o peso inicial do animal. Esse cálculo é obtido pela seguinte fórmula (4):

$$GP = peso\ final\ (g) - peso\ inicial\ (g)$$

ganho de altura (GA) – é a altura final do animal menos a altura inicial. Esse cálculo é obtido pela seguinte fórmula (5):

$$GA = altura\ final\ (mm) - altura\ inicial\ (mm)$$

ganho de comprimento (GC) é a altura final do animal menos a altura inicial. Esse cálculo é obtido pela seguinte fórmula (6):

$$GC = comprimento\ final(mm) - comprimento\ final\ (mm)$$

fator de condição relativo (Kr) – mede indiretamente o estado fisiológico do animal em relação às reservas energéticas armazenadas, tais como glicogênio hepático e gordura corporal. Praticamente indicando se o animal se encontra gordo ou magro conforme a curva de regressão da média populacional. Para sua determinação, foi usada a seguinte fórmula (7):

$$Kr = peso\ observado\ (g) \div peso\ esperado\ (g)$$

Para determinar a concentração de carotenoides totais com base em astaxantina (C-AST). Foi feito o abate dos animais por crionarcose, amostras da musculatura de um animal por tratamento foram maceradas em gral de porcelana até formar uma pasta fina. Uma porção de um grama de peso foi separada em tubo de ensaio para extração dos carotenoides em acetona e depois filtrada em papel filtro deixando repousar protegida da luz até a medição. Esse processo foi repetido até a completa extração do pigmento da amostra. Os extratos foram corrigidos no seu volume até a solução obter uma amostra de 5 mL para análise. A quantidade de astaxantina na musculatura dos gastrópodes foi determinada por espectrofotometria UV no aparelho Libra S22 (Biochrom®, Cambridge, Reino Unido) tendo base o pico de astaxantina no comprimento de onda de 480 nm como principal indicador. O cálculo do valor é feito pela seguinte expressão (8).

$$C - AST = \frac{ABS\ x\ FD\ x\ V}{CA\ x\ CO}$$

Onde:

CA = Coeficiente de absorção da astaxantina $A^{1\%}{}_{1cm} = 2100$

ABS = Absorbância da astaxantina na solução de acetona a 480 nm

FD = Fator de diluição

V = Volume da amostra em g

CO = comprimento ótico da cubeta = 1cm

A análise estatística foi realizada inicialmente com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Para os resultados relativos a concentração de astaxantina foi utilizada a regressão linear e para o Kr a regressão quadrática. O programa estatístico escolhido foi o INFOSTAT versão 2017.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os índices zootécnicos não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (P>0,05), os resultados estão expressos na tabela 1. Estes demonstram que a suplementação de astaxantina sintética na ração nos níveis testados não alterou o desenvolvimento dos moluscos. SANTOS et al. (1995) afirmam que alimentando *Pomacea sordida* com alimentos volumosos como Alface *Lactuca* sp. e Rami *Boehmeria nivea* foi observada uma conversão alimentar de 6:1 e a aceitação alimentar variando conforme a fase de desenvolvimento do molusco gastrópode. A sobrevivência final foi de 100% em todos os tratamentos.

Comparativamente no presente estudo e no trabalho de SOUZA JÚNIOR et al. (2013) com *P. lineata e P. bridgessi*, a ração de camarão com 35% de proteína bruta apresenta índices de conversão alimentar melhores e, bem semelhantes entre si, portanto, mais eficientes que dietas volumosas. No quesito taxa de crescimento específico o presente trabalho apresentou valores superiores ao trabalho citado anteriormente no qual os valores ficaram entre 1,65 e 1,77% ao dia. MORRISON e HAY (2011) observaram menor percentagem de crescimento de *P. diffusa* em relação ao consumo das plantas *Utricularia* sp. e *Bacopa carolineana* do que outras espécies e.g. *P. insularum, P. caniculata, P. paludosa* e *P. haustrum*. Também foi detectado baixo consumo de dietas volumosas com essas e outras plantas consumidas por *P. diffusa* em relação às demais espécies. Isto pode ser o indício de um hábito menos herbívoro nesta espécie, atrelado ao fato da boa conversão de ração comercial. Desta forma, é recomendável o uso de dietas concentradas na criação desse gastrópode.

Tabela 1. Índices zootécnicos (média e devio padrão) mensurados nos diferentes tratamentos com adição de astaxantina sintética na alimentação de ampulária dourada *Pomacea diffusa*.

Dieta	**Índices Zootécnicos**					
AST mg/Kg	**TCE %**	**CA-A**	**EA %**	**GP g**	**GA mm**	**GC mm**
0	3,31 ± 0,19	0,85 ± 0,13	119,6 ± 18,4	3,83 ± 0,59	4,11 ± 0,21	7,55 ± 0,97
25	3,37 ± 0,44	0,83 ± 0,14	122,0 ± 19,7	3,89 ± 0,63	4,38 ± 1,37	8,21 ± 1,22
50	3,34 ± 0,16	0,85 ± 0,19	121,6 ± 24,2	3,9 ± 0,77	4,81 ± 0,35	6,67 ± 2,01
100	3,44 ± 0,14	0,79 ± 0,03	127,2 ± 4,4	4,07 ± 0,14	4,96 ± 0,29	8,3 ± 0,44
200	3,5 ± 0,48	0,77 ± 0,17	133,2 ± 27,3	4,26 ± 0,87	5,24 ± 0,77	8,38 ± 1,4
400	3,52 ± 0,13	0,74 ± 0,09	136,6 ± 15,8	4,37 ± 0,51	5,4 ± 0,07	8,8 ± 0,48

TCE = taxa de crescimento específico, CA-A = conversão alimentar aparente, EA = eficiência alimentar, GP = ganho de peso, GA = ganho em altura, GC = ganho em comprimento. Não houveram diferenças significativas entre os tratamentos (P>0,05) pelo teste de Duncan.

A concentração de astaxantina corporal nas ampulárias não sofreu variações significativas entre os tratamentos (P=0,5442). Resultados expressos na figura 3.

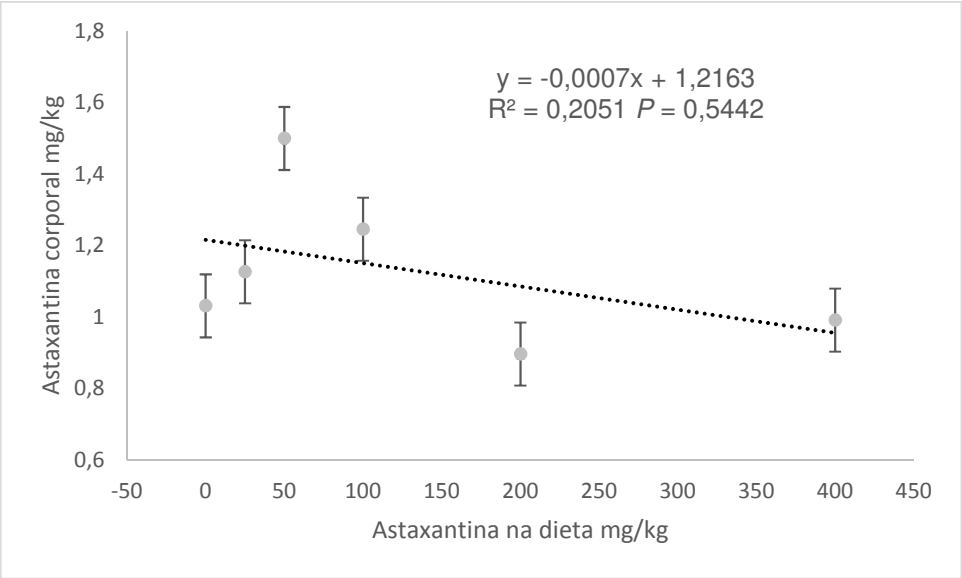


Figura 3. Concentração muscular de astaxantina em *Pomacea diffusa* alimentada com ração comercial de camarões com diversos níveis de incusão se astaxantina sintética após 60 dias de cultivo. Não houve diferenças significativas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade e baixa correlação entre a astaxantina corporal e a suplementada.

Este resultado demonstra que a capacidade de acumulação muscular desse pigmento nesses moluscos na fase de vida estudada é limitada e não sofre alterações mesmo com suplementação. Os níveis de pigmento no músculo foram muito baixos em relação a quantidade suplementada e o pigmento pode ter sido direcionado para outros tecidos ou eliminado nas fezes.

No estudo de TSUSHIMA et al. (1997), com *Pomacea caniculata* selvagem, foram encontrados no hepatopâncreas e músculos: β-caroteno, β-criptoxantina, luteína e zeaxantina, com maior quantidade de β-caroteno (39,1 ± 1,10%) no hepatopâncreas e de zeaxantina no músculo (40,8 ± 3,25%), o qual se acredita que seja o principal pigmento responsável pela cor amarelada nos animais albinos. Nas gônadas (61,0 ± 3,57%), ovos (75,0 ± 4,56%) e larvas (79,0 ± 2,46%), o pigmento principal foi a astaxantina.

Aparentemente, os moluscos desse gênero acumulam esses pigmentos e fazem a conversão em astaxantina somente no período reprodutivo como forma de proteção dos ovos e formas larvais com alta concentração e potencial de utilização em alimentação animal como

descrito por YANG et al. (2016). Ainda no estudo mencionado, a maior acumulação de astaxantina quando esta foi adicionada a dieta foi verificada no hepatopâncreas dos animais.

Para o fator de condição relativo (Kr), expresso na figura 4, foi verificado que os animais de todos os tratamentos obtiveram ganhos significativos com a alimentação com a ração de camarão pelo efeito quadrático demonstrado ($P < 0,0001$).

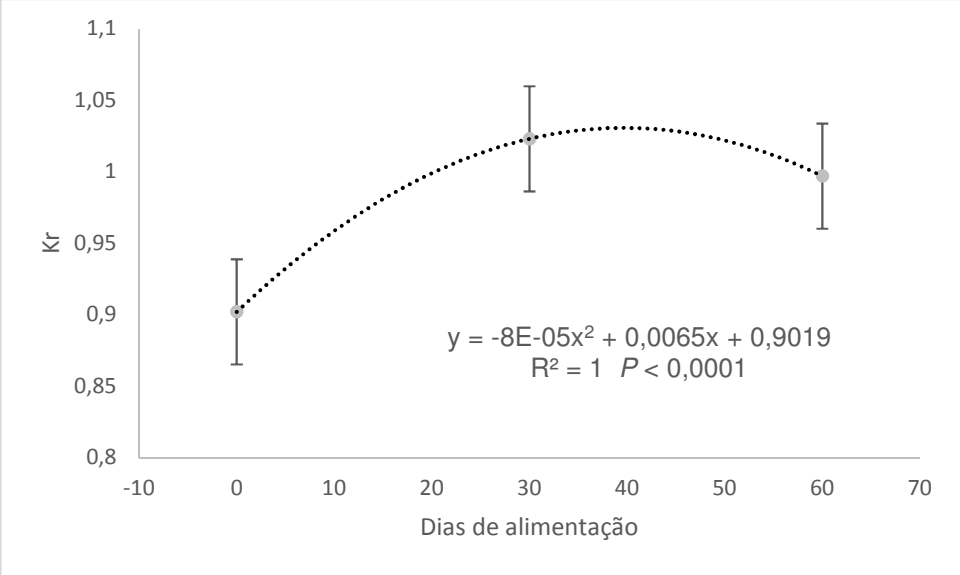


Figura 4. Fator de condição (Kr) de *Pomacea diffusa* alimentada com ração comercial de camarões ao início do experimento (0), com 30 e com 60 dias de cultivo.

Este é um indicativo que essa ração atende de forma satisfatória as necessidades desses moluscos nesta fase do crescimento em relação a fornecida anteriormente. Essa informação pode ajudar na escolha de um alimento para o cultivo da espécie, já que não existem rações específicas disponíveis no mercado.

4. CONCLUSÃO

A suplementação dietética de astaxantina sintética não resultou em aumento significativo da concentração desse pigmento na musculatura do molusco gastrópode. As ampulárias (*P. diffusa*) alimentadas com ração comercial de camarão marinho apresentaram melhor conversão alimentar e elevados valores de eficiência alimentar em relação aos dadso da literatura sobre alimentos volumosos e fator de condição acima da média inicial, o que demonstra que esse alimento pode ser utilizado para seu cultivo.

5. AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsas de estudo aos alunos envolvidos no estudo. À POLI-NUTRI pelo fornecimento de pigmento para os ensaios. À NANOPLASTIC pelo fornecimento das mídias filtrantes.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACCORSI, A.; OTTAVIANI, E.; MALAGOLI, D. Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata*. **Fish Shellfish Immunology.** v. 38, p. 56-64, 2014.

American Public Health Association (APHA). **Standard metods for the examination of water and wastewater**. American Public Healt Association, American Water Works Association. Water Enviromental Federation, 20, 1998.

DANIEL N., SIVARAMAKRISHNAN, T., SUBRAMANIYAN, S., FAIZHULLAH, M. M., FERNANDO, H. Application of carotenoids on coloration of aquatic animals. **International Journal of Fisheries and Aquatic Research**. v. 2, p. 1-7, 2017

ESTEBENET, A.L., MARTIN, P.R., SILVANA, B. Conchological variation in *Pomacea canaliculate* and other South American Ampullariidae (Caenogastropoda, Architaenioglossa). **Biocell**. v. 30, n. 2, p. 329-335, 2006.

GOTO, S.; KOGURE, K.; ABE, K.; KIMATA, Y.; KITAHAMA.; YAMASHITA, G.; TERADA, H. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochimica at Biophysica Acta**. v. 1512, p. 251-258, 2001.

GOUVEIA, L.; PEREIRA, O.; EMPIS. J. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. **Aquaculture Nutrition**, v.9 p.123-129, 2003,

GÜROY, B.; SAHIN, I.; MANTOELV, S.; KAYALI, S. *Spirulina* as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail ciclid *Pseudotropheus algi*. **Aquaculture International**. v. 20, p. 869-878, 2012.

HORGAN, F.G.; FELIX, M.I.; PORTALANZA, D. E.; SÁNCHEZ, L.; MOYA RIOS, W.M.; FARAH, S.E.; WITHER, J.A.; ANDRADE, C.I.; ESPIN, E.B. Responses by farmers to the apple snail invasion of Ecuador's rice fields and attitudes toward predatory snail kites. **Crop Protection**. v. 62, p. 135-143, 2014.

ISHIKAWA, W. Variedades de cor em *Pomacea diffusa*. 2018. Disponível em: http://www.planetainvertebrados.com.br/index.asp?pagina=artigos_ver&id=87 acesso: 16/06/2018.

KARRAKER, N. E.; DUDGEON, D. Invasive apple snails (*Pomacea canaliculata*) are predators of amphibians in South China. **Biological Invasions.** v. 16, n. 9, p. 1785-1789, 2014.

KOZMINSKY, E. V; LEZIN, P. A. Distribution of pigments in the shell of the gastropod *Littorina obtusata* (Linnaeus, 1758). **Russian Journal of Marine Biology**. v. 33, n. 4, p. 238-244, 2006.

LATSHA, T. Crustacean Pigments. **Crustacean Nutrition Newsletter**. v. 7, p. 53-60,1991.

MIKE, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**. v. 63, p. 141-146, 1991.

MORRISON, W.E.; HAY, M.E. Feeding and growth of native, invasive and non-invasive alien apple snails (Ampullariidae) in the United States: Invasives eat more and grow more **Biological Invasions**. v. 13, n. 945, p. 945-955, 2011.

NG, T. H.; TAN, S. K.; WONG, W. H.; MEIER, R.; CHAN, S-Y.; TAN, H. H.; YEO, D. C. J. Molluscs for sale: Assessment of freshwater gastropods and bivalves in the ornamental pet trade. **PLoS ONE**. v. 11, n. 8, p. 1-23, 2016.

SANTOS, N. N.; MIGUEL, M. C. V.; MESQUITA, E. F. M. Cultivo de *Pomacea sordida* (Swainson, 1823) em Cativeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 2, n. 3, p. 81-86, 1995.

SCHIEDT, K.; BISCHOF, S.; GLINZ, E. Metabolism of carotenoids and in vivo rancemization of (3S, 3'S) astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. **Methods in Enzymology**. v. 214, p. 148-168, 1993.

SOUZA JUNIOR, E.; BARROS, J. C. N. DE; PARESQUE; K.; FREITAS, R. R. DE. The effect of stocking density on the growth of apple snails native *Pomacea bridgesii* and exotic *Pomacea lineata* (Mollusca, Gastropoda). **Academia Brasileira de Ciências**. v. 85, n. 2, p. 753-760, 2013.

TSUSHIMA, M.; KATSUYAMA, M.; MATSUNO, T. Metabolism of carotenoids in the apple snail, *Pomacea canaliculata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. v. 118, p. 431-436, 1997.

United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), 1983. **Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring**. Manual and Guides. Intergovernmental Oceanographic Commissiony, Paris, France, 1983.

YANG, S.; LIU, Q.; WANG, Y.; ZHAO, L-L.; WANG, Y.; YANG, S-Y.; DU, Z-J.; ZHANG, J-E. Effects of dietary supplementation of golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) egg on survival, pigmentation and antioxidant activity of Blood parrot. **Springer Plus**. v. 5, p. 1-11, 2016.

YUSA Y. Inheritance of colour polymorphism and the pattern of sperm competition in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). **Journal of Molluscan Studies**. v. 70, p. 43-48, 2004.

7. ARTIGO 3

Efeito de carotenoides dietéticos em reprodutores de camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum*

Daniel Pereira da Costa[ab], Claudiana Lima Castilho[b], Uclédia Roberta Alberto dos Santos[b], Tainára Cunha Gemaque[a], Leandro Fernandes Damasceno[c], Jô de Farias Lima[b], Kleber Campos Miranda Filho[a].

[a]Laboratório de Aquacultura, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais;

[b]Laboratório de Aquicultura e Pesca, Centro de Pesquisa Agroflorestal do Amapá, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

[c]Laboratório de Nutrição Animal, Centro de Pesquisa Agroflorestal do Amapá, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Formatado segundo as normas da revista *Arquives of Animal Nutrition* para submissão.

Efeito de carotenoides dietéticos em reprodutores de camarão da Amazônia
Macrobrachium amazonicum

Resumo

O objetivo do estudo foi testar a inclusão de extratos naturais e solução de astaxantina sintética na dieta do camarão da Amazônia, *Macrobrachium amazonicum*, e verificar seu efeito no desempenho, índices corporais e acumulação total de astaxantina nos tecidos reprodutivos e gametas desse crustáceo, em comparação com animais selvagens recém capturados. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados utilizados cinco tratamentos e os dois sexos com três repetições cada: dieta controle sem inclusão de pigmentos (CONT-015); dieta contendo extrato natural de buriti que tem o betacaroteno como principal pigmento (βCAR-038); dieta com inclusão de extrato natural de urucum que tem a bixina como pigmento principal (BIXN-289) e dieta com astaxantina sintética (ASTX-197) em 20 dias de experimento. Foram utilizados 180 camarões, sendo 60 machos (6,08 ± 1,96 g) e 120 fêmeas (4,55 ± 1,03 g) distribuídos em cinco grupos contendo 4 machos e 8 fêmeas cada. Quatro grupos foram submetidos às dietas em tanques de recirculação de 60 litros, somados ao tratamento de animais que não passaram pela alimentação com as dietas (NATURAL) foi analisado. Não houve diferenças significativas no desempenho e índices corporais. A quantidade de espematóforos liberados, espermatozoides vivos, pigmentação corporal e dos ovos foi superior nos tratamentos BIXN-289 e ASTX-197 em relação ao controle. O tratamento ASTX-197 se mostrou superior ao grupo NATURAL na pigmentação corporal de fêmeas e ovos e liberação de espermatóforos pelos machos. Estes resultados demonstram que a utilização de pigmentos carotenoides na dieta é benéfica para reprodução de camarão *M. amazonicum.*

Palavras chave: buriti, urucum, astaxantina, ração de camarão, desempenho reprodutivo.

1. Introdução

Os carotenoides são componentes alimentares importantes para o metabolismo dos crustáceos (Meyrs 2000). Estes pigmentos influenciam o desenvolvimento geral dos camarões influenciando no desenvolvimento normal, na produtividade, resistência ao estresse e sobrevivência (Niu et al. 2011; Aguirre-Hinojosa et al. 2012; Wang et al. 2018). De acordo com Wade et al. (2017), os carotenoides são indispensáveis para o perfeito desenvolvimento das características reprodutivas dos camarões utilizados na aquicultura.

Os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* demonstram diferenças no desempenho reprodutivo em resposta ao uso de alimentos ricos em carotenoides na sua dieta, tendo melhorado o seu desempenho (Tizkar et al. 2014). A astaxantina é o principal pigmento acumulado pelos camarões, possui papel fundamental para o desempenho reprodutivo e precocidade reprodutiva (Paibulkichakul et al. 2008; Scabini et al. 2011; Vilchez et al. 2011) e também para o desenvolvimento embrionário e larval em *Macrobrachium* (Ribeiro et al. 2001).

O camarão da Amazônia *Macrobrachium amazonicum* é uma das espécies mais produzidas na região norte do Brasil, tanto pela pesca artesanal para consumo direto, quanto pelo cultivo relacionado a recria e engorda de juvenis provenientes da pesca em gaiolas (Marques et al. 2012). Sua ocorrência natural é na região de clima de monções da Amazônia e já foi introduzido para cultivo comercial em diversos pontos da América do Sul (Silva et al. 2017).

Alimentos utilizados na região amazônica como o buriti *Mauritia flexuosa* e o urucum *Bixa orellana* são ricos em pigmentos (Saini et al. 2015). Estes têm a possibilidade de promover efeitos positivos sobre a espécie estudada. A utilização de extratos de plantas é uma forma de fornecer carotenoides precursores os quais têm o potencial de serem convertidos em astaxantina pelos camarões (Vernon-Carter et al. 1996; Arredondo-Figueiroa et al. 2004; Göcer et al. 2006; Aguirre-Hinjosa et al. 2012).

O objetivo desse estudo foi testar a inclusão de extratos naturais e solução de astaxantina sintética na dieta do camarão da Amazônia e verificar seu efeito no desempenho, índices corporais e acumulação total de astaxantina nos tecidos reprodutivos e gametas desse crustáceo, em comparação com animais selvagens recém-capturados.

2. Material e Métodos

2.1 Parâmetros de qualidade de da água

Os parâmetros de qualidade de água: Temperatura (T°C), potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), sólidos dissolvidos totais (TDS), salinidade (SAL) e potencial de oxirredução (POR) foram mensurados com sonda multiparâmetros U-5000 (HORIBA®, Kioto, Japão). Os compostos nitrogenados, amônia total (N-AT), nitrito ($N\text{-}NO_2^-$) e a alcalinidade (ALC) foram determinados utilizando kits colorimétricos e fotômetro multiparâmetros HI 83200 (HANNA INSTRUMENTS®, Woonsocket, Rhode Island, EUA).

2.2 Delineamento experimental e formulação das dietas

O experimento foi delineado em blocos casualizados contendo cinco tratamentos com três repetições. Foram utilizados 180 camarões recém-capturados da natureza distribuídos em cinco grupos contendo 4 machos (6,08 ± 1,96 g) e 8 fêmeas (4,55 ± 1,03 g) conforme a dieta: 1 - animais submetidos a dieta controle sem inclusão de pigmentos (CONT-015); 2 - animais submetidos a dieta contendo extrato natural de buriti que tem o betacaroteno como principal pigmento (βCAR-038); 3 - animais submetidos a dieta com inclusão de extrato natural de urucum que tem a bixina como pigmento principal (BIXN-289); 4 - animais submetidos a dieta com astaxantina sintética (ASTX-197) e 5 - animais que não foram submetidos a nenhuma dieta (NATURAL) que somente se alimentaram no ambiente natural antes da captura. Sendo assim um grupo representando a dieta selvagem, dois grupos com baixa concentração de pigmentos e

dois grupos com alta concentração de pigmentos conforme descrição na Tabela 1. Os pigementos foram incluídos nas dietas por asperção dos extratos na superfície do pellet.

Os camarões foram obtidos com pescadores da região de Macapá - AP Latitude: 00º 02' 20" N, Longitude: 51º 03' 59" W, levados para o laboratório de aquicultura do Centro de Pesquisa Agroflorestal do Amapá, uma unidade descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amapá. Os 36 camarões destinados ao levantamento das características selvagens foram prontamente analisados segundo os parâmetros de estudo (índices corporais, espermatozoides e pigmentos), os demais que passaram pelos tratamentos com dietas experimentais foram cultivados em 12 tanques de 60 litros, sendo, quatro tratamentos com três repetições em cada. A ração foi fornecida na quantidade de 2 g por repetição diariamente (3,3% do peso vivo) divididas em duas alimentações sendo 0,5 g pela manhã (10:00 h) e 1,5 g à noite (18:00 h). As sobras de ração foram coletas e congeladas diariamente para posterior secagem em estufa a 60ºC e determinação da conversão e eficiência alimentar.

Para as análises de concentração de pigmentos foram amostrados aleatoriamente três machos e três fêmeas de cada tratamento (n=6) e dissecados para separação dos órgãos a serem mensurados (estômago, hepatopâncreas, gônadas).

A composição proximal dos alimentos (Tabela 1) foi feita com base nas seguintes metodologias: Matéria seca (MS): secagem em estufa a 105ºC até peso constante, segundo metodologia IAL (2008). Proteína Bruta Total (PBT): determinada através do Método Kjeldahl. O teor de proteína bruta foi calculado multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 5,46 (%N x 5,46) (IAL 2008; Souza e Nogueira 2005). Extrato Etéreo (EE): determinado em aparelho Soxhlet com éter de petróleo sob refluxo durante 4 horas (Silva e Queiroz 2002; Souza e Nogueira 2005). Cinzas (CNZ): determinada gravimetricamente em mufla a 105°C/4h (IAL 2008; Souza e Nogueira 2005). Fibra Bruta (FB): determinada gravimetricamente através do

resíduo remanescente de digestão ácida e alcalina. (Silva e Queiroz 2002; Souza e Nogueira 2005). Fósforo (P): por complexação do fósforo com vanádio-molibdato de amônio e determinação por espectrofotometria na região do visível, segundo metodologia IAL (2008). Determinação de Cálcio (Ca): titulação complexométrica com EDTA, segundo metodologia IAL (2008).

Tabela 1. Concentração de nutrientes e pigmentos na Matéria Seca (MS) das dietas experimentais de reprodutores de camarões da Amazônia.

	Dietas experimentais			
Composição analisada	CONT-015	βCAR-038	BIXN-289	ASTX-197
Matéria seca (MS) [%]	92,36	89,71	91,49	92,15
Proteína bruta [% na MS]	37,83	37,19	36,70	37,87
Extrato etéreo [% na MS]	7,31	7,98	7,4	7,67
Fibra bruta [% na MS]	4,43	3,46	5,74	4,03
Cinzas [% na MS]	14,37	14,73	14,46	14,44
Extrato não nitrogenado [% na MS]	32,8	30,21	32,93	32,18
Cálcio [% na MS]	1,88	1,41	1,96	1,68
Fósforo [% na MS]	0,86	0,88	0,92	0,83
Carotenoides e retinoides totais				
βcaroteno [mg/kg]	15,71	38,09	-	-
Bixina [mg/kg]	-	-	289,71	-
Astaxantina [mg/kg]	-	-	-	197,45
Retinol [mg/kg]	8,06	8,0	8,01	8,04

As dietas experimentais contêm os seguintes aditivos: CONT-015 sem suplementação de pigmentos, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética.

2.3 Desempenho

2.3.1 Índices zootécnicos

O cálculo dos índices zootécnicos foi feito baseado nas seguintes equações:

Taxa de crescimento específico (TCE) - relativo ao crescimento diário dos animais, em valores percentuais. Para seu cálculo, utilizou-se a seguinte expressão (1):

$$TCE\ (\%\ dia) = \frac{\ln peso\ final\ [g]\ - \ln peso\ inicial\ [g]}{tempo\ (dias)}\ x\ 100$$

Conversão alimentar aparente (CA-A) - equivalente à quantidade de ração necessária para o animal ganhar 1 kg de peso vivo (2):

$$CA - A = \frac{ração\ consumida\ [g]}{peso\ final\ [g] - peso\ inicial\ [g]}$$

Eficiência alimentar (EA) - constitui o ganho de peso médio por crustáceo no grupo, dividido pelo consumo médio de ração por indivíduo. Demonstra a eficiência que o animal teve para converter a ração consumida em peso vivo (3):

$$EA\ (\%) = \frac{ganho\ de\ massa\ [g]}{quantidade\ de\ ração\ ingerida\ [g]}\ x\ 100$$

Ganho de peso (GP) - é o peso final do animal menos o peso inicial do animal. Esse cálculo foi obtido pela seguinte fórmula (4):

$$GP = peso\ final\ [g] - peso\ inicial\ [g]$$

Ganho de comprimento (GC) é o comprimento final do animal subtraído do comprimento inicial. Esse cálculo foi obtido pela seguinte fórmula (5):

$$GC = comprimento\ final\ [mm] - comprimento\ final\ [mm]$$

Fator de condição relativo (Kr) - mede indiretamente o estado fisiológico do animal em relação às reservas energéticas armazenadas, tais como glicogênio hepático e gordura corporal. Praticamente indicando se o animal se encontra gordo ou magro conforme a curva de regressão da média populacional. Para sua determinação, foi usada a seguinte fórmula (6):

$$Kr = peso\ observado\ [g] \div peso\ esperado\ [g]$$

2.3.2 Índices corporais e de rendimento

Os cálculos dos índices corporais e de rendimento foram feitos com base nas seguintes equações:

Índice gastrossomático (IGAS - S) equivalente ao peso do estômago em relação ao corpo do camarão. Descrito pela equação (7):

$$IGAS - S = \frac{peso\ do\ estômago\ [g]}{peso\ total\ [g]}\ x\ 100$$

Índice gonadossomático (IGON - S) representa a proporção do peso das gônadas do animal em relação ao peso corporal. Deve ser mensurado separadamente entre os sexos, pois o gênero define diferenças consideráveis nesta variável. A expressão do cálculo se deu por (8):

$$IGON - S = \frac{peso\ das\ gônadas\ [g]}{peso\ do\ total\ [g]}\ x\ 100$$

Índice hepatossomático (IHEP - S), variável que mensura a proporção do fígado do animal em relação ao peso total do crustáceo. O cálculo se deu pela expressão (9):

$$IHEP - S = \frac{peso\ do\ fígado\ [g]}{peso\ total\ [g]}\ x\ 100$$

Rendimento do camarão descabeçado (R - DESCAB) é a proporção de produto comercializável na forma descrita sem o cefalotórax do crustáceo, ou seja, somente o abdome com seus anexos. Para seu cálculo utilizou-se a pesagem individualizada desta parte do animal dividida pelo peso total (10):

$$R - DESCAB = \frac{peso\ do\ abdome\ [g]}{peso\ total\ [g]}\ x\ 100$$

Rendimento do filé do camarão limpo sem a casca (R – FILÉ) considerada a parte abdominal, excluindo-se a carapaça e anexos como pléopodos e nadadeiras, ficando a musculatura e alguns agregados como tubo neural e intestino inferior. Para expressar este valor utilizamos a seguinte equação (11):

$$R - FILÉ\ = \frac{peso\ descascado\ [g]}{peso\ total\ [g]}\ x\ 100$$

2.3.3 Composição centesimal dos animais

A composição proximal dos animais foi feita com base nas seguintes metodologias: Umidade (UMD): Secagem em estufa a 105ºC até peso constante, segundo metodologia IAL

(2008). Proteína Bruta Total (PBT): determinada através do Método Kjeldahl. O teor de proteína bruta foi calculado multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 5,46 (%N x 5,46) (IAL 2008; Souza e Nogueira 2005). Lipídios Totais (LPT): determinado em aparelho Soxhlet com éter de petróleo sob refluxo durante 4 horas (Silva e Queiroz 2002; Souza e Nogueira 2005). Cinzas (CNZ): determinada gravimetricamente em mufla a 105°C/4h (IAL 2008; Souza e Nogueira 2005) Fósforo (P): Por complexação do fósforo com vanádio-molibdato de amônio e determinação por espectrofotometria na região do visível, segundo metodologia IAL (2008). Cálcio (Ca): Determinação por titulação complexométrica com EDTA, segundo metodologia IAL (2008).

2.3.4 Desempenho reprodutivo da fêmea

As desovas por fêmea (DPF) foram mensuradas por observação diária de todas as fêmeas em cada tanque e anotados os dados para posterior comparação estatística dividindo o número de desovas pela quantidade inicial de fêmeas como na expressão (12).

$$DPF = \frac{número\ total\ de\ desovas}{quantidade\ inicial\ de\ fêmeas}$$

Para o a contagem do número de ovos por grama de fêmea (O[g]F) foi feita a contagem do número de ovos após a postura retirando-se a massa de ovos, procedendo a contagem de três parcelas individuais e determinada a quantidade média de ovos por grama, depois multiplicando-se o valor pela massa total de ovos e dividindo pelo peso da fêmea como na expressão (13).

$$O[g]F = \frac{número\ total\ de\ ovos}{peso\ da\ fêmea}$$

Para obter uma referência visual da coloração dos ovos relacionada a concentração de pigmento mensurada estes foram observados a olho nú e sua aparência anotada.

2.3.5 Desempenho reprodutivo do macho

Para a retiradas dos espermatóforos nos machos foi realizada a eletroejaculação nos camarões imobilizados com gomas de borracha presas a uma base de espuma, utilizando até três choques de 9V na base do quinto par de periópodos e coletando com uma pinça estéril. A contagem de espermatozoides vivos (EV), foi feita segundo a metodologia de Lueng-Trujilo e Lawrence (1987), através de contagem em hematocitômetro utilizando como contrastes hematoxilina/eosina. Foram selecionados quatro grupos de 100 espermatozoides de cada macho e contados os números de células vivas. Então, a média individual dessas quatro contagens representou a viabilidade espermática como disposto na expressão (14).

$$EV = \textit{média de } 4 \textit{ grupos com } 100 \textit{ espematozoides de cada macho}$$

Além dessa contagem foi também mensurado o número de coletas de espermatóforos num período de 24 horas finais do experimento e nas 24 horas iniciais para o grupo NATURAL como na expressão (15).

$$EL = \textit{média do número de coletas por repetição}$$

2.4 Análise da concentração dos pigmentos e retinol

Os tecidos dos camarões foram macerados em etanol 96°GL e analisados em espectrofotômetro UV SP220 (Bioespectro®, Curitiba, PR, Brasil), no comprimento de onda de 478nm de absorbância (ABS) da astaxantina e coeficiente de absorção $E^{1\%}_{1cm}$ 2100 para cálculo do valor de [mg/kg] de astaxantina contido no tecido expressa como concentração corporal de astaxantina (CCA). Para as dietas (Tab. 1) foi utilizada a mesma técnica sendo a dieta ASTX-197 com os mesmos valores para os animais, para CONT-15 e βCAR-38, a ABS de 452nm e coeficiente de absorção de $E^{1\%}_{1cm}$ 2620 e na dieta BIXN-289, a ABS de 457nm e coeficiente de absorção de $E^{1\%}_{1cm}$ 3443. Para determinação do retinol foi utilizada ABS de 325nm e o coeficiente de absorção $E^{1\%}_{1cm}$ 1780, como na metodologia descrita por Dias et al. (2010). O

cálculo foi feito pela metodologia de Rodriguez-Amaya (2001); Rodriguez-Amaya e Kimura (2004), seguindo a equação (16) a saber:

$$[\text{mg pigmento/kg}] = \frac{\text{ABS x FD x V}}{\text{CA x [g]}}$$

Onde:

ABS = Absorbância do pigmento na solução de etanol [nm]

FD = Fator de diluição (=1000000)

V = Volume da solução

CA = Coeficiente de absorção $E^{1\%}_{1cm}$ do pigmento em etanol

[g] = gramas de amostra utilizada

2.5 Análise estatística

Os dados forma submetidos inicialmente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Determinadas as características dos dados foram utilizados com os testes de Duncan para as variáveis paramétricas e de Kruskal-Wallis para as não paramétricas, ambas ao nível de significância de 5%. A análise estatística foi feita no programa INFOSTAT versão 2017 (Casanoves et al. 2012).

3. Resultados

3.1 Qualidade da água

As variáveis físico-químicas da água do cultivo tiveram os seguintes valores médios: Temperatura 27,45ºC (± 0,47); pH 8,5 (± 0,42); Oxigênio dissolvido 7,06 mg/L (± 1,14); Condutividade elétrica 0,45 µS/cm (± 0,04); sólidos dissolvidos totais 0,30 mg/L (± 0,03); Salinidade 0,2 (±0,0); Amônia total 0,12 mg/L (± 0,04); Nitrito 0,09 mg/L (± 0,02); Potencial de Oxirredução 205,45 mV (± 26,96) e Alcalinidade 43,49 mg/L $CaCO_3$ (± 9,59).

3.2 Dieta

A composição analisada das dietas experimentais está descrita na tabela 1 onde são identificados os tratamentos e seus aditivos pigmentantes e concentrações utilizadas. Os demais componentes da ração comercial não foram alterados.

3.3 Desempenho

3.3.1 Índices zootécnicos

A tabela 2 mostra que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos para os índices de GP, GC, GB, CA-A, TCE, EA e SOB.

3.3.2 Índices corporais e de rendimento

Na tabela 3 podemos observar que os índices IGA-S, IGON-S, IHEP-S, R-DESCAB e R-Filé não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$). Somente foi observada diferença significativa no IGON-S entre os sexos devido às diferenças morfologias inerentes a cada sexo. No caso do fator de condição (Kr) foi evidenciado que os animais (sexo grupado) submetidos aos tratamentos CONT-015, βCAR-038, BIXN-289 e ASTX-197 apresentaram valores médios maiores que o grupo com dieta NATURAL ($p<0,05$). Analisando cada sexo isoladamente vemos que a resposta do Kr foi maior nas médias das fêmeas nos grupos experimentais ($p<0,05$), as quais demonstraram diferença significativa nos tratamentos em relação ao grupo NATURAL, enquanto as médias dos machos em separado não tiveram o mesmo comportamento ($p<0,05$).

3.4 Composição centesimal dos camarões

Observando a tabela 4 nota-se que o teor de UMD nos camarões foi maior no tratamento controle (CONT-015) em relação aos demais tratamentos ($p<0,05$), apesar de o teor de PBT nesse tratamento ser superior ao dos tratamentos βCAR-038 e ASTX-197 ($p<0,05$). O

tratamento CONT-015 ainda apresentou índices inferiores de CNZ e P em relação aos demais grupos ($p<0,05$). O grupo de animais alimentados com dieta NATURAL apresentou os menores índices de LPT em relação aos animais alimentados com as rações em cultivo ($p<0,05$). Os níveis analisados de Ca apresentaram resultados numericamente superiores nos dois tratamentos com quantidades mais concentradas de carotenoides (BIXN-289 e ASTX-197) e no grupo de dieta NATURAL ($p<0,05$) em relação aos demais tratamentos.

3.5 Desempenho reprodutivo da fêmea

As fêmeas de camarão da Amazônia como descrito na tabela 5 não apresentaram diferenças significativas no desempenho reprodutivo nas variáveis testadas DPF e O[g] F ($p>0,05$). Contudo, apresentaram diferenças visíveis na coloração externa dos ovos, sendo as fêmeas submetidas aos tratamentos CONT-015, βCAR-038 de cor ocre semelhante ao grupo de dieta natural e, nos demais animais, a cor dos ovos foi mais escura com tonalidade marrom nos animais do tratamento BIXN-289 e preto no grupo ASTX-197 (Tab. 5).

3.6 Desempenho reprodutivo do macho

Na Figura 1 podemos observar que o tratamento ASTX-197 teve desempenho superior no número de unidades de EL em relação ao grupo de camarões machos alimentados com dieta NATURAL e controle (CONT-015), enquanto os tratamentos βCAR-038 e BIXN-289, os machos apresentaram resultados intermediários ($p<0,05$). A Figura 2 mostra que a percentagem de EV foi inferior no tratamento controle (CONT-015) e intermediário no tratamento βCAR-038 em relação aos demais grupos ($p<0,05$).

3.7 Concentração de pigmentos

A CCA nos camarões da Amazônia fêmeas (Figura 3) e machos (Figura 4) variou de acordo com o tratamento empregado ($p<0,05$). Nas fêmeas do tratamento controle (CONT-015), no qual a ração não foi suplementada com aditivos pigmentantes.

Tabela 2. Índices zootécnicos (média e desvio padrão) de camarões da Amazônia alimentados com dietas contendo diferentes fontes de pigmentos.

	Índices Zootécnicos						
Grupos	**GP [g]**	**GC [cm]**	**GB [g]**	**CA-A***	**TCE [%]**	**EA [%]**	**SOB [%]**
CONT-015	0,31 ± 0,05	-0,07 ± 0,22	3,19 ± 0,47	8,40 ± 1,44	1,54 ± 0,23	12,15 ± 2,12	86,16 ± 4,81
βCAR-038	0,37 ± 0,14	0,06 ± 0,05	3,59 ± 0,92	7,66 ± 2,95	1,87 ± 0,71	14,36 ± 5,17	83,33 ± 14,43
BIXN-289	0,44 ± 0,19	-0,01 ± 0,14	4,92 ± 1,97	6,44 ± 2,28	2,19 ± 0,94	17,08 ± 6,73	94,44 ± 4,81
ASTX-197	0,37 ± 0,24	0,15 ± 0,10	3,45 ± 2,00	10,21 ± 8,14	1,85 ± 1,22	14,62 ± 9,79	83,33 ± 14,43

GP = ganho de peso, GC = ganho em comprimento, GB = ganho em biomassa, CA-A = conversão alimentar aparente, TCE = taxa de crescimento específica, EA = eficiência alimentar, SOB = sobrevivência. Sem diferenças significativas pelo teste paramétrico de Duncan ($p > 0,05$) ou em variável marcada com * pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina.

Tabela 3. Índices corporais e fator de condição relativo (média e desvio padrão) dos camarões da Amazônia cultivados com diferentes fontes de pigmentos.

Grupos		Índices corporais					Fator de condição
		IGA - S [%]*	IGON – S [%]*	IHEP – S [%]*	R – DESC [%]	R – FILÉ [%]	Kr*
Total	NATURAL	0,91 ± 0,34	2,19 ± 2,02	5,14 ± 2,63	53,28 ± 2,99	39,92 ± 4,45	0,98 ± 0,14[a]
	CONT-015	0,79 ± 0,26	1,67 ± 2,14	3,63 ± 1,33	50,65 ± 5,76	37,71 ± 7,44	1,03 ± 0,12[b]
	βCAR-038	0,70 ± 0,16	3,03 ± 3,13	4,03 ± 1,07	50,50 ± 4,63	36,56 ± 3,02	1,03 ± 0,11[b]
	BIXN-289	1,05 ± 0,59	2,58 ± 3,57	3,40 ± 0,90	48,81 ± 2,47	35,96 ± 3,51	1,05 ± 0,11[b]
	ASTX-197	1,06 ± 0,74	2,79 ± 3,13	3,65 ±1,24	51,41 ± 2,99	37,54 ± 3,91	1,06 ± 0,13[b]
	Machos	0,78 ± 0,18	0,52 ± 0,21[a]	4,37 ± 1,84	51,53 ± 3,30	37,91 ± 4,02	1,02 ± 0,13
	Fêmeas	1,24 ± 0,55	4,39 ± 2,66[b]	3,57 ± 1,20	50,32 ± 4,31	36,92 ± 5,01	1,00 ± 0,14
Machos	NATURAL	0,65 ± 0,16	0,57 ± 0,45	6,78 ± 3,04	55,43 ± 1,69	38,76 ± 1,37	1,02 ± 0,15
	CONT-015	0,82 ± 0,29	0,52 ± 0,28	4,23 ± 0,94	48,28 ± 2,10	36,78 ± 3,99	1,01 ± 0,10
	βCAR-038	0,73 ± 0,18	0,55 ± 0,03	3,97 ± 0,30	52,46 ± 4,12	36,40 ± 1,46	0,98 ± 0,06
	BIXN-289	0,87 ± 0,12	0,51 ± 0,01	3,50 ± 1,04	50,47 ± 2,06	37,13 ± 4,54	1,00 ± 0,61
	ASTX-197	0,82 ± 0,13	0,43 ± 0,09	3,38 ± 0,96	50,99 ± 2,36	36,97 ± 0,76	1,02 ± 0,15
Fêmeas	NATURAL	1,16 ± 0,24	3,80 ± 1,48	3,50 ± 0,18	51,05 ± 2,24	35,38 ± 5,34	0,95 ± 0,13[a]
	CONT-015	0,77 ± 0,30	2,83 ± 2,71	3,05 ± 1,58	53,02 ± 7,85	38,77 ± 10,91	1,04 ± 0,13[b]
	βCAR-038	0,67 ± 0,18	5,51 ± 2,46	4,09 ± 1,66	48,28 ± 5,03	36,71 ± 1,46	1,06 ± 0,12[b]
	BIXN-289	1,22 ± 0,88	4,65 ± 4,35	3,30 ± 0,96	47,15 ± 1,64	34,79 ± 5,10	1,07 ± 0,12[b]
	ASTX-197	1,40 ± 0,76	5,15 ± 2,79	3,90 ± 1,64	51,82 ± 0,56	38,12 ± 3,02	1,05 ± 0,15[b]

IGA – S = índice gastrossomático, IGON – S = índice gonadossomático, IHEP – S = índice hepatossomático, R – DESC = rendimento descabeçado, R – FILÉ = rendimento de filé. Letras diferentes numa mesma coluna em variáveis marcadas com * indicam diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Nas demais variáveis não houve diferenças significativas pelo teste paramétrico de Duncan ($p > 0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina. O grupo NATURAL foi avaliado após a captura e recebeu somente alimentação do ambiente natural.

Tabela 4. Composição centesimal (média e desvio padrão) dos camarões da Amazônia cultivados com diferentes fontes de pigmentos em matéria natural (MN).

	Composição					
Grupos	**UMD [%]**	**PBT [%]**	**CNZ [%]**	**LT [%]**	**Ca [%]**	**P [%]**
NATURAL	71,25 ± 1,46^{a}	17,66 ± 0,71^{bc}	4,67 ± 0,08^{b}	2,34 ± 0,11^{a}	1,39 ± 0,28^{c}	0,28 ± 0,04^{b}
CONT-015	74,38 ± 0,44^{b}	18,36 ± 1,27^{c}	2,43 ± 0,38^{a}	3,51 ± 0,22^{b}	0,77 ± 0,24^{ab}	0,19 ± 0,04^{a}
βCAR-038	71,42 ± 1,5 ^{a}	16,04 ± 0,09^{ab}	4,35 ± 0,14^{b}	3,82 ± 0,31^{b}	0,69 ± 0,05^{a}	0,30 ± 0,01^{b}
BIXN-289	72,04 ± 1,46^{a}	16,83 ± 0,67^{abc}	4,80 ± 0,40^{b}	3,59 ± 0,66^{b}	1,11 ± 0,11^{bc}	0,33 ± 0,05^{b}
ASTX-197	70,06 ± 0,64^{a}	15,38 ± 1,13^{a}	4,96 ± 0,17^{b}	3,72 ± 0,11^{b}	1,45 ± 0,29^{c}	0,34 ± 0,04^{b}

UMD = umidade, PBT = proteína bruta total, CNZ = cinzas, LT = lipídeos totais, Ca = cálcio, P = fósforo. Letras diferentes numa mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste paramétrico de Duncan ($p < 0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina. O grupo NATURAL foi avaliado após a captura e recebeu somente alimentação do ambiente natural.

Tabela 5. Índices reprodutivos (média e desvio padrão) das fêmeas de camarão da Amazônia cultivados com diferentes pigmentantes nas dietas.

Tratamentos	**D P F**	**O [g]F**	**APARÊNCIA DOS OVOS**
CONT-015	1 ± 0,13	454 ± 222	Ocre
βCAR-038	0,875 ± 0,13	509 ± 115	Ocre
BIXN-289	1,125 ± 0,13	530 ± 125	Marrom
ASTX-197	0,875 ± 0,13	509 ± 180	Preto

DPF = desovas por fêmea, O[g]F = ovos por grama de fêmea. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan. As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina.

A acumulação de astaxantina foi inferior ao grupo de fêmeas de camarões alimentadas com dieta NATURAL e ao grupo ASTX-197, enquanto os animais dos grupos βCAR-038 e BIXN-289 assumiram valores intermediários. O tratamento ASTX-197 assumiu isoladamente a maior CCA tanto nos machos como nas fêmeas ($p < 0,05$). Os tratamentos CONT-015 e βCAR-038 se mostraram com baixos valores de CCA, enquanto BIXN-289 assumiu um valor intermediário a eles. O tratamento ASTX-197 obteve o melhor resultado na CCA entre os tratamentos com adição de pigmentos. Contudo o grupo dieta NATURAL ainda apresentou maior nível de CCA em relação a CONT-015, βCAR-038 e BIXN-289 ($p<0,05$). A concentração de CAO dos camarões (Figura 5) foi superior nos tratamentos BIXN-289 e ASTX-197, intermediária no tratamento βCAR-038 e inferior no tratamento controle CONT-015 ($p<0,05$).

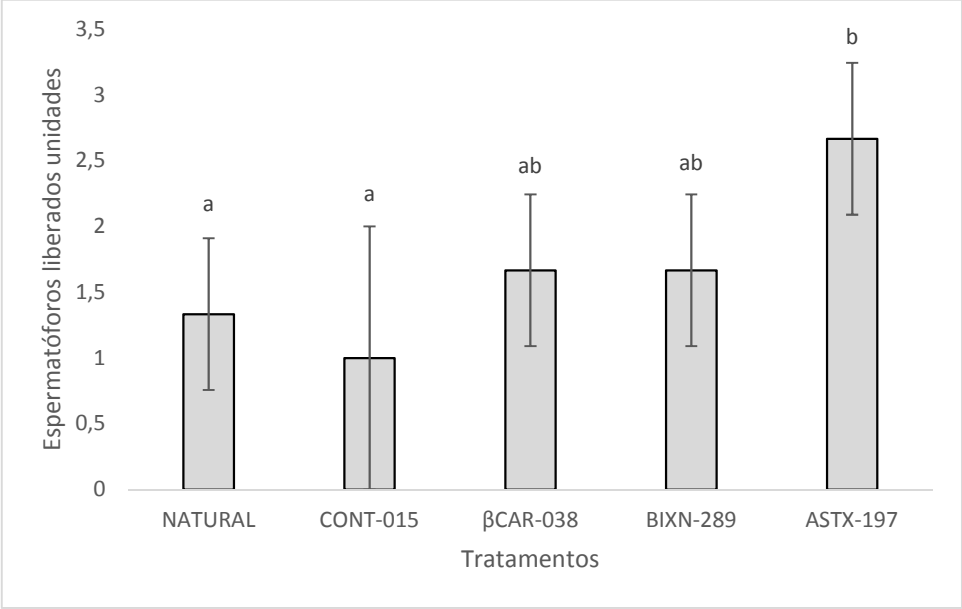


Figura 1. Número de espermatóforos liberados (EL) por machos de camarão da Amazônia (n=6) durante 24 horas pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±). Letras diferentes na parte de cima das colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina. O grupo NATURAL foi avaliado após a captura e recebeu somente alimentação do ambiente natural.

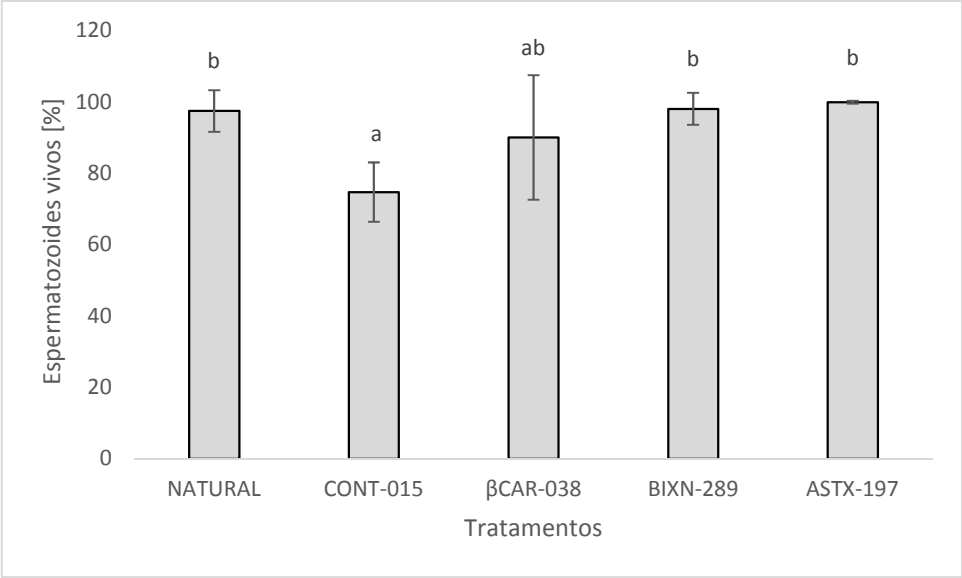


Figura 2. Percentagem de espermatozoides vivos (EV) por machos de camarão da Amazônia (n=6) durante 24 horas pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±). Letras diferentes na parte de cima das colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina. O grupo NATURAL foi avaliado após a captura e recebeu somente alimentação do ambiente selvagem.

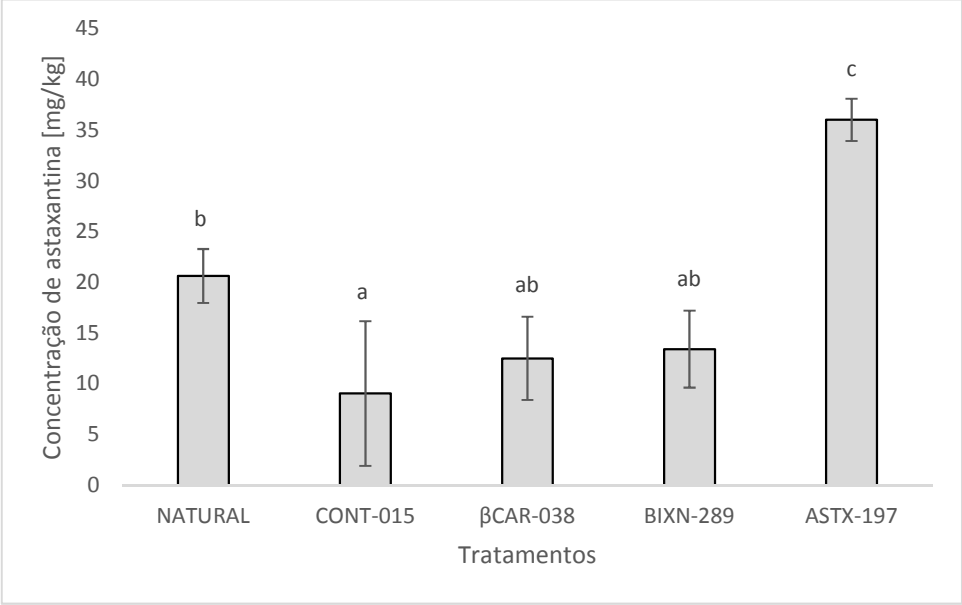


Figura 3. Concentração corporal de astaxantina (CCA) em fêmeas de camarão da Amazônia (n=3) pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±). Letras diferentes na parte de cima das colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina. O grupo NATURAL foi avaliado após a captura e recebeu somente alimentação do ambiente selvagem.

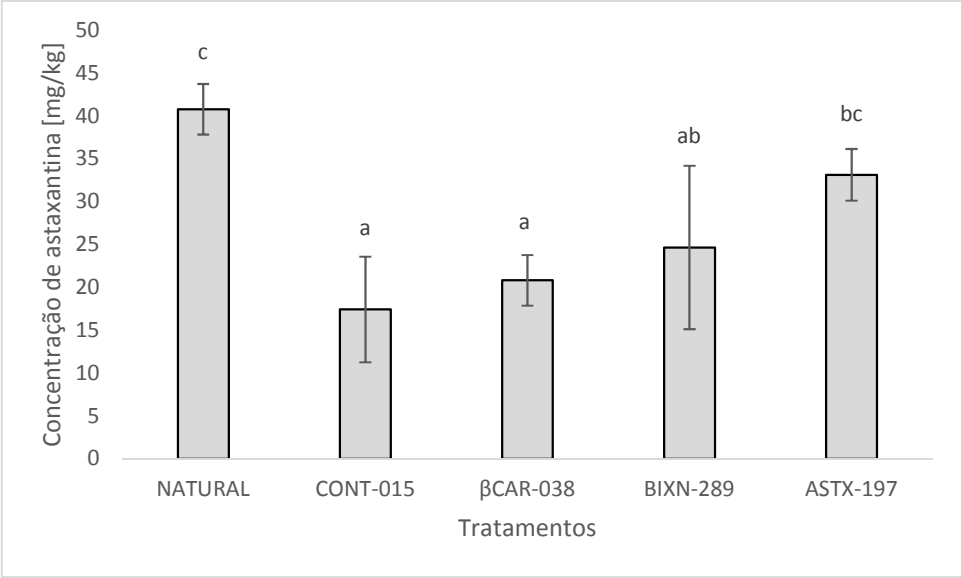


Figura 4. Concentração corporal de astaxantina (CCA) em machos de camarão da Amazônia (n=3) pós captura (NATURAL) e após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±). Letras diferentes na parte de cima das colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina. O grupo NATURAL foi avaliado após a captura e recebeu somente alimentação do ambiente selvagem.

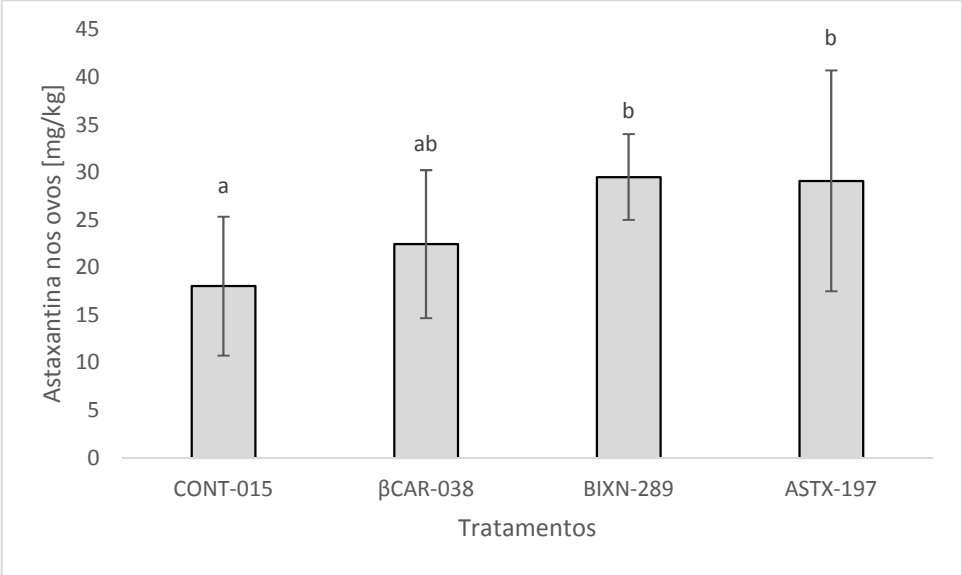


Figura 5. Concentração de astaxantina em ovos (CAO) de camarão da Amazônia (n=6) após 20 dias de cultivo nos demais grupos (médias e desvio padrão ±). Letras diferentes na parte de cima das colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). As dietas experimentais contêm os seguintes níveis de carotenoides totais: CONT-015 sem suplementação de pigmentos [15 mg/kg] de betacaroteno, βCAR-038 com suplementação de extrato de buriti [38 mg/kg] de betacaroteno, BIXN-298 com suplementação de extrato de urucum [298 mg/kg] de bixina e ASTX-197 com suplementação de astaxantina sintética [197 mg/kg] de astaxantina.

4. Discussão

Os valores das variáveis físico-químicas da água estiveram em conformidade com os encontrados para cultivo de *M. amazonicum* em sistemas de recirculação (Henares et al. 2013) e sistemas de cultivo comercial (Keppeler et al. 2012).

Em formas jovens de camarões, o aumento dos níveis de pigmentos carotenoides na dieta determinam maior ganhos de peso, taxa de crescimento específico e melhor conversão alimentar (Zhang et al. 2013). Contudo, no presente estudo, os índices zootécnicos, corporais e de rendimento testados não apresentaram diferenças significativas, muito provavelmente pelos animais se encontrarem em idade adulta, em período reprodutivo e pelo tempo de estudo. Segundo Pangantihon-Kühlmann et al. (1998) a taxa de crescimento de camarões é reduzida à medida que estes animais chegam à maturidade reprodutiva, destinando parte de suas reservas para a reprodução. A respeito do fator de condição (Kr), Rocha et al. (2015) sugerem que os fatores como época do ano, disponibilidade de alimento e condição reprodutiva influenciem o Kr de *M. amazonicum*. Dessa forma, a despeito da época do ano que é a mesma, o fato de receberem uma dieta formulada e estarem em período reprodutivo influenciou positivamente o resultado principalmente do grupo de fêmeas alimentadas com ração em relação ao grupo de camarões alimentados com dieta NATURAL.

Kim et al. (2013) não observaram diferenças significativas no teor de proteína e lipídeos de juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* cultivados com diferentes níveis de carotenoides. As diferenças nesses níveis nos animais podem estar relacionadas aos níveis encontrados nas rações que estão heterogêneos devido a características dos extratos adicionados e sua digestibilidade e efetividade espécie específica. Yanar et al. (2011) encontraram valores maiores de Ca e astaxantina e valores menores de P e lipídeos em camarões marinhos *Penaeus semisulcatus* (19,7 ± 0,21g) selvagens do que nos animais de cultivo. Segundo Milograna et al. (2010), a demanda de cálcio iônico (Ca^{2+}) em *Macrobrachium* são mais acentuadas nos grupos

com maior concentração de astaxantina, pois para acumulação desse pigmento é necessária a utilização do íon no processo de transporte intercelular e existe efeito sinérgico entre esses dois componentes. Possivelmente esse é o motivo para um maior nível desse elemento presente nos grupos com maior acumulação corporal do pigmento e um menor nível de P, CNZ e UMD no grupo controle, pois a demanda tecidual de Ca e P em *Macrobrachium* estão interligadas e proporcionais (Wang et al. 2003). O nível de LPT mais baixo nos camarões do grupo dieta NATURAL corrobora o resultado do Kr já que os dois índices estão altamente correlacionados como descrito por Herbinger e Frias (1991).

O desempenho reprodutivo das fêmeas adultas de camarão não foi influenciado pela adição de pigmentos. Caso a alimentação seja feita desde a fase de crescimento e por um período maior de tempo, efeitos significativos ocorram na precocidade da maturação das gônadas e tempo de desova (Menasveta et al. 1994; Pangantihon-Kühlmann et al. 1998). No caso dos machos, a produção de espematóforos e a sobrevivência de espermatozoides foram influenciados pelos pigmentos da dieta. Segundo Perez-Velazquez e Gonzalez-Féliz (2003), a falta de astaxantina na dieta prejudica a produção de espermatóforos e a qualidade dos espermatozoides dos camarões. Para Braga et al. (2013), a suplementação de alguns tipos de fontes de carotenoides precursores de astaxantina são eficientes na melhora da qualidade do espermatóforo e dos espermatozoides dos camarões. Estes autores ainda sugerem existir diferenças nas exigências por carotenoides entre machos e fêmeas da mesma espécie.

A acumulação corporal de astaxantina mostrou-se aumentada nos tratamentos com utilização de astaxantina sintética e de extrato de urucum. Corroborando o fato de que a astaxantina possui um poder de pigmentação superior, já que não dispende tanto gasto energético e nem é requerida em grande quantidade para a utilização pelos camarões (Arredondo-Figueiroa et al. 2004). Contudo, a bixina proveniente do urucum tem potencial de utilização que pode ser melhor explorado em vista de uma alimentação frequente de custo

reduzido para os reprodutores de camarão da Amazônia como já é utilizada em aquicultura de forma eficaz (Fries et al. 2014; Safari e Atash 2015; Danajaya et al. 2017). A acumulação de astaxantina nos ovos dos camarões pela adição de astaxantina sintética e bixina é desejável, já que a astaxantina auxilia no aumento da taxa de eclosão (Maulana et al. 2017) e posteriormente numa maior sobrevivência, desenvolvimento e resistência a estresse nas larvas (Wang et al. 2018). A aparências dos ovos evidencia que assumem cores mais escuras quando recebem maiores concentrações de pigmentos e a acumulação destes é mais efetiva.

5. Conclusões

A alimentação com ração comercial melhora o fator de condição de reprodutores de camarão da Amazônia, principalmente no caso das fêmeas. A adição de pigmentos carotenoides na dieta desses crustáceos proporciona maior produção de espermatóforos e sobrevivência de espermatozoides. Dietas contendo bixina natural e astaxantina sintética contribuem para a acumulação de astaxantina corporal nos camarões e nos ovos. Não foi observado nenhuma diferença no desempenho dos animais testados com os diferentes pigmentantes.

Declaração de Divulgação

Nenhum potencial conflito de interesse foi relatado pelos autores.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo projeto de pesquisa aprovado protocolo 444367/2014-4 - APQ. À CAPES pela concessão de bolsa de estudo de Daniel Pereira da Costa.

Referências

Aguirre-Hinojosa E, Piña-Valdez P, Garza-Aguirre MC, Guzmán-Ramirez LD, Montoya-Olvera R, Torres-Quiroga J, Nieves-Soto M, 2012. Efecto de las xantofilas de la flor de cempaschúhil *Tagetes erecta L.* em la acumulación de astaxantina y la sobrevivência de postlavas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Rev. Mex. Ing. Quím. 11: 249-257.

Arredondo-Figueiroa JL, Pedrosa-Islas R, Ponce-Palafox JT, Vernon-Carter, EJ, 2004. Pigmentation of pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chile (*Capsicum annum*) in comparsion to astaxanthin. Rev. Mex. Ing. Quím. 2: 101-108.

Bligh EG, Dyer WJ, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

Braga AL, Lopes DLA, Poersh LH, Wasielesky-JR W, 2013. Spermathopore and sperm quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* fed with fresh food supplemented with pollen and paprika. Aquaculture. 380-383: 29-32.

Casanoves F, Balzarini MG, Di Rienzo JA, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW, 2012. InfoStat. User Manual, Córdoba, Argentina.

Dananjaya SHS, Munasinghe DM, Ariyaratne HBS, Lee J, De Zoysa M, 2017. Natural bixin as a potential carotenóid for enhancing pigmentation and colour in goldfish (*Carassius auratus*) Aquac. Nut. 23: 255-263.

Dias SS, Godoy RLO, Pacheco S, Reis RCS, Schutz DF, 2010. Obtenção de padrão analítico de retinol a partir de fígado bovino via cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Fries, GM, Bitarello AC, Zaminhan M, Signor A, Feiden A, Boscolo WR, 2014. Urucum em dietas para alevinos de kinguios *Carassius auratus*: Desempenho produtivo e pigmentação da pele. Semina. Ciênc. Agrár. 35: 3401-3414.

Göcer, M., Yanar, M., Kumulu, M., Yanar, Y, 2006. The effects of red pepper, marigold flower and syntetic astaxanthin on pigmentation, growth and proximate composition of *Penaeus semisulcatus*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 30: 359-365.

Henares MNP, Preto BL, Rosa FRT, Valenti WC, Camargo AFM, 2013. Effects of artificial substrate and night-time aeration on the water quality in *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) pond culture. Aquacult. Res. 2013: 1-8.

Herbinger CM, Frias GW,1991. Correlation between condition factor and total lipid content in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. Aquac. Fish. Manag. 22: 527-529.

IAL - Instituto Adolfo Lutz, 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz. p. 1020. [Versão Eletrônica].

Keppeler EC, Valenti PMCM, Pereira LV, 2012. Temporal variation in the water quality of ponds and effluent grow-out ponds of Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. Rev. Peru Biol. 19: 299-306.

Kim Y-C, Romano N, Lee K-S, Teoh C-Y, NG WK, 2013. Efffect of replacement dietary fish oil and squid liver oil with vegetable oils on the growth, tissue fatty acid profile and total carotenoids of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquac. Res. 44: 1731-1740.

Luen-Trujillo JR, Lawrence A, 1987. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. Aquaculture 65: 363-370.

Marques HLA, Barros HP, Mallasen M, Boock MV, Valenti PMCM, 2012. Influence of stocking densities in the nursery phase on the growth of *Macrobrachium amazonicum* reared in net pens. Aquaculture 358-359: 240-245.

Maulana F, Arfah H, Istifarini M, Satiawati M, 2017. Supplementation of astaxanthin and vitamim E in feed on the development of gonads Pacific white shrimp broodstock. J.A.I. 16: 146-158.

Menasveta, P, Choosuwap J, Piyatirathivorakul S, Fast A, Latscha T, 1994. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaus mondon* Fabricius) in: The third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, p.713-716.

Meyers SP, 2000. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de espécies acuáticas. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S, México. 473-491.

Milograna SR, Bell FT, MacNamara C, 2010. Signal transduction, plasma membrane calcium movements and pigment translocation in freshwater shrimp chromatophores. J. Exp. Zool. 313: 605-617.

Niu J, Tian L, Lin HY, LiuY, 2011. Carotenoids in aquaculture, an overview. J. Anim. Sci. Biotechnol. 2: 44-58.

Paibulkichakul C, Piyatiratitivorakul S, Sorgeloos P, Menasveta P, 2008. Improved maturation of pond reared black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. Aquaculture 282: 83-89.

Pangantihon-Kühlmann MP, Millamena O, Chern Y, 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. Aqua. Liv. Res. 11: 403-409.

Perez-Velasquez M, González-Félix ML, 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. J. World Aquacult. Soc. 34: 92-98.

Ribeiro EA, Genofre GC, McNamara JC, 2001. Identification and quantification of carotenoid pigments during the embryonic development of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). Mar. Fresh. Behav. Physiol. 34(2): 105-116.

Rocha SS, Silva RLS, Santos JL, Oliveira G, 2015. Length-weight relationship and condition fator of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) from a reservoir in Bahia, Brazil. Nauplius 23(2): 146-158.

Rodriguez-Amaya DB. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: Internacional Life Sciences Institute Press, 2001. 64 p.

Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. 2004. Handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2).

Safari O, Atashi MMS, 2015. The effects of dietary supplement of annatto (*Bixa orellana*) seed meal on blood carotenoid content and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 937: 275-281.

Saini RK, Nile SH, Park SW, 2015. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. Food Res. Int. 76: 735-750.

Scabini V, Fernandez-Palacios H, Robaina L, Kalinowski T, Izquierdo MS, 2011. Reproductive performance of gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) fed two combined levels of carotenoids from paprika oleoresin and essential fatty acids. Aquac. Nut. 17: 304-312.

Silva D J, Queiroz AC, 2002. Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos. 3ed. Viçosa: UFV.

Silva RC, Jacobucci GB, Mossolin EC, 2017. Reproductive biology of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) in a reservoir situated in Minas Gerais state, Southeaster Brazil. Lat. Am. J. Aquat. Res. 45: 776-786.

Souza GB, Nogueira ARA, 2005. Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. Embrapa Pecuária Sudeste.

Tizkar B, Seidavi A, Ponce-Palafox JT, Parastoo P, 2014. The effect of astaxanthin on resistence of juvenile praws *Macrobachium niponnense*. (Decapoda: Palaemonidae) to physical and chemical stress. Int. J. Trop. Biol. 62: 1331-1341.

Vernon-Carter EJ, Ponce-Palafox JT, Pedrosa-Islas R, 1996. Pigmentation of pacific White shrimp (*Penaeus vannamei*) using Aztec marigold (*Tagetes erecta*) extracts as the carotenoids source. Arch. Latinoam. Nutr. 46: 243-246.

Vilchez C, Forjan E, Cuaresma M, Bedmar F, Garbayo I, Vega J, 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. Mar. Drugs J. 9: 319-333.

Wade NM, Gabaudan J, Glencross BD, 2017. A review of carotenoid utilization and function in crustaceans aquaculture. Rev. Aquac. 9: 141-156.

Wang, W, Ishikawa M, Koshio S, Yokoyama S, Dawood MAO, Zhang Y, 2018. Effect of dietary astaxanthin supplementation on survival, growth and stress resistence in larval and post larval Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquacult. Res. 49: 2225-2232.

Wang W-N, Wang A-L, Wang DM, Wang L-P, Liu Y, Sun RY, 2003.Calcium, phosphorus and adenylate level and Na^+-K^+ -ATPase of prawn *Macrorachium nipponense*, during the molt cycle. Comp. Biochem. Physiol. A 134: 247-305.

Yanar Y, Göçer M, Yanar M, Kücükgulmez A, 2011. Differences in nutrition composition between cultured and wild green shrimp (*Penaeus semisulcatus*) Ita. J. Food Sci. 23: 436-441.

Zhang J, Liu Y-J, Han L-X, Yang H-J, Ling G-Y, Yue Y-R, Xu DH. 2013. Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Nut. 19: 917-927.

8. ARTIGO 4

Efeitos do uso dietético de astaxantina sintética na alimentação do pacamã *Lophiosilurus alexandri* **um peixe siluriforme neotropical**

Daniel Pereira da Costa[1], Márcio José dos Santos Silva[1], Ricardo Marcelo Geraldi[1], João Paulo Lorenzini[1], Cristiano Campos Mattioli[1], Ronald Kennedy Luz[1], Afonso de Liguori Oliveira[2], Kleber Campos Miranda Filho[1].

[1]Laboratório de Aquacultura, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
[2]Laboratório de Ciência da Carne, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Artigo formatado nas normas da revista *Aquaculture Nutrition* para submissão

Efeitos do uso de astaxantina sintética na alimentação do pacamã *Lophiosilurus alexandri,* um peixe siluriforme neotropical

Resumo

O pacamã *Lophiosilurus alexandri* é um peixe que vem sendo estudado para ser introduzido na aquicultura brasileira. Buscando melhor coloração da sua carne e pele utilizamos seis dietas contendo 0, 25, 50, 100, 200 e 400 mg/kg de astaxantina sintética para alimentação de juvenis durante 62 dias de cultivo. Foram avaliados os parâmetros zootécnicos, sanguíneos, histológicos, assim como a concentração de carotenoides nos tecidos. A inclusão de astaxantina não resultou em diferenças significativas no crescimento, ganho de peso, conversão alimentar aparente e eficiência alimentar dos peixes. O nível de aspartato aminotransferase (AST) no sangue foi mais baixo no tratamento com 400 mg/kg que no controle e 25 mg/kg. Os níveis de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), glicose, colesterol, triglicerídeos, proteína plasmática, hemoglobina e hematócrito não foram alterados nos diferentes tratamentos testados, assim como a condição histológica do fígado. A concentração de carotenoides totais no sangue foi maior no tratamento com 100 mg/kg de astaxantina, enquanto que no tegumento houve um aumento diretamente proporcional aos níveis de inclusão com perda gradativa da taxa de retenção. No músculo, os maiores valores ficaram entre os tratamentos de 100 e 200 mg/kg, sendo que, a menor diferença entre o pigmento no tegumento em relação ao músculo foi no tratamento de 100 mg/kg.

Keywords: peixe-gato, carotenoide, suplemento, aditivo, pigmentação.

1 Introdução

Os peixes siluriformes, também conhecidos como bagres ou "catfish", incluem espécies que em sua maioria possuem grande aceitação de mercado, sendo amplamente cultivadas e comercializadas. Alguns gêneros como *Pseudoplatystoma*, *Ictalurus., Rhamdia.* e os *Clarias*. já possuem um pacote tecnológico definido e contam com uma cadeia produtiva consolidada (Liranço et al., 2011; Liu et al., 2012; Martinelli et al., 2013; Charo-Karisa et al., 2013). Em outras espécies como é o caso do pacamã *Lophiosilurus alexandri*, ainda estão sendo estudadas as características voltadas ao seu potencial como peixe viável à produção aquícola (Costa et al., 2014; Silva et al., 2018). Por se tratar de uma espécie muito consumida pela população local do Rio São Francisco, certa preocupação já existe quanto aos estoques naturais. Como ação paliativa, a atividade aquícola já está atuando com ações de pesquisas voltadas à produção de *L. alexandri* em cativeiro visando o repovoamento e o consumo da espécie.

Uma característica comum dos filés dos siluriformes de cultivo é a pigmentação naturalmente amarelada (Bicudo et al., 2012; Hu et al., 2013), a qual pode dar um aspecto positivo ao produto final e também diferir o produto de outros similares. Esses peixes possuem a capacidade de armazenar diversos carotenoides que dão aspecto natural à sua pele e músculo (Tsushima et al., 2002; Maoka and Akimoto, 2011; Liu et al., 2012). Contudo, tem-se a necessidade de pesquisar uma forma de utilizar aditivos nas rações desses peixes para proporcionar uma pigmentação eficiente e atrativa que estimule o consumidor a dar preferência a essas espécies.

A astaxantina sintética é o pigmento mais utilizado na aquicultura mundial (Breitenbach et al., 2016; Dananjaya et al., 2017) e possui uma eficiência de utilização em relação às fontes naturais de carotenoides precursores para diversas espécies aquícolas (Ingle de la Mora et al., 2006; Göcer et al., 2006; Baron et al., 2008; Aguirre- Hinojosa et al., 2012) Em *L. alexandri* e outros siluriformes sul-americanos, ainda não foi determinada a eficiência do uso de astaxantina

sintética para promover o aumento da pigmentação da musculatura e pele. Aditivamente não se sabe se o uso dessa substância poderia causar algum tipo de efeito no desempenho desse peixe.

Nesse trabalho objetivamos elucidar o uso da astaxantina sintética na bioquímica sanguínea, desempenho produtivo, integridade do fígado e eficiência no acúmulo da substância no filé e na pele de juvenis de pacamã.

2 Material e métodos

2.1 Dietas experimentais

Uma ração comercial para peixes carnívoros de 2 a 4 mm de diâmetro (Guabi® Nutrição e Saúde Animal, Sales Oliveira, SP, Brasil) contendo 90% de matéria seca, 42% de proteína bruta, 11% de extrato etéreo, 3% de fibra bruta e 14% de matéria mineral no peso seco, possuindo 16 mg/kg de carotenoides totais provenientes dos seus ingredientes basais, foi utilizada como dieta controle e base das outras dietas, nas quais foi adicionado pigmento astaxantina sintética10%, Carophyll® Pink (DSM Nutritional Products Ltd, Heerlen, Netherlands) nas proporções de 25, 50, 100, 200 e 400 mg/kg de astaxantina na ração. O pigmento foi dissolvido em álcool 70% e aspergido sobre a ração a qual foi posteriormente seca a temperatura de 30ºC por 24 horas em ambiente escuro.

2.2 Nota ética

Este estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais da UFMG e aprovado mediante o registro CEUA 202/2018.

2.3 Peixes e condições experimentais

O experimento de pigmentação foi concebido com um delineamento inteiramente casualizado (DIC) no Laboratório de Aquacultura da UFMG. Foram utilizados 6 peixes de peso

médio 17,66 g por repetição em 6 tratamentos com 4 repetições em cada um deles em tanques de 12 L com sistema de recirculação de 48 L/h, com aeração auxiliar individual e filtragem por sistema de leito móvel aerado com nano mídias de 15 x 30 mm e densidade 192 kg/m^3 tipo MBBR (Nanoplastic®, São Paulo, SP, Brasil) em um único filtro de 250 L, do qual 50% coberto com as nano mídias. O período de aclimatação foi de 7 dias e o estudo se desenvolveu por 62 dias e um dia de jejum ao final. O alimento foi fornecido duas vezes ao dia na proporção de 5% do peso vivo médio inicial dos peixes diariamente. As pesagens foram feitas em balança de precisão 0,01 g BL series, (SHIMADZU® do Brasil Comércio Limitada, Barueri, SP, Brasil) e as medidas feitas com paquímetro digital de precisão 0,1 mm.

Os parâmetros de qualidade da água, temperatura, pH e salinidade foram medidos com sonda multiparâmetros COMBO EC & pH e o oxigênio dissolvido (OD) pelo oxímetro HI9146 (Hanna Instruments®, Woonsocket, R I, EUA). A amônia total (TA-N), nitrito (NO_2^--N), nitrato (NO_3^--N) e fosfato (PO_4^{-3}-P), foram determinados segundo a metodologia descrita pela UNESCO (1983). Os parâmetros de água mensurados foram temperatura = 27,48 ± 0,97°C, oxigênio dissolvido = 5,59 ± 0,52 mg/L, saturação de oxigênio = 85,04 ± 3,96%, pH = 6,91 ± 0,42, salinidade = 0,16 ± 0,03 ‰ e amônia total = 0,23 ± 0,11 mg/L.

2.4 Índices Zootécnicos

O cálculo dos índices zootécnicos foi feito baseado nas seguintes equações:

- Ganho de peso (GP) – é o peso final do animal menos o peso inicial do animal. Esse cálculo é obtido pela seguinte fórmula (1):

$$GP = \ peso\ final\ [g] - peso\ inicial\ [g]$$

- Ganho de comprimento (GC) é o comprimento final do animal menos o comprimento inicial. Esse cálculo é obtido pela seguinte fórmula (2):

$$GC = comprimento\ final\ [cm] - comprimento\ inicial\ [cm]$$

- Ganho em largura (GL) é a largura final do animal menos a largura inicial. Esse cálculo é feito com a fórmula a seguir (3):

$$GL = largura\ final\ [cm] - largura\ inicial [cm]$$

- Conversão alimentar aparente (CAA) – equivalente à quantidade de ração necessária para o animal ganhar 1 kg de peso vivo (4):

$$CA - A = \frac{ração\ consumida\ [g]}{peso\ final\ [g] - peso\ inicial\ [g]}$$

- Eficiência alimentar (EA) – constitui o ganho de peso médio por animal no grupo, dividido pelo consumo médio de ração por indivíduo. Demonstra a eficiência que o animal teve para converter a ração consumida em peso vivo (5):

$$EA\ (\%) = \frac{ganho\ de\ massa\ [g]}{quantidade\ de\ ração\ ingerida\ [g]}\ x\ 100$$

- Taxa retenção de carotenoides % (TR) no filé foi mensurada através da equação (6) descrita por Foss et al. (1984):

$$Taxa\ de\ retenção\ de\ carotenoides(\%) = x = \frac{\frac{mg}{kg}\ de\ carotenoides\ no\ filé\ x\ (100)}{\frac{mg}{\text{kg}}\ de\ carotenoides\ na\ dieta}$$

- Proporção relativa de carotenoides do tegumento e músculo x:y (PR) dada pela equação (7):

$$Proporção\ relatica\ de\ carotenóides = \frac{\frac{mg}{kg}\ carotenoides\ no\ tegumento}{\frac{mg}{kg}\ carotenoides\ no\ músculo}$$

2.5 Análises Sanguíneas

Ao final do experimento, os juvenis de pacamã foram privados de alimento por 24 he o sangue foi amostrado a partir da veia caudal, utilizando-se agulhas heparinizadas em seringas de 1 mL. A glicose foi medida com um glicosímetro portátil (Biocheck, TD4225, Bioeasy Diagonica

Ltda, MG, Brasil) e o hematócrito foi determinado pelo método microhematócrito por 15 min a 10.000 rpm (ou 8944 × g), utilizando Microspin-Spin1000; Micros-spin (Mikro) - Laborline, Barueri, SP, Brasil]. Adicionou-se ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) ao sangue remanescente a uma razão de 10% e centrifugou-se (75 g, 5 min e 679 g, 5 min) para a coleta de plasma. A proteína plasmática foi determinada por um refratômetro comum. O colesterol e triglicérides foram medidos em um espectrofotômetro automático (Cobas-Mira Plus-Roche, Roche Diagnostic Systems, Ramsey, MN, EUA) usando kits comerciais (Synermed; Synermed-Westfield, IN, EUA). (Thermo Plate Basic - Thermo Plate Básico - Equipar, Curitiba, PR, Brasil). O analisador de termoplacas é um analisador de termopar (Thermo Plate Basic). Kits comerciais (Synermed®) foram utilizados para análise de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP). As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFMG. Após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por seção da coluna cervical por lâmina.

2.6 Análise de carotenoides totais

Os tecidos dos peixes foram macerados em etanol 96°GL e analisados em espectrofotômetro Libra S22 (Biochrom®, Cambridge, UK) no comprimento de onda de (452 nm) de absorbância e coeficiente de absorção de E 1% 1cm 2620. O cálculo foi feito pela metodologia de Rodriguez-Amaya (2001) e Rodriguez-Amaya & Kimura (2004), seguindo a equação (8), a saber:

$$[\text{mg pigmento/kg}] = \frac{\text{ABS x FD x V}}{\text{CA x [g]}}$$

Onde:

ABS = Absorbância do pigmento na solução de etanol [nm]

FD = Fator de diluição

V = Volume da solução

CA = Coeficiente de absorção E 1% 1 cm do pigmento em etanol

[g] = gramas de amostra utilizada

2.7 Análises histológicas

Após coleta de sangue e eutanásia, o fígado de quatro peixes por tratamento foi fixado em solução de Bouin por 12 hs depois transferido para etanol a 70% para posterior análise histológica e corado com hematoxilina e eosina. As lâminas foram examinadas e fotomicrografias foram realizadas com microscópio de luz para exame histopatológico. As células observadas foram classificadas de acordo com Bernet et al. (1999) em três fatores: (1) importância patológica mínima, onde o dano é reversível após o término da exposição ao agente tóxico; (2) importância patológica moderada, em que a lesão é reversível em alguns casos após o término da exposição; e (3) importância patológica grave, em que a lesão é tipicamente irreversível e leva à perda parcial ou total da função do órgão. Todas as lâminas foram avaliadas usando uma escala que varia entre: 0 = inalterado, 2 = ocorrência leve, 4 = ocorrência moderada e 6 = ocorrência grave.

2.8 Análise Estatística

Para testar a hipótese de trabalho, foi utilizada uma Análise de Variância Unifatorial (ANOVA One-Way), Modelo I e nível de significância $\alpha = 0,05$ (Zar, 2010). Quando os resultados foram significativos após a aplicação da ANOVA, procedeu-se à verificação dos pressupostos de Normalidade da Distribuição e de Homogeneidade das Variâncias, através da aplicação dos testes de Shapiro-Wilk (W) e Levene, respectivamente, sendo ambos com nível de significância $\alpha = 0,05$ (Zar, 2010). Nos casos onde os pressupostos não foram atingidos, aplicou-se a transformação dos dados através de Log (X+1), repetindo-se a ANOVA para estes dados transformados.

Para identificação das diferenças significativas entre os níveis (tratamentos) de pigmentação, foi aplicado o teste de contraste de Tukey (HSD), com nível de significância $\alpha = 0,05$ (Zar, 2010).

Nas situações onde os testes para os dados transformados rejeitaram os pressupostos da ANOVA, optou-se como solução alternativa a utilização de uma ANOVA por Postos (ANOVA by Ranks), através da aplicação do teste de Kruskal-Wallys, o qual é um teste não-paramétrico equivalente à ANOVA Unifatorial. Para as variáveis que foram analizadas quanto a correlação foi utilizado o teste R de Spearmam. (Zar, 2010). E para apresentação gráfica dos dados foi utilizada análise de regressão junto aos testes de médias.

Os testes foram realizados com o programa estatístico Infostat® versão 2017 conforme instruções do manual do software (Casanoves et al., 2012).

3 Resultados

3.1 Índices Zootécnicos

Os índices Zootécnicos não tiveram diferenças significativas ($P>0,05$) quanto aos tratamentos empregados (Tabela 1).

3.2 Análises sanguíneas

Dentre os parâmetros sanguíneos observados apenas a aspartato amino transferase demonstrou ser influenciada pelos tratamentos ($P<0,05$) sendo mais alta no tratamento com adição de 400 mg/kg de astaxantina. em relação ao controle e a adição de 25 mg/kg. As demais variáveis sanguíneas não demonstraram diferenças significativas ($P>0,05$) (Tabela 2).

3.3 Análise de carotenoides totais

A concentração de carotenoides totais no plasma sanguíneo (Figura 1) se mostrou mais elevada no tratamento com 100 mg/kg de inclusão de astaxantina em relação aos grupos controle e 25 mg/kg ($P<0,05$). Quanto a pigmentação do tegumento (Figura 2) os tratamentos com 100, 200 e 400 mg/kg de astaxantina obtiverem resultados significativamente superiores em relação ao controle ($P<0,05$), sendo o tratamento com 400 mg/kg superior também aos

tratamentos com 25 e 50 mg/kg (P<0,05). Na Figura 3 é possível observar a maior acumulação muscular de carotenoides totais no tratamento com adição de 100 mg/kg de astaxantina (P<0,05) em relação aos demais tratamentos, com exceção do tratamento 200 mg/kg, o qual apresentou resultados com similaridade entre ambos (P>0,05).

Tabela 1. Índices zootécnicos de juvenis de Pacamã *L. alexandri* alimentados por 62 dias com ração comercial contendo diversos níveis de astaxantina sintética

		Astaxantina na ração (mg/kg)						
Variáveis		**0**	**25**	**50**	**100**	**200**	**400**	Total
Peso inicial (g)	mean	19.17	18.09	16.24	17.24	16.81	17.80	17.56
	± SD	3.59	3.81	1.35	0.79	1.42	1.21	2.30
Peso final (g)	mean	36.47	36.43	32.54	34.93	32.95	37.98	35.22
	± SD	4.06	7.58	2.17	0.85	3.99	6.66	4.71
Ganho de peso (g)	mean	17.30	18.35	16.30	17.70	16.15	20.18	17.66
	± SD	2.50	3.85	1.51	1.50	2.71	6.30	3.38
Comprimento inicial (cm)	mean	11.81	11.80	11.49	11.63	11.36	11.66	11.63
	± SD	0.29	0.50	0.28	0.10	0.54	0.26	0.36
Comprimento final (cm)	mean	14.42	14.73	14.12	14.33	14.01	14.42	14.34
	± SD	0.58	0.51	0.66	0.55	0.91	0.28	0.59
Ganho de comprimento (cm)	mean	2.61	2.93	2.63	2.70	2.65	2.75	2.71
	± SD	0.45	0.33	0.44	0.58	0.84	0.07	0.46
Largura inicial (cm)	mean	1.81	1.88	1.70	1.82	1.68	1.85	1.79
	± SD	0.16	0.35	0.25	0.29	0.09	0.37	0.25
Largura final (cm)	mean	2.50	2.60	2.48	2.49	2.43	2.24	2.46
	± SD	0.18	0.26	0.13	0.09	0.09	0.12	0.18
Ganho de largura (cm)	mean	0.69	0.72	0.78	0.66	0.75	0.39	0.67
	± SD	0.30	0.13	0.20	0.35	0.13	0.43	0.28
CA-A	mean	1,63	1,51	1,57	1,57	1,66	1,38	1,55
	± SD	0,09	0,11	0,18	0,06	0,13	0,04	0,15
EA (%)	mean	61,64	66,47	59,24	63,79	60,61	72,73	64,07
	± SD	3,62	4,97	5,82	2,35	4,57	2,14	5,88

Conversão alimentar aparente EA = Efiencia alimentar. Diferentes letras na mesma linha demonstram diferença significativa pelo teste de Tukey (*P <0,05*).

Na tabela 3 podemos observar que a correlação entre os carotenoides no músculo x plasma sanguíneo (P=0,2267), do plasma sanguíneo x tegumento (P=0,0002) e de carotenoides no tegumento x músculo (P=0,0046) são baixas, tendo comportamentos distintos em cada um dos sítios de acumulação conforme o nível de suplementação do pigmento da dieta.

A retenção muscular de carotenoides (Fig. 4) demonstrou sofrer uma queda gradual na percentagem de aproveitamento do carotenoide adicionado ao alimento a medida em que se aumenta o nível de inclusão (P<0,05). O tratamento com inclusão de 100 mg/kg de astaxantina

foi o que obteve a menor desproporção entre os carotenoides acumulados no tegumento e no músculo (Figura 5) em relação ao controle a ao tratamento de 400 mg/kg o qual obteve a maior desproporção em relação a todos os grupos com adição de pigmento (P<0,05). Neste caso e no grupo controle havendo maior acúmulo de carotenoides na pele que no músculo em comparação aos demais.

Tabela 2. Parâmetro sanguíneos de juvenis de Pacamã *L. alexandri* alimentados por 62 dias com ração comercial contendo diversos níveis de astaxantina sintética

		Astaxantina adicionada a ração (mg/kg)						
Variables		**0**	**25**	**50**	**100**	**200**	**400**	Total
Alanina Aminostransferase	mean	2.15	2.33	2.65	2.64	3.83	2.08	2.61
	± SD	0.26	0.98	0.48	0.75	1.52	0.88	1.00
Aspartato aminitransferase	mean	68.23^{b}	76.16^{b}	59.38^{ab}	46.53^{ab}	55.46^{ab}	27.23^{a}	55.50
	± SD	17.47	11.31	30.51	12.29	7.51	15.92	22.27
Glicose	mean	54.81	45.77	40.03	36.93	34.18	46.44	43.03
	± SD	20.90	16.95	10.59	11.06	10.00	22.24	15.87
Fosfatase alcalina	mean	8.44	6.52	9.73	5.72	8.59	8.20	7.86
	± SD	2.39	3.57	2.57	1.03	2.86	2.12	2.64
Colesterol	mean	72.75	67.76	73.53	70.72	80.54	83.54	74.80
	± SD	7.99	14.25	11.58	11.68	6.97	13.93	11.55
Trigliceridios	mean	245.51	243.35	230.15	203.45	261.67	263.75	241.32
	± SD	14.72	50.38	51.24	24.28	37.18	45.56	40.79
Proteína plasmática total	mean	2.12	2.15	2.14	2.20	2.32	2.44	2.23
	± SD	0.13	0.33	0.26	0.19	0.03	0.45	0.26
Hemoglobina	mean	6.21	6.12	6.94	5.99	6.31	5.74	6.22
	± SD	0.52	0.27	0.74	0.61	0.55	0.19	0.59
Hematocrito	mean	22.81	22.44	19.38	22.06	20.75	22.06	21.58
	± SD	1.96	2.18	2.95	1.77	0.54	0.83	2.06

Diferentes letras na mesma linha demonstram diferença significativa pelo teste de Tukey (*P <0,05*).

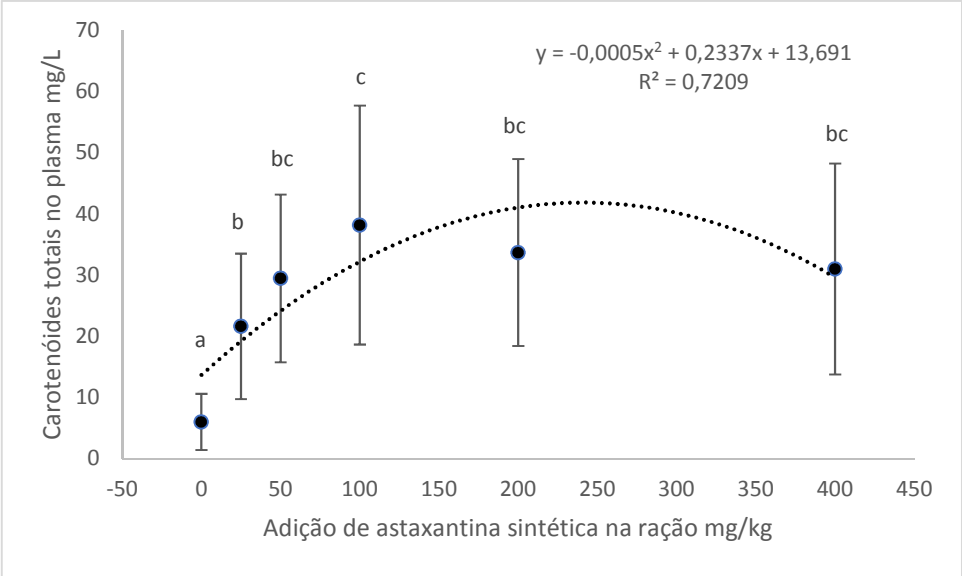


Figura 1. Carotenóides totais no plasma sanguíneo de *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética. Diferentes letras acima dos dados demonstram diferença significativa (P<0,05) pelo teste não paramétrico de Kruskal – Wallis.

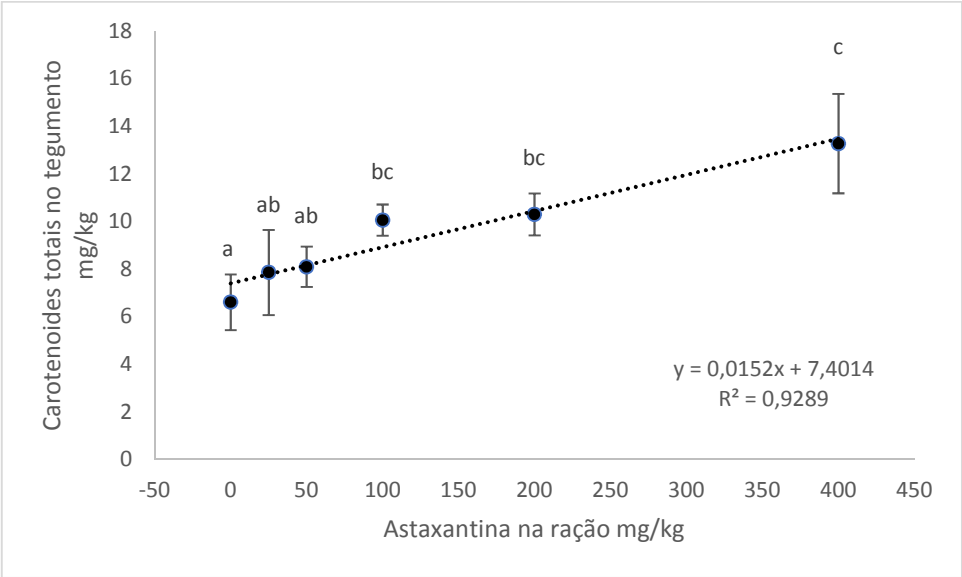


Figura 2. Carotenoides totais no tegumento de *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética. Diferentes letras acima dos dados demonstram diferença significativa (P<0,05) pelo teste não paramétrico de Kruskal – Wallis.

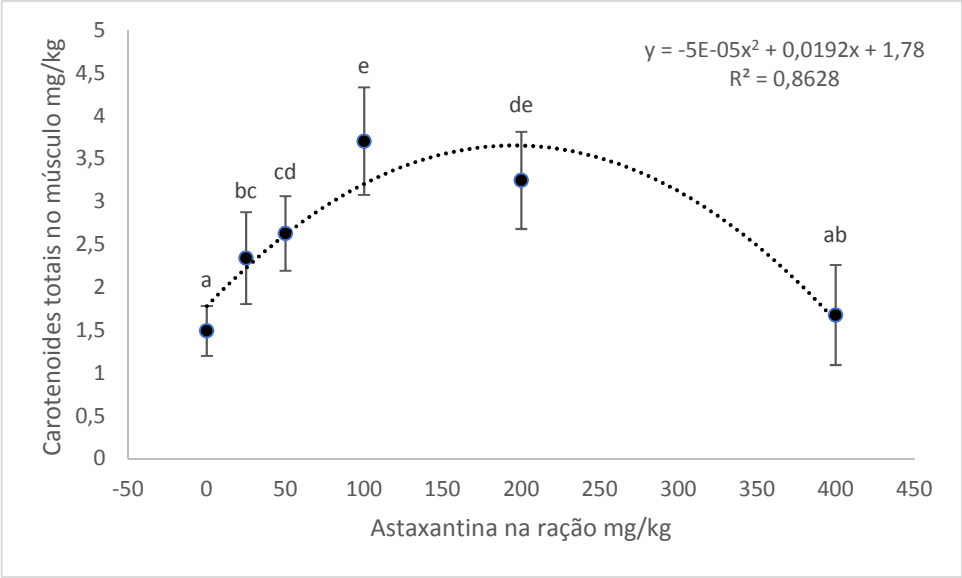


Figura 3. Carotenoides totais no músculo de *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética. Diferentes letras acima dos dados demonstram diferença significativa (P<0,05) pelo teste não paramétrico de Kruskal – Wallis.

Tabela 3. Correlação entre os níveis teciduais e plasmáticos da carotenoides totais analisados pelo teste R de Speraman.

Material	R^2	*P*
Musculo x plasma	0,25	0,2267
Plasma x tegumento	0,70	0,0002
Tegumento x musculo	0,56	0,0046

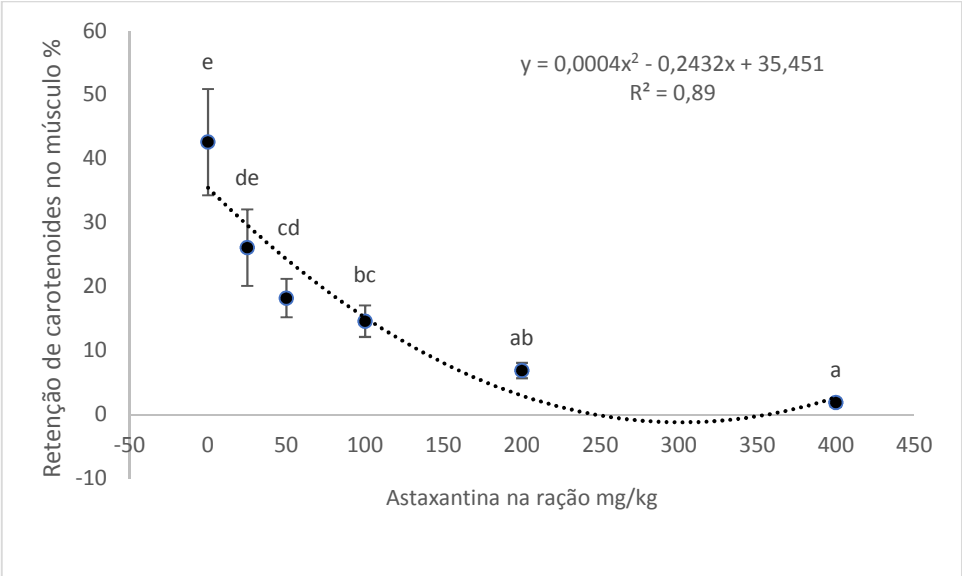


Figura 4. Retenção de carotenoides totais (%) no músculo de *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética. Diferentes letras acima dos dados demonstram diferença significativa (P<0,05) pelo teste não paramétrico de Kruskal – Wallis.

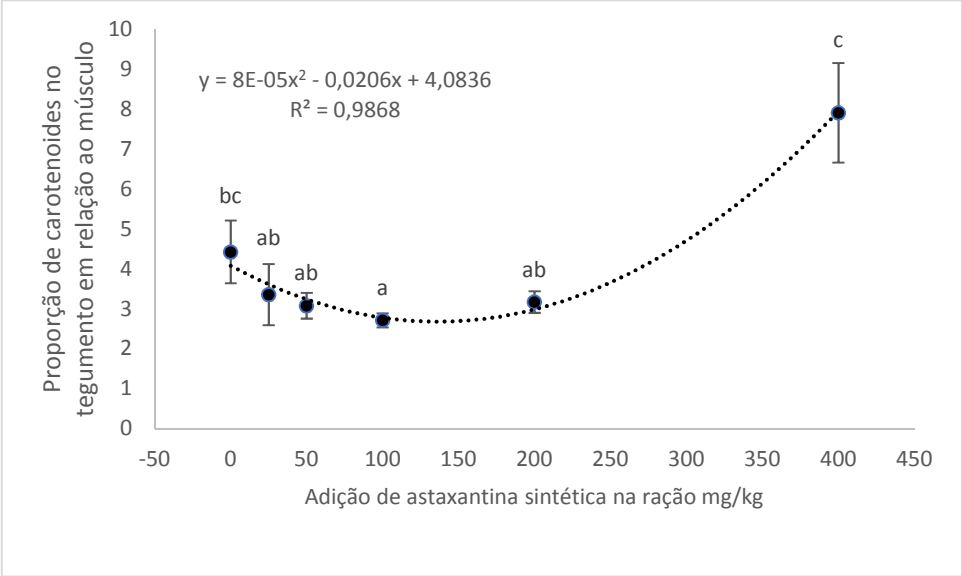


Figura 5. Proporção de carotenoides totais do tegumento em relação ao músculo (x:y) em *L. alexandri* alimentado com ração contendo diversos níveis de inclusão de astaxantina sintética. Diferentes letras acima dos dados demonstram diferença significativa (P<0,05) pelo teste não paramétrico de Kruskal – Wallis.

3.4 Análises histológicas

As imagens do tecido hepático, tecido venoso hepático e dos ductos hepáticos não demonstraram diferenças morfológicas ou histopatológicas entre os tratamentos, estando todas num mesmo gradiente onde não se puderam fazer atribuição de score dispensando a análise estatística dos dados (Figura 6).

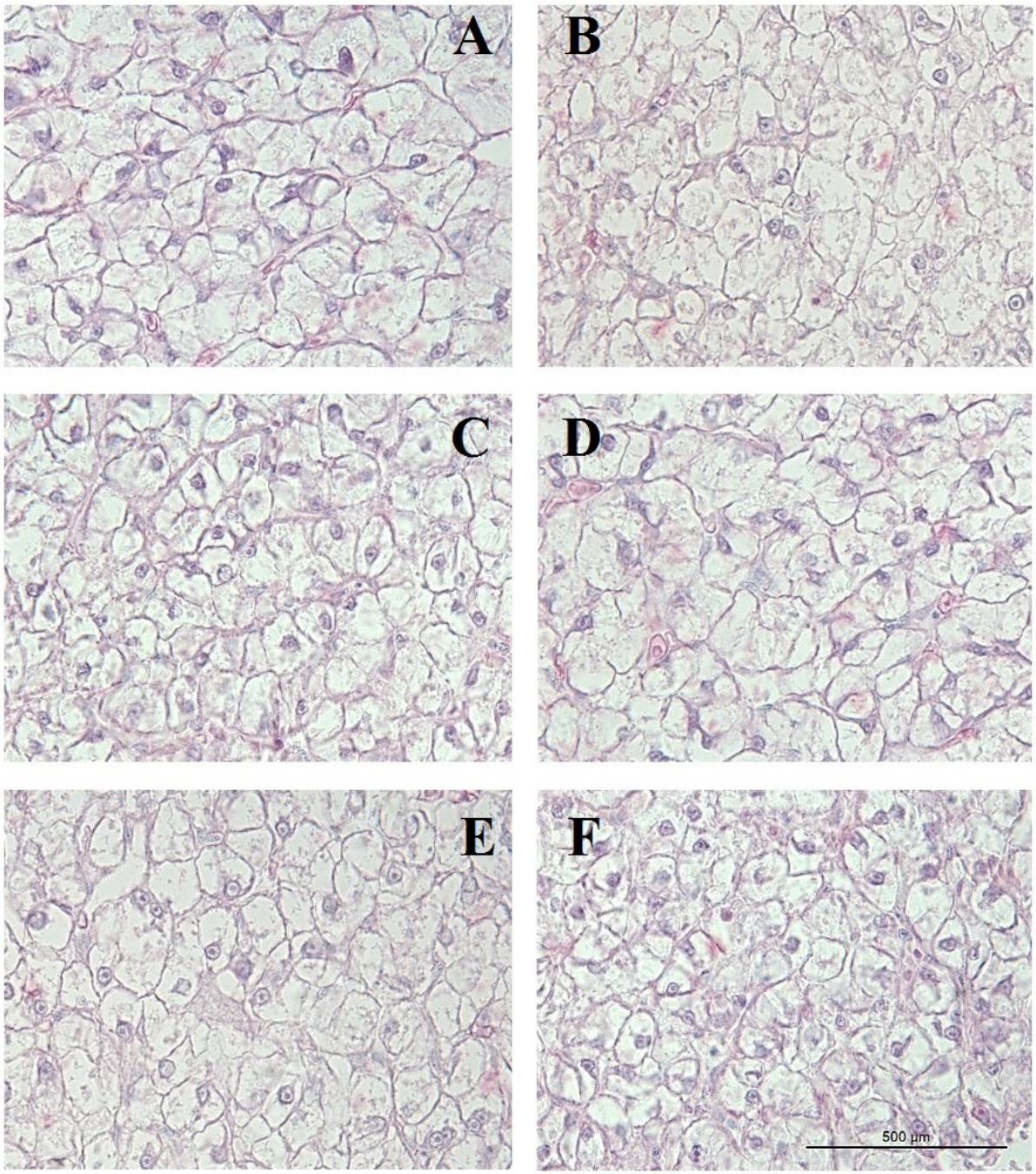


Figura 6. Fotomicrografia de fígado de juvenis de pacamã *L. alexandri* submetido a dietas com diferentes níveis astaxantina. Sendo 0 (A), 25 (B), 50 (C), 100 (D), 200 (E) e 400 mg/kg (F) de pigmento. Aumento de 400X e escala 500 µm em todas as imagens. Os hepatócitos se encontram regulares e não foram detectadas diferenças morfológicas entre os tratamentos.

4. Discussão

A astaxantina na dieta promove diversos benefícios para os peixes como: o aumento na resitência ao estresse e aumento da imunidade em peixe-gato-amarelo *Pelteobagrus fulvidraco*

(Liu et al., 2016); aumento no crescimento, ganho de peso e coloração em siluro *Silurus glanis* (Zaťková et al., 2011); aumento na fertilidade dos ovos e na sobrevivência das larvas do bacalhau *Gadus morhua* (Hansen et al., 2016); aumento no tamanho dos juvenis de cavalo marinho *Hippocampus guttulatus* (Palma et al., 2017).

No presente estudo, os índices zootécnicos não foram alterados pela inclusão de astaxantina na dieta como observado em juvenis de outras espécies de peixes como bagre-de-canal, *Ictalurus punctatus* (Li et al., 2007), corvina marela *Larimichthys croceus* (Yi et al., 2014), acará disco *Symphysodon* spp. (Song et al., 2016) tetra-sangue, *Hyphessobrycon callistus* (Wang et al., 2006) e pargo australiano *Pagrus auratus* (Doolan et al., 2009) onde também não houveram desafios ou fatores de extresse no estudo.

A adição da astaxantina natural ou sintética promovem a integridade do fígado em peixes e isso pode ser avaliado através da concentração de enzimas hepáticas no sangue (Nakano et al., 1995). Page et al. (2005) não encontraram diferenças significativas entre os níveis de AST no plasma sanguíneo de Truta Arco-Iris *Oncorhynchus mykiss* alimentados com 100mg/kg de astaxantina. Já Sheikhzadeh et al. (2011) trabalharam com a mesma espécie e tiveram o mesmo resultado até 3g/kg de adição de alga verde *Haematococcus pluvialis* inclusa na ração como fonte de astaxantina. Contudo elevando-se a quantidade para 10g/kg conseguiram índices inferiores dessa enzima no sangue desse peixe. O que sugere uma melhora na condição hepática pelo uso desse suplemento alimentar. O mesmo aconteceu no presente trabalho em relação ao controle e 25mg/kg quando se utilizou a maior concentração do pigmento (400 mg/kg).

A enzima ALT apesar de não diferir no nosso trabalho também pode indicar a condição hepática do peixe, sendo influenciada em alguns casos pelas concentrações de pigmentos da dieta dos peixes submetidos ao estresse por alta temperatura como registrado em baiacu *Takifugu obscurus* (Cheng et al., 2017) ou em alta concentração de amônia em Mato-Grosso

Hyphessobrycon eques (Pan et al., 2010). No caso da disponibilidade de oxigênio na água, tanto em normoxia quanto em hipóxia, a ALT se apresenta mais baixa com a suplementação de astaxantina na dieta de tetra-sangue *H. callistus* (Pan et al., 2009).

No caso da ALP, em alguns casos sua concentração pode aumentar em função da quantidade de astaxantina na dieta (Řehulka, 2000), sugerindo que a astaxantina poderia aumentar os níveis séricos de ALP, e neutralizar o impacto dos estressores ambientais (Cheng et al., 2017). Mas isto não foi observado no presente estudo. O aumento dos níveis de astaxantina não influenciaram os níveis de triglicerídeos e colesterol no sangue de baiacu (Cheng et al., 2017) e de colesterol no salmão do atlântico *O. mykiss* (Chinsung et al., 2013), semelhante aos resultados obtidos com *L. alexandri*.

Os valores de hemoglobina, hematócrito e proteína plasmática não se alteraram no sangue de carpa comum *Cyprinus carpio* (Jagruthi et al., 2014). No estudo de Li et al. (2014), com *L. crocea*, o índice de glicose no sangue reduziu conforme o aumento de astaxantina, e os dados de colesterol e triglicerídeos tiveram resposta significativamente proporcional ao nível de glicose nos tratamentos. Contudo, no presente trabalho apesar das médias demonstrarem a mesma tendência até a adição de 200mg/kg, não foi possível observar essa diferença devido à heterogeneidade dos dados com alto desvio padrão ($P>0,05$). Mas, conforme o caso anterior, a resposta foi semelhante nos três indicadores não se alterando significativamente em nenhum deles no caso atual.

A quantidade de carotenoide no sangue pode ser influenciada pela sua concentração na dieta, como observado com truta arco-íris alimentada com diversos níveis de cianobactéria *Spirulina* como fonte de pigmentos (Teimouri & Amirkolaie, 2013). A presença de astaxantina ou betacaroteno na dieta também aumentou significativamente a presença de pigmento no sangue de tetra-serpae (Pan et al., 2010). No caso do pacamã observou-se um aumento na taxa de carotenoides no sangue até a inclusão de 100 mg/kg, a partir desta concentração, os níveis

foram menores, provavelmente pela limitação fisiológica do animal de assimilar / transportar esse pimento no sangue quando em grandes quantidades no alimento pela própria ação de inibidores enzimáticos do peixe como sugerido por Tyssandier et al. (2002). Ou pela quantidade dietética fornecida de transportadores de carotenoides no sangue como triglicerideos, colesterol, éster do colisteril e fosfolipídeos associados a lipoproteínas, os quais podem limitar a quantidade de carotenoide circulante no plasma (Chimsung et al., 2013).

Song et al. (2016) observaram que acará-disco *Symphysodon* spp. aumentaram a pigmentação da pele com a inclusão de astaxantina na dieta até 200 mg/kg de ração. Contudo, com valores superiores (300 e 400 mg/kg), os autores observaram os mesmos valores de acumulação que no tratamento de 200 mg/kg. No presente trabalho, a concentração de pigmentos carotenoides no tegumento aumentou segundo a proporção de astaxantina suplementada na dieta até a maior concentração (400 mg/kg).

A maior concentração de carotenoides no músculo de Pacamã ficou entre os tratamentos com 100 e 200 mg/kg de astaxantina. Contudo, a taxa de retenção de carotenoides no músculo foi inversamente proporcional a proporção de inclusão da astaxantina na dieta como observado por Song et al. (2016). Para Choubert et al. (1995), a utilização de quantidades diferentes de carotenoides nem sempre resulta em melhores resultados de retenção de carotenoides no músculo, pois essa depende da fisiologia digestiva / acumulativa do peixe, fato também observado por Safari & Atashi (2015).

Novamente no tratamento com adição de 100 mg/kg de astaxantina houve o mais baixo índice de concentração de carotenoides no tegumento em relação ao músculo que nos tratamentos de menor e maior suplementação. De certa maneira, esse resultado é interessante do ponto de vista que, no caso do pacamã, preconizamos comercialmente a coloração do filé e a coloração da pele é de importância secundária. As diferenças de concentração de carotenoides na pele e no músculo ocorrem e se diferenciam na medida em que se muda a quantidade

suplementada de carotenoides na dieta dos peixes (Teimouri e Amirkolaie, 2013), sendo necessário estabelecer a prioridade (pele ou músculo) segundo a especificidade do uso de peixe (ornamental ou corte). Aparentemente a maior acumulação de carotenoides no tegumento em relação ao músculo é resultado da maior concentração de lipídios, colesterol e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) neste tecido, como observado por Merdzhanova et al. (2018) em estudo com bagre africano *C. gariepinus*.

Apesar da astaxantina ser amplamente difundida como o carotenoide padrão para pigmentação do músculo de organismos aquáticos, algumas espécies podem ter maior capacidade de assimilação e acúmulo de outros pigmentos, já que a capacidade de utilização de um dado carotenoide para pigmentação varia segundo a espécie do peixe (Matsuno et al., 1980; Metusalach & Shahidi, 1997; Olsen & Baker, 2006; Choubert, 2010). É possível que estudos futuros revelem que o pacamã possui melhores taxas de retenção muscular de outras xantofilas a exemplo de outro siluriforme o bagre-de-canal *I. punctatus* que acumula mais carotenoides quando sua dieta é suplementada com luteína ou cantaxantina do que com astaxantina, betacaroteno e zeaxantina (Li et al., 2007). A astaxantina foi detectada de forma minoritária ou estava ausante no perfil pigmentário de 12 espécies de siluriformes de 8 famílias diferentes por Tsushima et al. (2002), onde os carotenoides predominantes foram a zeaxantina e a luteína.

De acordo com Parolini et al. (2018), as condições fisiológicas do fígado podem ser indicativas da ação benéfica de carotenoides no organismo dos peixes. A histologia é uma das ferramentas para identificar e comparar dados sobre a condição fisiológica associada à morfologia celular do fígado dos peixes e ao uso de aditivos em suas dietas artificiais (Rodríguez-Lozano et al., 2016). Neste estudo não foi encontrada nenhuma diferença morfológica que evidencie efeito dos tratamentos na condição histológica ou condição histopatológica nos tecidos hepáticos do Pacamã.

5 Conclusão

O pacamã consegue aproveitar a astaxantina da dieta para deposição de carotenoides no músculo e tegumento, sem, contudo, influenciar no seu desenvolvimento e condição nutricional na fase de vida estudada pelo período de cultivo de dois meses. No entanto, altas doses desse pigmento parecem contribuir para a redução dos níveis da enzima hepática AST sem influenciar a condição histológica do fígado. Para o melhor aproveitamento da astaxantina sintética como pigmentante e coloração mais equilibrada entre o músculo e o tegumento recomenda-se o nível de inclusão na dieta do pacamã de 100 mg/kg desse carotenoide.

Declaração de divulgação

Nenhum potencial conflito de interesses foi relatado pelos autores.

ORCID

Daniel Pereira da Costa 0000-0002-8261-9899

Agradecimentos

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo de Daniel Pereira da Costa. A Poli-Nutri® nutrição animal pela doação da astaxantina. E a Nanoplastic® pela doação do das mídias filtrantes.

Referências

Aguirre-Hinojosa E., Piña-Valdez, P., Garza-Aguirre, M. C., Guzmán-Ramirez, L. D., Montoya-Olvera, R., Torres-Quiroga, J., & Nieves-Soto, M. (2012). Efecto de las xantofilas de la flor de cempaschúhil *Tagetes erecta L.* em la acumulación de

astaxantina y la sobrevivência de postlavas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). *Revista Mexicana de Ingenheria Química*, 11 (2), 249-257.

Baron, M., Davies, S., Alexander, D., Snellgrove, D., & Sloman, K. A. (2008). The effect of dietary pigments on the coloration and behavior of flame red dwarf gourami, *Colisa lalia*. *Animal Behaviour*, 75 (3), 1041-1051. https://doi.org/10.1016/j. anbehav.2007.08.014.

Bernet, D., Schmidt., H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), 25-34. 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.

Bicudo, A. J. A., Borghesi, R., Dairiki, J. K., Sado, R. Y., & Cyrino, J. E. P. (2002). Performance of juvenile of *Pseudoplatystoma fasciatum* fed graded levels of corn gluten meal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47 (6), 838-845. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000600015.

Breitenbach, J., Nogueira, M., Farré, G., Zhu, C., Capell, T., Christou, P., Fleck, G., Focken, U., Fraser, P. D., & Sandmann, G. (2016). Engineered maize as a source of astaxanthin: processing and application as fish feed. *Transgenic Research*, 25(6), 785-793. https://doi.org/10.1007/s11248-016-9971-3.

Casanoves, F., Balzarini M.G., Di Rienzo, J. A., Gonzalez L., Tablada M., & Robledo C. W., (2012). InfoStat. User Manual, Córdoba, Argentina.

Charo-Karisa, H., Opiyo, M., Munguti, J., Marijani, E., & Nzayisenga, L. (2013). Cost-benefit analysis and growth effects of pelleted and unpelleted on-farm feed on african catfish (*clarias gariepinus* burchell 1822) in earthen ponds. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 14 (4), 8019-8033.

Cheng, C-H., Guo, Z-X., Ye, CX., & Wang, A-L. (2017). Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish

(*Takifugu obscurus*) under high temperature stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(1), 209-218. https://doi.org/10.1007/s10695-017-0425-5.

Chimsung, N., Lall, S. P., Tantikitti, C., Verlhac-Trichet, V., & Milley, J. E. (2013). Effects of dietary cholesterol on astaxanthin transport in plasma of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 165 (1)*, 73-81. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.007

Choubert, G. (2010). Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to varying dietary astaxanthin/canthaxanthin ratio: Colour and carotenoid retention of the muscle. *Aquaculture Nutrition*, 16 (5), 528-535. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00692.x.

Choubert, G., Milicua, J. G., Gomez, R., Sancé, S., Petit, H., Nègre-Sadargues, G., Castillo, R., & Trilles, J-P. (1995). Utilization of carotenoids from various sources by rainbow trout: muscle color, carotenoid digestibility and retention. *Aquaculture International*, 3(3), 205-216. https://doi.org/10.1007/BF00118102.

Costa, D. P., Leme, F. O. P., Takata, R., Costa, D.C., Silva, W. S., Melillo-Filho, R., Miccoli, G. A., & Luz, R. K. (2014). Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. *Aquaculture Research*, 47 (6), 1706-1715. https://doi.org/10.1111/are.12594.

Dananjaya, S. H. S., Munasinghe, D. M., Ariyaratne, H. B. S., Lee, J., & De Zoysa, M. (2017). Natural bixin as a potential carotenóid for enhancing pigmentation and colour in goldfish (*Carassius auratus*), *Aquaculture Nutrition*, 23 (2), 255-263. https://doi.org/10.1111/anu.12387.

Doolan, B. J., Booth, M., Geoff, L. A., & Paul, L. J. (2008). Changes in skin colour and cortisol response of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801) to different

background colours. *Aquaculture Research*, 40 (5), 542-550. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02126.x.

Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E., & Streiff, K. (1984). Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*, 41 (3), 213-226. https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90284-9.

Göcer, M., Yanar, M., Kumulu, M., & Yanar, Y. (2006). The effects of red pepper, marigold flower and syntetic astaxanthin on pigmentation, growth and proximate composition of *Penaeus semisulcatus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30 (4), 359-365.

Hansen, Ø., Puvanendran, V., & Bangera, R. (2014). Broodstock diet with water and astaxanthin improve condition and egg output of brood fish and larval survival in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Research*, 47 (3), 819-829. https://doi.org/10.1111/are.12540

Hu, B., Roy, L., & Davis, D. (2013). Correlations of xanthophylls in catfish fillets, plankton, shad and snails in catfish production ponds in west Alabama. *Aquaculture*. 402-403, 46-49. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.022

Ingle de la Mora, G., Arredondo-Figueroa, J. L., Ponce-Palafox, J. T., Barriga-Soca, I. A., & Vernon-Carter, J. E. (2006). Comparison of red chilli (*Capsicum annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation. *Aquaculture*, 258 (1-4), 487-495. https://doi.org/10.1016/j.aquac ulture.2006.04.005.

Jagruthi, C., Yogeshwari, G., Anbazahan, S. M., Mari, L. S. S., Arockiaraj, J., Mariappan, P., Sudhakar, G. R. L., Balasundaram, C., & Harikrishnan, R. (2014). Effect of dietary astaxanthin against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunology* 41 (2), 674-680. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.010.

Li, M., Wu, W., Zhou, P., Xie, F., Zhou, Q-C., & Mai, K. (2014). Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 434, 227=232. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture .2014.08.022.

Li, M. H., Robinson, E.H., Oberle, D. F., & Zimba, P. V. (2007). Effects of various dietary carotenoid pigments on fillet appearance and pigment absorption in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of World Aquaculture Society*, 38 (4), 557-563. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00130.x.

Liranço, A. D. S., Romagosa, E., & Scorvo-Filho, J. D. (2011). Desempenho produtivo de *Pseudoplatystoma corruscans* estocados em sistemas de criação: semi-intensivo (viveiro escavado) e intensivo (tanque-rede). *Ciência Rural*, 41 (3), 524-530. https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000300027.

Liu, F., Shi, H., Guo, Q., Yu, Y., Wang, A., Lv, F., & Shen, W. (2016). Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish & Shellfish Immunology, 51*, 125-135.

Liu, S., Li, Y., Wu, Y., Bell, L., Davis, D., & Wang, Y. (2012). Extraction, identification and quantitation of carotenoids in discolored channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26 (1-2), 154-159. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.01.006.

Maoka, T., & Akimoto, N. (2011). Structures of minor carotenoids from the Japanese common catfish, *Silurus asotus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 59 (1)*, 140-145.

Martinelli, S. G., Radünz Neto, J., Silva, L. P., Bergamin, G. T., Maschio, D., Flora, M. A. L. D., Nunes, Mesquita da Costa, L. M., & Possani, G. (2013). Densidade de estocagem e frequência alimentar no cultivo de jundiá em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *48* (8), 871-877. https://doi.org/10. 1590/S0100-204X2013000800009

Matsuno, T., Nagata, S., Katsuyama, M., Matsutaka, H., Maoka, T., & Akita, T. (1980). Comparative Biochemical Studies of Carotenoids in Fishes—XVIII: Carotenoids of Cultured Fishes, Japanese Char, Brook Trout, Lake Trout, Masu Trout, Red-Spotted Masu Trout, Rainbow Trout and Brown Trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 46, 473-478. https://doi.org/10.2331/suisan.46.473.

Merdzhanova, A., Dobreva, D., & Panayotova, V. (2018). Comparison of fatty acids, cholesterol, fat soluble vitamins and carotenoids content of skin and edible tissue of farmed African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). *Ovidius University Annals of Chemistry*, 29(1), 41-47. https://doi.org/10.2478/auoc-2018-0006.

Metusalach, J. A., Brown, J., & Shahidi, F. (1997). Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Food Chemistry*, 59(1), 107-114. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00205-1.

Nakano, T., Tosa, M., & Takeuchi, M. (1995). Improvement of Biochemical Features in Fish Health by Red Yeast and Synthetic Astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1570-1573. https://doi.org/10.1021/jf00054a029.

Olsen, R., & Baker, R. T. M. (2006). Lutein does not influence flesh astaxanthin pigmentation in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 258 (1-4), 558-564. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.031.

Page, G.I., Russell, P.M., & Davies, S.J. (2005). Dietary carotenoid pigment supplementation influences hepatic lipid and mucopolysaccharide levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 142 (4)*, 398-402. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.09.001.

Palma, J., Andrade, J. P., & Bureau, D. (2016). The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality and growth of long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 23 (2), 304-302. https://doi.org/10.1111/anu.12394.

Pan, C-H., Chien, Y-H., & Wang, Y-J. (2009). The antioxidant capacity response to hypoxia stress during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus* Boulenger) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Research*, 41(7), 973-981. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02380.x.

Pan, C-H., Chien Y-H., & Wang, Y-J. (2010). Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Nutrition*, 17(3), 258-266. https://doi.org/10.1111/j. 1365-2095.2009.00747.x.

Parolini, M., Iacobuzio, R., Possenti, C., Bassano, B., Pennati, R., & Saino, N. (2018). Carotenoid-based skin coloration signals antioxidant defenses in the brown trout (*Salmo trutta*). *Hydrobiology*, 815(1), 267-280. https://doi.org/10.1007/s10750-018-3571-6.

Řehulka, J. (2000). Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 190(1-2), 27-47. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00383-5.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, EUA: Internacional Life Sciences Institute Press, 64 p.

Rodriguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). Handbook for carotenoid analysis. Washington, EUA: HarvestPlus. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2).

Rodrigez Lozano, A., Borges, P., Robaina, L., Betancor, M., Hernandez-Cruz, M., Romero García, J., Caballero, M. J., Vergara, J. M., & Izquierdo, M. (2016). Effect of different dietary vitamin E levels on growth, fish composition, fillet quality and liver histology

of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 468(1), 475-138. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.006.

Safari, O., & Atashi, M. M. S. (2015). The effects of dietary supplement of annatto (*Bixa orellana*) seed meal on blood carotenoid content and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)*. *Aquaculture*, 473(1), 275-281. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.012

Sheikhzadeh, N., Tayefi-Nasrabadi, H., Khani, A. O., & Najafi, H. (2011). Effects of *Haematococcus pluvialis* Supplementation on Antioxidant System and Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 38(2), 413-419. https://doi.org/10.1007/s10695-011-9519-7.

Silva, M. J. S., Costa, F. F. B., Leme, F. P., Takata, R., Costa, D. C., Mattioli, C. C., Luz, R. K., & Miranda Filho, K. C. (2017). Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. *The Science of the Total Environment*, 616-617, 1566-1575. https://doi.org/10. 1016/j.scitotenv.2017.10.157.

Song, X., Wang, L., Li, X., Chen, Z-Z., Liang, G., & Leng, X. (2016). Dietary astaxanthin improved the body pigmentation and antioxidant function, but not the growth of discus fish (*Symphysodon* spp.). *Aquaculture Research*, 48(4), 1359-1367. https://doi.org/10.1111/are.13200.

Teimouri M, & Amirkolaie, A. K. (2013). The effects of synthetic pigments on pigmentation of *Pethia conchonius* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Research*, 46(5), 1156-1161. https://doi.org/10.1111/are.12271.

Tsushima, M., Ikuno, Y., Nagata, S., Kodama, K., & Matsuno, T. (2002). Comparative biochemical studies of carotenoids in catfishes. Comparative Biochemistry and Physiology, 133(3), 131-136.

Tyssandier, V., Choubert, G., Grolier, P., & Borel, P. (2002). Carotenoids, mostly the xanthophylls, exchange between plasma lipoproteins. *International Journal of Vitamins and Nutrition Research*, 72 (5), 300-308. https://doi.org/10.1024/0300-9831.72.5.300.

Wang, Y-J., Chien, Y-H., & Pan, C-H. (2006). Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of Characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture*, 261(2), 641-648. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.040.

Yi, X., Xu, W., Zhou, H., Zhang, Y., Luo, Y., Zhang, W., & Mai, K. (2014). Effects of dietary xanthophylls/astaxanthin ratios on the growth and skin pigmentation of large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846). *Aquaculture*, 433(4), 377-383. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.038.

Zar, J.H. (2010). Biostatistical Analysis, 5th Edition. Northern Illinois University. 960p.

Zaťková, I., Sergejevová, M., Urban, J., Vachta, R., Stys, D., & Masojídek, J. (2010). Carotenoid-enriched microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: Albinic form of wels catfish (*Silurus glanis*). *Aquaculture Nutrition*. 17(3), 278 - 286. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00751.x.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Investigações realizadas com os pigmentos carotenoides são essenciais para buscarmos uma melhoria na qualidade do pescado proveniente da aquicultura, pois podem auxiliar a obtenção de produtos com características de cor próximas as dos animais provenientes de ambiente natural, proporcionando maior qualidade fisiológica de dietas e aumentando a performance reprodutiva.

A astaxantina sintética apesar de ser o carotenoide mais utilizado para esse fim, pode não ser a principal substância acumulada em algumas espécies. Também pode ser substituída

por outras substâncias naturais com o urucum que tem significativo potencial pigmentário e estabilidade na ração.

A grande biodiversidade de espécies aquícolas e de possíveis alimentos ricos em pigmentos para sua dieta abre uma linha de pesquisa ampla e diversa a qual pode ser estudada e explorada. Levando dos usos tradicionais ancestrais por populações locais a uma possibilidade de ampliação para atender a demanda de alimentos de qualidade e funcionalidade reconhecidos com valor agregado para atender ao público de grandes centros e para exportação.