



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM ASTAXANTINA DE
***Haematococcus pluvialis* NA COLORAÇÃO E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DO**
PEIXE ORNAMENTAL *Cryptocentrus cinctus*

Géssica Cavalcanti Pereira Mota

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Orientador

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez
Coorientador

Recife,
Fevereiro/2023

Espaço reservado para a ficha catalográfica

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM ASTAXANTINA DE
***Haematococcus pluvialis* NA COLORAÇÃO E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DO**
PEIXE ORNAMENTAL *Cryptocentrus cinctus*

Géssica Cavalcanti Pereira Mota

Dissertação julgada adequada para obtenção
do título de mestre em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
28/02/2023 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Orientador

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Roberto C. de Oliveira Filho

Membro Titular Interno

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Gelcirene de Albuquerque Costa

Membro Titular Externo

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico esta dissertação a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada.

Agradecimentos

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, enriquecendo o meu processo.

Resumo

A piscicultura ornamental é uma atividade caracterizada pelo rápido retorno econômico, com alto valor agregado no mercado e em grande ascensão. Nos peixes ornamentais, a coloração é um dos critérios mais importantes, além da saúde e aspectos produtivos. O presente estudo tem como objetivo produzir dieta inerte suplementada com biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis*, rica em astaxantina, para aumentar a pigmentação, atividade antioxidante e desempenho zootécnico do *Cryptocentrus cinctus*. As dietas foram formuladas com diferentes concentrações de astaxantina presente na biomassa de *H. pluvialis*: A0 (0% - controle), A10 (0,01%) e A15 (0,015%). Doze peixes, quatro para cada tratamento, foram alimentados durante 60 dias, sendo avaliadas as variáveis de qualidade de água, crescimento, coloração do tegumento e atividade de catalase nos animais. A astaxantina presente na dieta influenciou a pigmentação dos peixes, sendo observado ao fim do período experimental mudança na coloração dos tratamentos A10 e A15. A aquisição de um tom mais amarelo ($R = 144,75 \pm 12,7$; $G = 122,9 \pm 12,7$; $B = 48,5 \pm 17,6$) foi conferida no tratamento com maior inserção de astaxantina, indicando a influência desse carotenoide na pigmentação dos peixes. Além disso, a suplementação dietética com astaxantina de *H. pluvialis* a 0,015% (A15) aumentou a atividade de catalase, com valor médio de 25 U CAT mg^{-1} , e o desempenho zootécnico do *C. cinctus*, com maior ganho de peso (0,44 g) e comprimento (7,93 mm) e menor fator de conversão alimentar (1,10). Portanto, a dieta inerte suplementada com 0,015% de astaxantina resultou em maior pigmentação, com aquisição de cor em tons amarelados, maiores atividade antioxidante e crescimento de *C. cinctus*, bem como, melhor aproveitamento da ração.

Palavras-chave: Aquicultura. Aquafeed. Gobies. Microalga. Carotenoide. Antioxidante.

Abstract

Ornamental fish farming is a highly profitable activity that is gaining momentum due to its rapid economic returns and high added value in the market. Coloration is one of the most important criteria in ornamental fish, along with health and productivity aspects. This study aimed to produce an inert diet supplemented with biomass of the microalgae *Haematococcus pluvialis*, which is rich in astaxanthin, to enhance pigmentation, antioxidant activity, and zootechnical performance of *Cryptocentrus cinctus*. The aquafeeds were formulated with different concentrations of astaxanthin from *H. pluvialis* biomass: A0 (0% - control), A10 (0.01%), and A15 (0.015%), with four replicates each. Twelve fish, four for each treatment, were fed for 60 days, and the variables of water quality, growth, tegument color, and catalase activity in the animals were evaluated. The presence of astaxanthin in the diet influenced the pigmentation of the fish, with changes in color observed in treatments A10 and A15 at the end of the experimental period. The treatment with a higher concentration of astaxanthin showed an acquisition of yellow tone ($R = 144.75 \pm 12.7$; $G = 122.9 \pm 12.7$; $B = 48.5 \pm 17.6$), indicating the influence of this carotenoid on the pigmentation of the fish. In addition, dietary supplementation with astaxanthin from *H. pluvialis* at 0.015% (A15) influenced the catalase activity, with a mean value of 25 U CAT mg^{-1} , and the zootechnical performance of *C. cinctus*. The fish in this treatment had greater weight gain (0.44 g) and length (7.93 mm) and a lower feed conversion factor (1.10). Therefore, the inert diet supplemented with 0.015% astaxanthin resulted in enhanced pigmentation with the acquisition of yellowish color, greater antioxidant activity, and improved growth and feed utilization in *C. cinctus*.

Keywords: Aquaculture. Aquafeed. Gobies. Microalgae. Carotenoid. Antioxidant.

Lista de figuras

- Figura 1 - Coloração média (R*G*B) de peixes *C. cinctus* alimentados com dietas inertes elaboradas com diferentes concentrações de astaxantina de *H. pluvialis* (A0-0%, A10-0,01%, A15-0,015%) ao início (A) e final do período experimental (B).....25
- Figura 2 - Efeitos da concentração dietética de *H. pluvialis* rica em astaxantina (A0-0%, A10-0,01%, A15-0,015%) e tempo de suplementação (0 e 60 dias) na coloração do tegumento de *C. cinctus*.....26
- Figura 3 - Atividade de catalase em peixes *Cryptocentrus cinctus* alimentados com dieta inerte suplementada com astaxantina de *Haematococcus pluvialis*.....27
- Figura 4 - Correlação encontrada entre os padrões de cores RGB (R, G, B), fator de conversão alimentar (FCA), ganho de comprimento (GL), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico e atividade da enzima catalase (U CAT mg⁻¹). Valores de r após teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). Correlações diretas em escala de verde, correlações inversas em escala de rosa..... 29

Lista de tabelas

Tabela 1 - Meio de cultura BBM modificado utilizado no cultivo de <i>Haematococcus pluvialis</i>	18
Tabela 2 - Formulação da dieta controle para alimentação dos peixes.....	20
Tabela 3 - Composição centesimal das dietas inertes formuladas com diferentes concentrações de astaxantina de <i>H. pluvialis</i>	24
Tabela 4 - Desempenho zootécnico dos peixes <i>C. cinctus</i> alimentados com dietas inertes com diferentes concentrações de astaxantina de <i>H. pluvialis</i>	28

Sumário

1. Contextualização da pesquisa.....	11
1.1 O mercado de peixes ornamentais.....	11
1.2 <i>Haematococcus pluvialis</i> e a produção de astaxantina	12
1.3 Biomassa de microalgas em Aquafeed.....	12
1.4 Hipótese.....	14
1.5 Objetivos	14
1.5.1 Objetivo Geral.....	14
1.5.2 Objetivos Específicos.....	14
2. Efeitos da suplementação dietética com astaxantina de <i>Haematococcus pluvialis</i> na coloração e desempenho zootécnico do peixe ornamental <i>Cryptocentrus cinctus</i>	15
2.1 Introdução.....	15
2.2 Metodologia	17
2.3 Resultados e Discussão	23
2.4. Conclusões	30
2.5. Referências	31
3. Considerações finais	35
4. Referências.....	36

1. Contextualização da pesquisa

1.1 O mercado de peixes ornamentais

O mercado de peixes ornamentais cresce a cada ano devido principalmente à demanda pelo consumidor final, movimentando cerca de 15 milhões de dólares mundialmente (GOMES *et al.*, 2021), sem contar com insumos como acessórios, equipamentos e alimentação, que são responsáveis pelo faturamento de um valor ainda mais elevado (FERREIRA *et al.*, 2020). Quando comparado à piscicultura de corte, o cultivo de peixes ornamentais é menos custoso em razão da necessidade de uma menor área de cultivo para a sua execução (ZUANON *et al.*, 2011).

Todavia, essa atividade está mais desenvolvida para criação de peixes de água doce, enquanto o mercado de peixes ornamentais marinhos baseia-se na coleta de exemplares da natureza devido, principalmente, ao conhecimento escasso sobre os ciclos de vida (CARDOSO *et al.*, 2021). Essa prática torna a comercialização desses animais insustentável, uma vez que pode causar a sobre-exploração dos estoques naturais, o que justifica a necessidade da criação em cativeiro (KODAMA *et al.*, 2011). No Brasil, a maior parte das espécies de peixes marinhos comercializados é importada ou oriunda da aquicultura nacional, sendo a maioria das espécies exóticas (CARDOSO *et al.*, 2021). Entretanto, para a aquicultura, a escolha das espécies dependerá de aspectos como demanda e valor de mercado (KODAMA *et al.*, 2011).

A família Gobiidae está entre as maiores famílias de vertebrados marinhos, encontrada principalmente, em águas tropicais e temperadas (NAM *et al.*, 2020), habitando substratos arenosos e rochosos (PATZNER *et al.*, 2011). As espécies que compõem essa família possuem ampla diversidade de padrões e grande capacidade de adaptação (NAM *et al.*, 2020), além de apresentarem relações de mutualismo com corais e outros indivíduos de vida livre, como os crustáceos (THACKER *et al.*, 2011). Os Gobies são muito comercializados no aquarismo marinho devido à variedade de coloração. As espécies mais importantes comercialmente são originárias dos oceanos Índico e Pacífico, sendo o *Elacatinus* e o *Cryptocentrus* os gêneros mais populares na aquariofilia. O gênero *Cryptocentrus* abrange os “gobies watchman”, que são espécies pequenas e possuem uma relação de simbiose com o camarão do gênero *Alpheus* no ambiente natural, o que os tornam mais atraentes comercialmente (LINDEN, *et al.*, 2020).

1.2 *Haematococcus pluvialis* e a produção de astaxantina

A microalga *Haematococcus pluvialis* é uma clorofícea de ciclo de vida complexo, composto por quatro estágios morfológicos: microzoóides, macrozoóides, palmela e aplanósporos ou hematocistos. Nos três primeiros estágios, as células se apresentam na fase vegetativa em condições ambientais favoráveis para a reprodução e possuem como principal pigmento a clorofila. No estágio de aplanósporos ou hematocistos, as células estão sob estresse, havendo a síntese de carotenoides, sendo o principal destes a astaxantina (SHAH *et al.*, 2016).

O cultivo de *H. pluvialis* comumente é realizado em duas etapas, na primeira as variáveis físico-químicas são controladas para que haja reprodução celular, até que se atinja altas densidades; logo, na segunda etapa, alguma variável é modificada para o estímulo à carotenogênese (ZHANG *et al.*, 2016). A síntese de carotenoides ocorre através de uma resposta ao estresse celular causado por fatores como: limitação de nutrientes, aumento da intensidade luminosa, inserção de carbono orgânico, variação de pH ou temperatura (MOTA *et al.*, 2022). Sob condições de estresse, as células de *H. pluvialis* intensificam a produção de espécies reativas de oxigênio, em compensação, é promovida a síntese de astaxantina a fim de eliminar espécies reativas de oxigênio e evitar estresse oxidativo (HAN *et al.*, 2020).

A astaxantina é um carotenoide de alto valor econômico utilizado nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentares por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética e imunomoduladora (DAVINELLI *et al.*, 2018). O mercado desse carotenoide ainda é dominado pela forma sintética formulada através de petroquímicos, entretanto a forma natural (oriunda da *H. pluvialis*) é a mais recomendada, por apresentar maior atividade biológica, ausência de toxicidade e por ser um recurso natural renovável (KUMAR *et al.*, 2022). Na aquicultura, a astaxantina, principalmente a sintética, é fornecida na alimentação dos peixes, objetivando melhorar coloração, crescimento, capacidade antioxidante e resposta imune (JIANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2023). No entanto, diversas pesquisas demonstram a maior eficiência da astaxantina natural na performance produtiva de organismos aquáticos cultivados (JIANG *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2023).

1.3 Biomassa de microalgas em Aquafeed

Na aquicultura, a ração representa de 30 a 70% dos custos totais e sua produção em 2018 destinada a este setor chegou a 40,1 milhões de toneladas, sendo a farinha e o óleo de peixe os principais ingredientes utilizados (DA SILVA *et al.*, 2021). Considerada a principal fonte proteica, a adição da farinha de peixe em aquafeed é capaz de aumentar a eficiência

alimentar, auxiliando na digestão e absorção de nutrientes, enquanto o óleo de peixe, principal fonte lipídica, é rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e altamente insaturados (HUFAs) (HODAR *et al.*, 2020). Entretanto, a utilização da farinha e do óleo de peixe pode ser considerada insustentável para a aquicultura, dado que estes possuem um custo elevado (WAN *et al.*, 2018) e a pesca é a principal fonte para a sua produção, podendo resultar na escassez dos recursos pesqueiros e em problemas de segurança alimentar (CHEN *et al.*, 2021).

Responsáveis pela produção primária da cadeia alimentar dos ambientes aquáticos, as microalgas podem ser consideradas uma alternativa à substituição da farinha e do óleo de peixe em aquafeed (CHAUTON *et al.*, 2015). No ambiente natural, as microalgas fazem parte da alimentação dos organismos em todas as fases de desenvolvimento, possuindo proteínas de alta qualidade, ácidos graxos poliinsaturados, como EPA e DHA (GUEDES *et al.*, 2015), vitaminas, minerais e pigmentos carotenoides, como a astaxantina (CHEN *et al.*, 2021). O aquafeed produzido com essas microalgas pode influenciar na coloração e melhorar a imunidade e o desempenho zootécnico de peixes ornamentais (GOMES *et al.*, 2021).

A astaxantina é utilizada na aquicultura como suplemento alimentar, principalmente, para intensificar a pigmentação da pele e do músculo de peixes (SCHMEISSER *et al.*, 2021). A coloração é um dos fatores que agrega maior valor comercial aos organismos ornamentais, porém estes não são capazes de sintetizar os pigmentos, devendo adquiri-los de forma exógena, através da alimentação (JIANG *et al.*, 2019). Além disso, a astaxantina é utilizada como antioxidante, combatendo a formação de radicais livres e estresse oxidativo que danificam as células de resposta imune (ZHAO *et al.*, 2023). Por isso, a inclusão desse carotenoide no aquafeed pode aumentar a resposta imune dos animais cultivados e diminuir o estresse oxidativo, influenciando a atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, peroxidase, glutathione peroxidase, entre outras (CHEN *et al.*, 2021). A catalase é uma enzima importante no sistema de defesa dos organismos pois converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, evitando os efeitos tóxicos dessa molécula nas células (SANDAMALIKA *et al.*, 2021). Neste sentido, a astaxantina pode aumentar a resistência a doenças, reduzir o estresse, melhorar a taxa de sobrevivência, incrementar o crescimento e intensificar a pigmentação dos peixes ornamentais cultivados.

1.4 Hipótese

A suplementação dietética com astaxantina da biomassa de *Haematococcus pluvialis* intensifica a coloração, atividade antioxidante e desempenho zootécnico do peixe ornamental *Cryptocentrus cinctus*.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de dietas suplementadas com diferentes concentrações de astaxantina da microalga *Haematococcus pluvialis* na coloração, atividade antioxidante e desempenho zootécnico do peixe ornamental *Cryptocentrus cinctus*.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Obter biomassa de *H. pluvialis* rica em astaxantina;
- Formular dieta inerte suplementada com astaxantina da biomassa de *H. pluvialis*;
- Analisar a composição bioquímica da dieta inerte suplementada com astaxantina de *H. pluvialis*;
- Avaliar o efeito da inclusão de diferentes concentrações de astaxantina da biomassa de *H. pluvialis* na coloração, atividade antioxidante e desempenho zootécnico do peixe ornamental *C. cinctus*.

2. Efeito da suplementação dietética com astaxantina obtida da *Haematococcus pluvialis* na coloração e desempenho zootécnico do peixe ornamental *Cryptocentrus cinctus*

2.1 Introdução

A piscicultura ornamental é uma atividade caracterizada pelo rápido retorno econômico, que utiliza pouco espaço físico e possui alto valor agregado no mercado. É notório o crescimento mundial dessa atividade, impulsionando o desenvolvimento do setor da aquicultura ornamental, do extrativismo e do comércio de animais e produtos afins (RIBEIRO; LIMA; ARAÚJO *et al.*, 2017; LADISA; BRUNI; LOVATELLI, 2017). A indústria mundial da piscicultura ornamental foi avaliada em cerca de 15 bilhões de dólares em 2017, observando-se alto crescimento em exportações entre os anos 2000 e 2011, de 181 e 372 milhões de dólares, respectivamente (LADISA *et al.*, 2017). Em paralelo, o mercado brasileiro de peixes ornamentais chegou a ser o 8º exportador do mundo, movimentando mais de 18,5 milhões de dólares no ano de 2014 (DEY, 2016). Além de apresentar crescimento na importação e no valor dos peixes importados ao longo dos anos, indicando que os produtos têm sido comercializados com preços mais altos e que o mercado brasileiro está buscando peixes de maior valor agregado (CARDOSO *et al.*, 2021).

Atualmente, várias espécies de peixes ornamentais vêm sendo produzidas comercialmente. A escolha de espécies com potencial para a aquicultura depende de uma série de fatores, dentre estes, custo de produção, tecnologia de produção disponível, demanda de mercado, valor de comercialização e aspectos zootécnicos e visuais (formas e cores). Dentre os peixes marinhos ornamentais mais produzidos incluem os gêneros *Chrysiptera*, *Dascyllus*, *Chromis*, *Amphiprion*, *Premnas* e *Cryptocentrus* (GROOVER; MATT; CASSIANO, 2020). *Cryptocentrus* spp. pertence à família Gobiidae, a família mais diversa de peixes marinhos e um dos quatro grupos de peixes mais comercializados no mundo, apresentando muitas espécies que já são cultivadas, dentre elas o *Cryptocentrus cinctus* (DIMAGGIO *et al.*, 2020).

O *C. cinctus*, conhecido como “yellow watchman”, é nativo de áreas arenosas do Pacífico Ocidental, apresentando comportamento mutualístico com camarões e tamanho médio de primeira maturação de, aproximadamente, 75 mm, se reproduzindo de forma rápida e confiável em cativeiro (GROOVER; MATT; CASSIANO, 2020). Essa espécie é uma das mais produzidas e comercialmente atrativas, entretanto, o preço de varejo é baixo em comparação a outras espécies e aos custos para produzi-la (DIMAGGIO *et al.*, 2020); logo, surge o interesse em estudos relacionados a coloração a fim de agregar valor econômico e ganhar mais espaço no mercado.

A coloração é um dos critérios mais importantes e uma demanda antiga na produção de peixes ornamentais, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias eficientes para suprir essa demanda (RIBEIRO; LIMA; FERNANDES, 2010; DAS e BISWAS, 2016). Por este motivo, o mercado de alimentos especialmente formulados para cada espécie de peixe, com o intuito de melhorar a coloração, favorecendo o bem-estar e o crescimento do animal, aumentou nos últimos anos (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2019). As rações (aquafeed) para ornamentais são compostas por diferentes ingredientes, tipos e tamanhos de grãos e perfis nutricionais (proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais), sendo a inclusão de carotenoides um fator importante na coloração dos peixes (ZUANON; SALARO; FURUYA, 2011).

Os peixes, como *C. cinctus*, utilizam carotenoides como um dos principais grupos de pigmentos naturais para coloração de pele e carne, porém não os biossintetizam, necessitando obtê-los através da dieta (DAS e BISWAS, 2016). A utilização de pigmentos, como carotenoides, afeta não somente a coloração dos animais, como também a redução do estresse e o aumento da resposta imunológica, favorecendo o bem-estar, o crescimento e a reprodução (EBENEEZAR *et al.*, 2020). Os pigmentos mais utilizados nas dietas de peixes são: luteína, β -caroteno, zeaxantina, cantaxantina e astaxantina (DAS e BISWAS, 2016).

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) possui propriedades anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética, imunomoduladora e antioxidante (DING *et al.*, 2018). Seu uso reduz a formação de radicais livres e o estresse oxidativo das células, uma vez que influencia a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase, importante no sistema imunológico dos organismos (SANDAMALIKA *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2023). Na aquicultura, esse carotenoide é utilizado tanto para pigmentação quanto para melhorar a capacidade antioxidante, a resposta imune e o desempenho zootécnico de camarões e peixes (XIE *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2023).

Na indústria de astaxantina, a forma sintética é a mais utilizada para alimentação de organismos aquáticos, contudo, possui propriedades mais atenuadas, com poder antioxidante de 20 à 50 vezes menor que a astaxantina natural, baixos níveis de absorção e efeitos adversos (CAPELLI *et al.*, 2013; EBENEEZAR *et al.*, 2020). Assim, dentro deste cenário, a busca por fontes alternativas de astaxantina natural torna-se extremamente relevante. Dentre os microrganismos capazes de produzir este carotenoide, um dos mais utilizados na indústria é a microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta), por conta do seu alto conteúdo celular, atingindo até 5% do peso seco (KIM *et al.*, 2018). A síntese de astaxantina nessa microalga está relacionada a mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas células, devido a

fatores ambientais, como alta luminosidade, presença de nutrientes e suas concentrações nos meios de cultura (CHRISTIAN, *et al.*, 2018; DORIA *et al.*, 2018).

Deste modo, este trabalho teve como objetivo produzir dietas (aquafeed) suplementadas com biomassa da microalga *H. pluvialis*, rica em astaxantina, a fim de influenciar positivamente na coloração, atividade antioxidante e desempenho zootécnico do *C. cinctus*, aumentando o valor agregado do peixe.

2.2 Metodologia

2.2.1 Delineamento experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), situado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), através de um delineamento inteiramente casualizado, testando dietas inertes suplementadas com biomassa de *Haematococcus pluvialis* rica em astaxantina. O estudo foi constituído por três tratamentos, com diferentes concentrações de astaxantina: A0 (0% - controle), A10 (0,01%) e A15 (0,015%), com quatro réplicas, totalizando 12 unidades experimentais.

Os peixes foram alimentados com as respectivas dietas, sendo avaliadas as variáveis de qualidade de água, crescimento, coloração do tegumento e atividade de catalase nos animais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Área Rural (CEUA/UFRPE), sob o número de protocolo CEUA 2044191021.

2.2.2 Obtenção dos exemplares

Os animais foram adquiridos em laboratório de produção comercial de peixes ornamentais, aclimatados e distribuídos nas unidades experimentais, onde foram mantidos em temperatura ambiente ($\sim 27^\circ\text{C}$). Antes de iniciar o experimento, todos os peixes foram alimentados com a dieta controle, duas vezes ao dia (08h e 16h), durante quatro dias. Doze peixes, com peso inicial de $1,43 \pm 0,31$ g e comprimento total de $52,8 \pm 1,07$ mm, foram distribuídos em aquários de 8L.

2.2.3 Cultivo e obtenção de biomassa de *H. pluvialis*

A microalga *H. pluvialis* foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), localizado no Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

O cultivo da microalga foi realizado em ambiente controlado, em garrafas de 5L, com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12L:12E e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}$

s⁻¹ (lâmpadas LED de 36 W), utilizando meio de cultura Bold's Basal Medium (BBM) modificado (DE MORAES *et al.*, 2023) (Tabela 1). O acúmulo de astaxantina (encistamento) foi promovido com o aumento da intensidade luminosa (100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e inserção de acetato de sódio (1,98 g L⁻¹) como fonte de carbono orgânico (DE MORAES *et al.*, 2023).

Tabela 1 - Meio de cultura BBM modificado utilizado no cultivo de *Haematococcus pluvialis*.

Composto	Concentração (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	127,3
CaCl ₂ .2H ₂ O	25,0
NaCl	25,0
KOH	31,0
EDTA Na.2H ₂ O	50,0
K ₂ HPO ₄	75,0
KH ₂ PO ₄	175,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98
MgSO ₄ .7H ₂ O	75,0
H ₃ BO ₃	11,42
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,412
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,232
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,252
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,192
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,08

Ao fim do cultivo, o volume produzido foi coletado para obtenção da biomassa seca, através de centrifugação a 3500 x *g* por 10 minutos para retirada do sobrenadante. Após este procedimento, a biomassa concentrada foi congelada por 24 horas a -80 °C (SANYO MDF U33V) e liofilizada (ALPHA 1-4 LD PLUS) por 48 horas, sendo então pesada em balança analítica (0,001 g) para quantificação (DE MORAES *et al.*, 2023).

2.2.4 Análises químicas da biomassa de *H. pluvialis*

A biomassa seca foi analisada quanto a composição de proteínas (AOAC, 2012), lipídios (BLIGH e DYER, 1959), carotenoides totais e astaxantina (CHENG *et al.*, 2016).

Para determinar o teor de proteína bruta foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC, 2012), com fator de conversão de nitrogênio ($N = 6,25$). Foram utilizados 200 mg de biomassa, adicionando-se 1 g da mistura catalisadora (95 g de K_2SO_4 + 5 g de $CuSO_4$) e 4 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). A seguir foi feita a digestão ácida em bloco digestor, a 150 °C (30 min) e a 400 °C (2h30min), após resfriamento adicionou-se 10 mL de água destilada e 25 mL da solução de NaOH (40 %), recolheu-se o destilado (50 mL) em erlenmeyer contendo 10 mL de solução indicadora (ácido bórico, vermelho de metila e verde de bromocresol), titulou-se, em seguida, com solução de HCl (0,02N). Para determinar a quantidade de proteína bruta na amostra foi utilizada a fórmula: $\%PB = V \times M \times 14 \times 100 / A \times 4,78$, onde, V é o volume de HCl (0,02N) gasto na titulação, M é a concentração molar da solução de HCl e A é a quantidade da amostra utilizada (mg).

A extração lipídica seguiu metodologia desenvolvida por Bligh e Dyer (1959), onde 0,2 g de biomassa foi homogeneizada com 15 mL de solvente clorofórmio:metanol (2:1 v/v) em vórtex por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 5mL de solução de sulfato de sódio a 1,5% e agitado por 2 minutos. Em seguida, foi submetida à filtração e separação da mistura, sendo quantificados os volumes das fases orgânicas, da qual foi subtraída e submetida à secagem em estufa 105°C e pesagem. A quantificação se deu pela correlação da porção de lipídios da fase líquida e a amostra inicial.

A análise de carotenoides foi realizada a partir de uma alíquota de 10 mL da suspensão de algas que foi centrifugada (1700 x g, 10 min) e o precipitado incubado (70 °C, 10 min) em 10 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Essa suspensão foi analisada em espectrofotômetro (480 nm) e a concentração de carotenoides totais foi calculada com a expressão: $4 \times OD_{480}$ (CHENG *et al.*, 2016). Para se obter a concentração de astaxantina foi utilizada 1 mL de suspensão algal centrifugada (1700 x g, 10 min), sendo o precipitado tratado com solução de KOH (5% (p/v)) em metanol (30% (v/v)), em seguida, incubado a 70 °C por 10 min para desnaturar a clorofila. Logo, a suspensão foi centrifugada (1700 x g, 10 min) e ao precipitado foram adicionados ácido acético glacial (100 µL) e DMSO (5 mL), sendo mantido a 70 °C por 15 min. Após centrifugação final (1700 x g, 10 min), o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro (490 nm) (CHENG *et al.*, 2016). A concentração e o teor de astaxantina foram calculados a partir das expressões $[4,5 \times OD_{490} \times (V_a/V_b)]$ e P/W , respectivamente. Onde: V_a (mL) e V_b (mL) foram o volume das amostras de DMSO e microalgas, respectivamente; P ($mg\ L^{-1}$) a concentração de astaxantina e W ($g\ L^{-1}$) a biomassa seca de células de algas por unidade de volume de meio (CHENG *et al.*, 2016).

2.2.5 Formulação da ração

A ração foi elaborada baseada na formulação experimental de Jiang *et al.* (2019) para a alimentação do peixe ornamental *Pseudochromis fridmani* (Tabela 2). A dieta sem *H. pluvialis* foi utilizada como controle, enquanto a inclusão da biomassa de *H. pluvialis* substituiu a fração equivalente do ingrediente carboximetilcelulose. A biomassa seca de *H. pluvialis* foi inserida em cada tratamento de modo que apresentasse 10 (0,01%) e 15 (0,015%) mg de astaxantina por 100 g de ração. Para a produção das rações, os ingredientes foram adicionados em um recipiente e misturados manualmente a cada ingrediente inserido até a homogeneização total. Após a mistura dos ingredientes secos, o óleo de peixe foi adicionado e, por fim, foi incluída a água (25% do peso do lote seco). A massa foi prensada para produzir pellets de 1 mm, que foram submetidos à estufa a 50 °C para secagem por 24 h. A ração foi armazenada em recipiente opaco, em temperatura de 4 °C.

Tabela 2 – Formulação das dietas para alimentação do *C. cinctus*.

	A0	A10	A15
Ingrediente	(g 100 g⁻¹)	(g 100 g⁻¹)	(g 100 g⁻¹)
Farinha de peixe	67,0	67,0	67,0
Farinha de trigo	7,8	7,8	7,8
Glúten de trigo	7,0	7,0	7,0
Óleo de peixe	6,0	6,0	6,0
Amido de milho	5,0	5,0	5,0
Óleo de soja	4,0	4,0	4,0
Fosfato dicálcico	0,5	0,5	0,5
Carboximetilcelulose *	2,1	1,1	0,6
Biomassa de <i>H. pluvialis</i>	0	1	1,5
Premix de vitaminas e minerais**	0,6	0,6	0,6

*A quantidade de biomassa de *H. pluvialis* substituirá a fração equivalente do ingrediente na dieta controle (A0).

** Ingredientes: sulfato de zinco monohidratado, dióxido de silício, óxido de magnésio, sulfato de cobre pentahidratado, cálcio pantotenato (forma D), nitrato de tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico, cloridrato de piridoxina (vitamina B6), ácido fólico, óxido de manganês, dióxido de silício (amorfo) e acetato de retinil.

Foi realizada a análise bromatológica da ração, cujos teores de umidade, cinzas, proteínas, extrato etéreo e carboidratos foram determinados utilizando metodologia descrita pela AOAC (2012).

2.2.6 Estabilidade da ração

O teste de estabilidade das rações foi realizado baseado nos testes experimentais de Obaldo *et al.* (2002). Foram utilizadas garrafas de 500 mL preenchidas com 100 mL de água marinha (salinidade 30 g kg⁻¹) e 2 g de ração de cada tratamento, em triplicata. Para o período de lixiviação, as rações foram mantidas a 27 °C por 4 h sob aeração constante e, posteriormente, filtradas através de filtro de papel (20 µm). Após o processo de filtragem, os sólidos e as amostras de ração original foram secos em estufa a 105 °C por 24 h e pesados em balança semi-analítica. Para a determinação da retenção da matéria seca ou estabilidade dos pellets na água foi calculada a razão entre a matéria seca após a lixiviação e a matéria seca das amostras originais.

2.2.7 Manejo dos peixes

Quatro peixes para cada tratamento foram estocados, um em cada unidade experimental, em aquários de 8 L e alimentados duas vezes por dia (08h e 16h) com uma taxa de alimentação diária de 2% do peso corporal, durante 60 dias. Em cada aquário foram colocados 5 L de água marinha (salinidade 30 g kg⁻¹) e aeração constante.

A fim de garantir os parâmetros ideais para o bem-estar dos animais, foram avaliadas, semanalmente: temperatura, pH (Kkmoon pH/EC-983), oxigênio dissolvido (multi-parameter MultiProbe System 5565 YSI), salinidade (multi-parameter MultiProbe System 5565 YSI), amônia e nitrito (APHA, 2012). O fundo das unidades foi sifonado semanalmente para remoção de fezes e sobras de alimento, ocasionando em troca de água de 20% do volume total.

As biometrias foram realizadas no início e no final do experimento, retirando todos os animais para pesagem em balança com precisão de 0,1 mg e mensuração do comprimento total e altura através de paquímetro (Mitutoyo 530-114BR).

2.2.8 Análise de coloração

Para determinar a coloração dos animais foram amostrados todos os indivíduos no primeiro e último dia de cultivo. A coloração do tegumento dos indivíduos foi mensurada dentro do espaço de cores RGB utilizando uma câmera digital (Sony DSC-H400), com configurações seguindo as recomendações de Stevens *et al.* (2007). A câmera foi montada em

uma estrutura fechada a uma distância definida acima do peixe (posicionado em placa de Petri) composta por luz de LED para fornecer iluminação constante. Antes do processo de mensuração, cada indivíduo foi levemente anestesiado (100 mg L^{-1} de eugenol) para reduzir o nível de estresse do manuseio.

Para comparar a cor da pele dos peixes entre os tratamentos, as imagens foram analisadas no espectro RGB, sendo as medições realizadas em três pontos: cabeça, área dorsal e nadadeira caudal, utilizando o software Adobe Photoshop CC 2018. Em cada ponto houveram três repetições, sendo utilizado o valor médio entre elas.

2.2.9 Atividade antioxidante de catalase

A análise de catalase (CAT) foi realizada em extratos brutos de fígado suspensos em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4 (com Triton X-100 0,1% (m/v), e NaCl 150 mM) (diluição de 1:20), centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4 °C. A mistura do ensaio consistiu em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), 0,05 mL de H_2O_2 (0,3 M) e 0,05 mL de homogeneizado. A mudança da absorbância de H_2O_2 em 60 s foi medida a 240 nm. A unidade (U) da atividade de CAT foi calculada em termos de $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido min^{-1} , sendo os resultados expressos em U CAT mg^{-1} (SOARES *et al.*, 2021).

2.2.10 Desempenho zootécnico

Foram avaliados os seguintes índices zootécnicos: ganho de peso ($\text{GP} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$), ganho em comprimento ($\text{GL} = \text{Comprimento final} - \text{Comprimento inicial}$), fator de conversão alimentar ($\text{FCA} = \text{matéria seca fornecida} / \text{ganho de biomassa}$), taxa de crescimento específico ($\text{TCE} = 100 \times (\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial}) / \text{tempo}$), taxa de crescimento em comprimento ($\text{TCC} = 100 \times (\ln \text{Comprimento médio final} - \ln \text{Comprimento médio inicial}) / \text{tempo}$) e sobrevivência ($\text{S} = \text{n}^\circ \text{ de indivíduos final} / \text{n}^\circ \text{ de indivíduos inicial} \times 100$).

2.2.11 Análises estatísticas

Para a análise estatística foram realizados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett, seguido de ANOVA ($p < 0,05$). Para os dados em que a ANOVA denotou diferença significativa, foi aplicado o teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$). Os dados que não atenderam aos pressupostos da ANOVA foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Além disso, foi aplicada a correlação de Pearson entre as variáveis estudadas ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada usando o software R Core Team (R CORE TEAM, 2022).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização da biomassa de *H. pluvialis* e das dietas inertes formuladas

A biomassa de *H. pluvialis* na fase cística (vermelha) produzida apresentou conteúdo de proteínas e lipídios de $18,11 \pm 3,2$ e $7,46 \pm 0,9\%$ do peso seco, respectivamente. A microalga na fase cística (vermelha) tende a apresentar baixo conteúdo proteico (15-23%) e alta concentração de lipídios (até 37%) (SHAH *et al.*, 2016). Além da quantidade, o perfil lipídico da *H. pluvialis* favorece seu uso na formulação de dietas para peixes, com predominância dos ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1n9c), linoléico (C18:2n6c), linolelaídico (C18:2n6t), α -linolênico (C18:3n3) (DE MORAES *et al.*, 2022).

Por outro lado, há uma busca crescente por ingredientes alternativos, naturais e sustentáveis na formulação de alimentos para animais aquáticos cultivados, que podem oferecer benefícios para a saúde e nutrição, além de diminuir os impactos ambientais causados pelo uso de farinha e óleo de peixes de captura (SARKER *et al.*, 2018). Nesta perspectiva, as microalgas figuram com ampla gama de perfis dietéticos, sendo fontes de lipídios, ácidos graxos, esteróis, proteínas, aminoácidos, ficobiliproteínas e carotenoides (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017; NAGAPPAN *et al.*, 2021).

No entanto, para a *H. pluvialis* o metabólito alvo e de maior valor comercial é a astaxantina, carotenoide com aplicação nas indústrias farmacêutica, nutracêutica e de alimentos, para humanos e animais, por apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e de pigmentação (MOTA *et al.*, 2022). Na biomassa produzida no presente estudo, foi obtida uma concentração de astaxantina de $10 \pm 0,4$ mg g⁻¹ de biomassa seca, representando, aproximadamente, 90% dos carotenoides totais ($11 \pm 0,3$ mg g⁻¹). A partir desses resultados foi realizada a suplementação dietética com biomassa de *H. pluvialis* nas dietas do *C. cinctus*, com diferentes concentrações de astaxantina (A10 = 10 mg/ 100g⁻¹; A15 = 15 mg/ 100g⁻¹), cuja composição centesimal está descrita na tabela 3.

Tabela 3 - Composição centesimal das dietas inertes formuladas com diferentes concentrações de astaxantina de *H. pluvialis*.

	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	Cinzas	Umidade
A0	47,04 $\pm$ 2,14	14,3 $\pm$ 4,12	8,98 $\pm$ 6,03	15,15 $\pm$ 1,46	14,51 $\pm$ 0,11

A10	47,92 ± 0,30	15,87 ± 1,44	6,01 ± 1,47	14,83 ± 0,23	15,35 ± 0,15
A15	50,45 ± 2,46	15,61 ± 1,57	4,17 ± 2,86	15,16 ± 0,14	14,6 ± 0,77

Média de 3 réplicas ± desvio padrão. Os valores médios para a mesma coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). A0:0% (controle); A10: 0,01%; A15: 0,015%.

A composição centesimal das rações não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), contendo em média 48,5% de proteínas, 15% de lipídios, 6% de carboidratos, 15% de cinzas e 15% de umidade (Tabela 3). Os resultados foram semelhantes aos descritos por Jiang *et al.* (2019) utilizando os mesmos ingredientes, diferenciando-se apenas com relação à umidade (2,68%). Essa dieta é considerada adequada para gobiídeos que já atingiram a maturidade sexual, devendo ser composta por, no mínimo, 40% de proteína (DIMAGGIO *et al.*, 2020).

Além da composição, as dietas inertes foram analisadas quanto à desintegração na água, apresentando taxas de retenção de matéria seca de 96 ± 2,6% (A0), 88 ± 0,5% (A10) e 87 ± 2,7% (A15). A maior estabilidade física encontrada em A0 pode ser explicada pela maior concentração do estabilizante carboximetilcelulose, que nos outros tratamentos foi substituído parcialmente por biomassa de *H. pluvialis*. Entretanto, essa diferença na estabilidade não afetou o aproveitamento da ração pelos peixes, já que o consumo costumava ocorrer logo após a oferta. De forma semelhante, Obaldo *et al.* (2002) observaram diferença entre a estabilidade de rações experimental e comercial (controle) ofertadas para camarões, obtendo após 6h em água estática, 91,7% e 88,9% de retenção de matéria seca, respectivamente. Portanto, a dieta inerte elaborada no presente estudo apresentou boa estabilidade em água agitada durante 4h.

2.3.2 Efeitos da suplementação dietética com astaxantina na coloração, atividade antioxidante e desempenho zootécnico de *C. cinctus*

A coloração dos peixes ornamentais é um fator importante para a comercialização, pois está indiretamente relacionada à saúde do animal, capacidade reprodutiva e maior status social (EATON *et al.*, 2016). Visto que os peixes não são capazes de sintetizar carotenoides, a intensidade da coloração do tegumento depende principalmente do fornecimento de carotenoides dietéticos (JIANG *et al.*, 2019). Na aquicultura, a astaxantina tem sido utilizada para intensificar a cor da pele e da carne, uma vez que promove a pigmentação e aumenta a imunidade dos animais aquáticos (LU *et al.*, 2021).

A astaxantina presente na dieta influenciou a pigmentação dos peixes, sendo observado ao fim do experimento mudança na coloração dos tratamentos A10 e A15 (Figura 1). As medidas de R e G apresentaram diferenças entre todos os tratamentos, enquanto B foi diferente apenas em A0 ($p < 0,05$). Já com relação ao dia, os valores de R, G e B apresentaram diferenças significativas para os tratamentos A10 e A15 ($p < 0,05$). Enquanto o ponto do peixe não influenciou as medidas de R, G e B ($p > 0,05$).

Essas variações de pigmentação também ficaram visíveis nas fotografias do *C. cinctus* no primeiro e último dia de experimento (Figura 2). A mudança de pigmentação através da inclusão de astaxantina na dieta pode ser observada em diversos organismos aquáticos a partir de diferentes concentrações. Neste estudo, a maior pigmentação da pele dos peixes ocorreu ao utilizar 15 mg g⁻¹ de astaxantina. De modo semelhante, ao se alimentar de dieta com 16 e 20 mg g⁻¹ de astaxantina de *H. pluvialis*, os peixes ornamentais *Cichlasoma citrinellum* (PAN e CHIEN, 2009) e *Xyphophorus helleri* (PUTRA *et al.*, 2020) apresentaram maior pigmentação da pele.

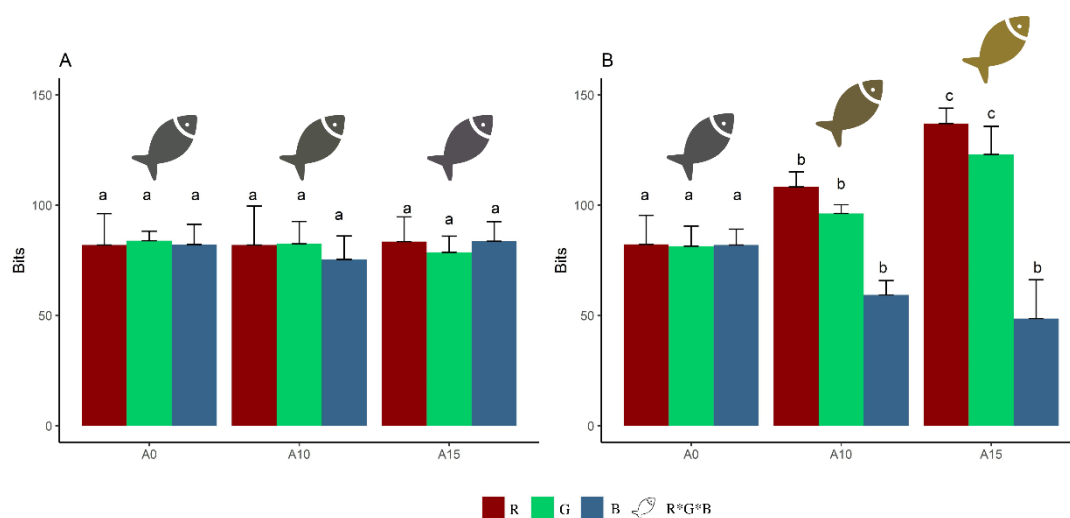


Figura 1 - Coloração média (RGB) de peixes *C. cinctus* alimentados com dietas inertes elaboradas com diferentes concentrações de astaxantina de *H. pluvialis* (A0-0%, A10-0,01%, A15-0,015%) ao início (A) e final do período experimental (B).

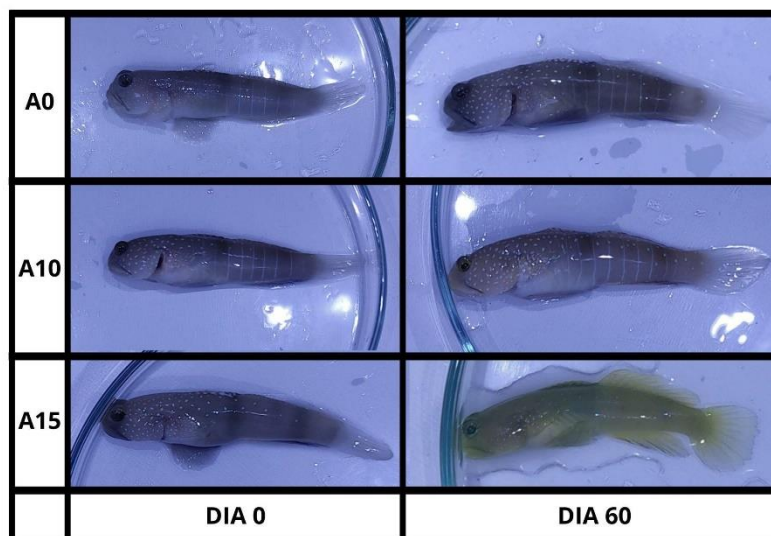


Figura 2 - Efeitos da concentração dietética de *H. pluvialis* rica em astaxantina (A0-0%, A10-0,01%, A15-0,015%) e tempo de suplementação (0 e 60 dias) na coloração do tegumento de *Cryptocentrus cinctus*.

Além de influenciar a pigmentação dos peixes, a astaxantina pode modificar a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase, uma das mais importantes no sistema de defesa dos organismos (SANDAMALIKA *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2023). No presente estudo, a atividade de catalase apresentou diferença significativa entre os tratamentos de maior e menor concentração de astaxantina ($p < 0,05$), com valores médios de 25 (A15) e 12 (A0) U CAT mg^{-1} (Figura 3). A astaxantina, por ser um carotenoide de alto poder antioxidante, atua no aumento da atividade de catalase que age contra o estresse oxidativo a partir da desintoxicação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), evitando seus efeitos tóxicos (SANDAMALIKA *et al.*, 2021).

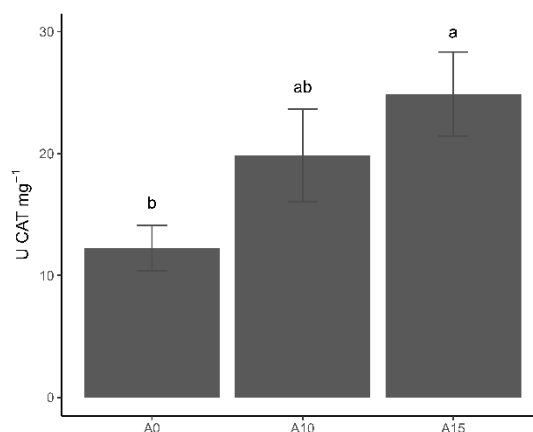


Figura 3 - Atividade de catalase em peixes *Cryptocentrus cinctus* alimentados com dieta inerte suplementada com astaxantina de *Haematococcus pluvialis*.

Os peixes estão constantemente sujeitos ao estresse oxidativo no ambiente aquático, devido às variações ambientais e patogênicas que podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e resultar em danos celulares (ELVITIGALA *et al.*, 2013). Portanto, o papel da catalase, eliminando as espécies reativas de oxigênio, é importantíssimo, pois influencia positivamente o sistema imunológico e desempenho produtivo dos peixes cultivados (ELVITIGALA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2023). Dessa forma, a suplementação dietética com astaxantina de *H. pluvialis* além de influenciar a atividade de catalase, influenciou os aspectos zootécnicos do *C. cinctus*.

A dieta com maior concentração de astaxantina (A15) resultou em maior ganho de peso (GP) e comprimento (GL) e menor fator de conversão alimentar (FCA) (Tabela 4). Há muitas controvérsias com relação à influência da suplementação de astaxantina no crescimento de peixes, alguns estudos demonstram que pode melhorar o crescimento (RHAMAN *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2022), enquanto outros não (NOGUEIRA *et al.*, 2021; MICAH *et al.*, 2022). Entretanto, isso está relacionado com o estágio de desenvolvimento, fisiologia da espécie, ambiente de cultivo, fonte de astaxantina e duração de alimentação (LIM *et al.*, 2018). A suplementação dietética com astaxantina proporcionou maiores índices de crescimento para *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), principalmente a proveniente de *H. pluvialis* em comparação com astaxantina natural de levedura (*Phaffia rhodozyma*) e sintéticas (ZHAO *et al.*, 2022). Segundo Zhao *et al.* (2022), esse carotenoide tem efeitos positivos na morfologia

intestinal, aumentando comprimento e espessura das vilosidades e espessura muscular, o que pode contribuir para a melhor absorção e utilização dos nutrientes, levando a um melhor desempenho zootécnico.

Tabela 4 - Desempenho zootécnico dos peixes *Cryptocentrus cinctus* alimentados com dietas inertes com diferentes concentrações de astaxantina de *Haematococcus pluvialis*.

	GP (g)	GL (mm)	FCA	TCE (%)	TCC (%)	S (%)
A0	0,33 ± 0,10 ^{ab}	5,49 ± 1,12 ^b	2,10 ± 0,57 ^b	0,355 ± 0,10 ^a	0,17 ± 0,03 ^a	100 ^a
A10	0,25 ± 0,03 ^b	5,01 ± 0,56 ^b	2,00 ± 0,58 ^{ab}	0,43 ± 0,10 ^a	0,17 ± 0,03 ^a	100 ^a
A15	0,44 ± 0,07 ^a	7,93 ± 1,31 ^a	1,10 ± 0,16 ^a	0,49 ± 0,14 ^a	0,19 ± 0,08 ^a	100 ^a

Média de 3 réplicas ± desvio padrão. Os valores médios para a mesma coluna com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). GP: ganho de peso; GL: ganho em comprimento; FCA: fator de conversão alimentar; TCE: taxa de crescimento específico; TCC: taxa de crescimento em comprimento; S: sobrevivência; A0: 0% (controle); A10: 0,01%; A15: 0,015%.

Vários fatores, como qualidade ou consumo da ração, estado fisiológico e qualidade da água, afetam o nível de carotenoides nos tecidos dos peixes (EBENEEZAR *et al.*, 2020). Os fatores de qualidade da água se mantiveram dentro da faixa ideal para criação de Gobiidae: oxigênio dissolvido de $5,14 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$, salinidade de $30,6 \pm 1,01 \text{ g L}^{-1}$, pH 7,93 a 8,18, $\text{NH}_4^+ < 0,50 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{NO}_2^- < 0,05 \text{ mg L}^{-1}$. A temperatura da água variou entre 27,7 e 28,3 °C. Esses parâmetros são adequados para o desenvolvimento dos animais, pois simulam as condições naturais que os Gobies experimentam na natureza (DIMAGGIO *et al.*, 2020), portanto não foi observada influência da qualidade da água no nível de estresse dos peixes e na absorção da astaxantina.

Após aplicação do teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$) pôde-se constatar que houveram significativas ($p < 0,05$) correlações diretas ($0 < r \leq 1$) e inversas ($-1 \leq r < 0$) entre as variáveis analisadas (Figura 4). As variáveis do padrão de cores RGB (R, G e B), FCA e U CAT mereceram destaque, apresentando a maior quantidade de correlações significativas ($p <$

0,05). Primeiramente, a escala de cor R, G e B se correlacionam entre si, tendo o B inversamente correlacionado com o R ($r = -0,64$) e o G ($r = -0,60$); já o R e G correlacionaram-se diretamente ($r = 0,94$). Por conseguinte, o G apresentou correlações significativas com FCA ($r = -0,61$), GL ($r = 0,66$), GP ($r = 0,62$) e U CAT ($r = 0,81$). O FCA apresentou em sua maioria correlações inversas às demais variáveis, destacando-se o GL ($r = -0,63$), GP ($r = -0,65$) e TCE ($r = -0,72$). Além disso, a U CAT demonstrou correlações significativas com as variáveis GL ($r = 0,62$) e da escala de cor R ($r = 0,82$) e B ($r = -0,78$).



Figura 4 - Correlação encontrada entre os padrões de cores RGB (R, G, B), fator de conversão alimentar (FCA), ganho de comprimento (GL), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico e atividade da enzima catalase (U CAT mg^{-1}). Valores de r após teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). Correlações diretas em escala de verde, correlações inversas em escala de rosa.

Por meio das análises de correlações, foi possível inferir a existência de relações inversas e diretas entre as variáveis. Cabe relevância a correlação entre padrão de cor RGB, onde à medida que o B aumentou, o R e o G diminuíram; e maiores quantidades de G implicaram em maiores valores de R (Figura 1). O balanço entre os valores de R, G e B é

importante para promover a formação de cores no espectro visível, esses valores variam de 0 a 255, para cada, os quais gerarão cores específicas no espectro visível através de diferentes combinações. O peixe *C. cinctus* apresenta maiores valores e saída de venda quando possui tons variados na escala de cor do amarelo (SUN *et al.*, 2012). A cor amarela comumente conhecida no padrão R*G*B apresenta os seguintes valores, respectivos: 255, 255, 0. Isso pode explicar o porquê de o R e o G apresentarem correlações diretas, pois para o peixe se apresentar na cor amarela é preciso elevar, à mesma medida, os valores de R e G e diminuir os valores de B. A aquisição de um tom mais amarelado foi conferida no tratamento com maior inserção de astaxantina, indicando a influência desse carotenoide na pigmentação dos peixes.

A forte correlação entre o FCA e o G (do padrão RGB) indica que o melhor aproveitamento da ração (menor FCA) teve como consequência melhor aproveitamento da astaxantina, refletindo na cor mais amarelada do peixe. Além disso, dado as elevadas correlações encontradas, este padrão de cores em RGB pode sofrer influência da atividade da enzima catalase (U CAT) produzida pelo peixe *C. cinctus*. A princípio, na via metabólica, a produção dessa enzima está associada a desintoxicação do organismo, neutralizando substâncias tóxicas que poderiam influenciar na degradação das células, ou seja, está associada à saúde do organismo pelo seu poder antioxidante (ZHAO *et al.*, 2023). Por outro lado, cores mais intensas tendem a ter relação com a saúde do organismo e, conseqüentemente, com o bom funcionamento do metabolismo aliado ao melhor aproveitamento nutricional (EBENEEZAR *et al.*, 2020).

2.4. Conclusões

A dieta inerte suplementada com 0,015% de astaxantina de *H. pluvialis* proporcionou maior pigmentação do tegumento dos peixes, com aquisição de cor em tons amarelados, além de maior atividade antioxidante (enzima catalase) e melhores índices produtivos do *Cryptocentrus cinctus*, com maior ganho em peso e comprimento e melhor aproveitamento da ração (menor FCA). Portanto, o uso de astaxantina como suplemento dietético, em concentração de 0,015%, pode contribuir para a valorização comercial do peixe ornamental *C. cinctus* (yellow watchman), por apresentarem maior pigmentação, atividade antioxidante e aspectos produtivos.

2.5. Referências

- AOAC [Association of Official Agricultural Chemists]. **Official methods of analysis**. 19 ed. Gaithersburg: AOAC, 2012.
- APHA [American Public Health Association]. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: APHA, 2012.
- ARAÚJO, J.G. *et al.* Ornamental fish chain of Xingu River, Pará, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 2, p. 297-307, 2017.
- BILBAO, P.G.S. *et al.* *Haematococcus pluvialis* as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 6, p. 3283-3294, 2016.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- CAPELLI, B.; BAGCHI, D.; CYSEWSKI, G.R. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. **Nutrafoods**, v. 12, n. 4, p. 145-152, 2013.
- CARDOSO, R.S. *et al.* O comércio de organismos aquáticos ornamentais. In: REZENDE, F.P.; FUJIMOTO, R.Y. (Ed.). **Peixes ornamentais no Brasil: mercado, legislação, sistemas de produção e sanidade**. 1ª Ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 15-82, 2021.
- CHENG, J. *et al.* Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. **Bioresource technology**, v. 204, p. 49-54, 2016.
- CHRISTIAN, D. *et al.* Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 548-551, 2018.
- DAS, A.P.; BISWAS, S.P. Carotenoids and pigmentation in ornamental fish. **Journal of Aquaculture and Marine Biology**, v. 4, n. 5, p. 1-3, 2016.
- DE MORAES, L.B.S. *et al.* Gamma Radiation as a Pretreatment for Co-extraction of Lipids and Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **BioEnergy Research**, p. 1-10, 2022.

DE MORAES, L.B.S. *et al.* *Haematococcus pluvialis* cultivation and astaxanthin production using different nitrogen sources with pulse feeding strategy. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 2, p. 1-13, 2023.

DEY, V.K. The global trade in ornamental fish. **Infofish International**, p. 1-4, 2016.

DIMAGGIO, M. *et al.* Aquaculture Applications of the Family Gobiidae. **EDIS**, v. 2020, n. 3, p. 7-7, 2020.

DING, W. *et al.* Melatonin: a multifunctional molecule that triggers defense responses against high light and nitrogen starvation stress in *Haematococcus pluvialis*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7701-7711, 2018.

DONG, S. *et al.* Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

DORIA, E. *et al.* Influence of light stress on the accumulation of xanthophylls and lipids in *Haematococcus pluvialis* CCALA 1081 Grown under autotrophic or mixotrophic conditions. **Journal of Marine Biology and Aquaculture**, v. 4, n. 1, p. 30-35, 2018.

EATON, L. *et al.* The behavioural effects of supplementing diets with synthetic and naturally sourced astaxanthin in an ornamental fish (*Puntius titteya*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 182, p. 94-100, 2016.

EBENEEZAR, S. *et al.* Evaluation of dietary oleoresins on the enhancement of skin coloration and growth in the marine ornamental clown fish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). **Aquaculture**, v. 529, p. 735728, 2020.

ELVITIGALA, D.A.S. *et al.* Marine teleost ortholog of catalase from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular perspectives from genomic organization to enzymatic behavior with respect to its potent antioxidant properties. **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 4, p. 1086-1096, 2013.

GROOVER, E.M.; DIMAGGIO, M.; CASSIANO, E.J. Overview of Commonly Cultured Marine Ornamental Fish. **EDIS**, v. 2020, n. 3, p. 7-7, 2020.

GÜROY, D. *et al.* Color intensity and growth performance of common clownfish (*Amphiprion ocellaris*) enhanced by dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*). **Aquaculture International**, p. 1-14, 2022.

JIANG, J. *et al.* Enhancing the colouration of the marine ornamental fish *Pseudochromis fridmani* using natural and synthetic sources of astaxanthin. **Algal Research**, v. 42, p. 101596, 2019.

KIM, J.Y. *et al.* Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. **Bioresource technology**, v. 268, p. 815-819, 2018.

LADISA, C.; BRUNI, M.; LOVATELLI, A. Overview of Ornamental Species Aquaculture. **FAO Aquaculture Newsletter**, Rome Ed. 56, p. 39-40, 2017.

LIM, K.C. *et al.* Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in aquaculture*, v. 10, n. 3, p. 738-773, 2018.

LU, Q. *et al.* Astaxanthin as a microalgal metabolite for aquaculture: A review on the synthetic mechanisms, production techniques, and practical application. **Algal Research**, v. 54, p. 102178, 2021.

MICAH, A.D. *et al.* Effect of dietary astaxanthin on growth, body color, biochemical parameters and transcriptome profiling of juvenile blood parrotfish (*Vieja melanurus*♀ × *Amphilophus citrinellus*♂). **Aquaculture Reports**, v. 24, p. 101142, 2022.

MORAES, B.S. *et al.* Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1597-1601, 2007.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 76, p. 493-506, 2017.

NAGAPPAN, S., *et al.* Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. **Journal of Biotechnology**, v. 341, p. 1-20, 2021.

NICHOLS, H.W.; BOLD, H.C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. **Journal of Phycology**, v. 1, n. 1, p. 34-38, 1965.

NOGUEIRA, N. *et al.* Effect of different levels of synthetic astaxanthin on growth, skin color and lipid metabolism of commercial sized red porgy (*Pagrus pagrus*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 276, p. 114916, 2021.

OBALDO, L.G.; DIVAKARAN, S.; TACON, A.G. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. **Aquaculture research**, v. 33, n. 5, p. 369-377, 2002.

PAN, C.H.; CHIEN, Y.H. Effects of dietary supplementation of alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow), synthetic astaxanthin and β -carotene on survival, growth, and pigment distribution of red devil, *Cichlasoma citrinellum* (Günther). **Aquaculture Research**, v. 40, n. 8, p. 871-879, 2009.

PUTRA, D.F. *et al.* Effects of astaxanthin on the skin color of green swordtail, *Xyphophorus helleri*. In: **E3S Web of Conferences**. EDP Sciences, p. 01065, 2020.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, 2022. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 10 Dez 2022.

RAHMAN, M. *et al.* Effects of dietary inclusion of astaxanthin on growth, muscle pigmentation and antioxidant capacity of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Preventive nutrition and food science**, v. 21, n. 3, p. 281, 2016.

RIBEIRO, F.; LIMA, M.; FERNANDES, C. Panorama do mercado de organismos aquáticos ornamentais. **Boletim Sociedade Brasileira de Limnologia**, v. 38, n. 2, p. 1-15, 2010.

SAHA, S.K. *et al.* Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource technology**, v. 128, p. 118-124, 2013.

SANDAMALIKA, W M. *et al.* The possible role of catalase in innate immunity and diminution of cellular oxidative stress: Insights into its molecular characteristics, antioxidant activity, DNA protection, and transcriptional regulation in response to immune stimuli in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 113, p. 106-117, 2021.

SARKER, P. *et al.* Towards sustainable aquafeeds: Evaluating substitution of fishmeal with lipid-extracted microalgal co-product (*Nannochloropsis oculata*) in diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0201315, 2018.

SHAH, M.R. *et al.* Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 531, 2016.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *et al.* Microalgae *Ankistrodesmus gracilis* as feed ingredient for ornamental fish *Xiphophorus maculatus*. **International Aquatic Research**, v. 11, p. 125-134, 2019.

SOARES, E.C. *et al.* Oil impact on the environment and aquatic organisms on the coasts of the states of Alagoas and Sergipe, Brazil-A preliminary evaluation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 171, p. 112723, 2021.

STEVENS, M. *et al.* Using digital photography to study animal coloration. **Biological Journal of the Linnean society**, v. 90, n. 2, p. 211-237, 2007.

SUN, X. *et al.* The effect of dietary pigments on the coloration of Japanese ornamental carp (koi, *Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 342, p. 62-68, 2012.

UNVER, A.G.; HAMZAÇEBI, S. Effect of natural pigment sources on colouration of red zebra cichlid (*Maylandia estherae* Konings, 1995). **Aquaculture Research**, v. 51, n. 10, p. 4372-4380, 2020.

XIE, S. *et al.* Dietary supplementation of *Haematococcus pluvialis* improved the immune capacity and low salinity tolerance ability of post-larval white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 80, p. 452-457, 2018.

ZHAO, W. *et al.* Comparison of the Retention Rates of Synthetic and Natural Astaxanthin in Feeds and Their Effects on Pigmentation, Growth, and Health in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2473, 2022.

ZHAO, W. *et al.* Effects of synthetic astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth, antioxidant capacity, immune response, and hepato-morphology of *Oncorhynchus mykiss* under cage culture with flowing freshwater. **Aquaculture**, v. 562, p. 738860, 2023.

ZUANON, J.S.; SALARO, A.L.; FURUYA, W.M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 165-174, 2011.

3. Considerações finais

A biomassa de *H. pluvialis* é uma fonte rica em astaxantina e adequada para produzir dietas inertes do peixe ornamental *Cryptocentrus cinctus*. As dietas formuladas mostraram-se adequadas para a espécie, apresentando composição centesimal de, em média, 48,5% de proteínas, 15% de lipídios, 6% de carboidratos, 15% de cinzas e 15% de umidade. A suplementação com astaxantina de *H. pluvialis*, em concentração de 0,015% (A15), resultou em maiores pigmentação (amarela), atividade antioxidante (maior atividade da enzima catalase) e crescimento (em peso e comprimento) do peixe ornamental *C. cinctus*. Além disso, foi observado melhor aproveitamento da ração, com menor FCA nas dietas com astaxantina. Em vista disso, o uso de astaxantina como suplemento dietético, em concentração de 0,015%, pode contribuir para a valorização comercial do peixe ornamental *C. cinctus* (yellow watchman), por apresentarem melhores resultados de pigmentação e aspectos produtivos.

4. Referências

- CARDOSO, R.S. *et al.* O comércio de organismos aquáticos ornamentais. Rezende, FP; Fujimoto, RY (eds.) **Peixes ornamentais no Brasil: mercado, legislação, sistemas de produção e sanidade**. Brasília, Distrito Federal: Embrapa, p. 15-82, 2021.
- CHAUTON, M.S. *et al.* A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. **Aquaculture**. v. 436, p. 95-103, 2015.
- CHEN, F. *et al.* The application of microalgae biomass and bio-products as aquafeed for aquaculture. **Algal Research**. v. 60, 2021.
- DAVINELLI, S.; NIELSEN, M.E.; SCAPAGNINI, G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 522, 2018.
- FERREIRA, V.A.M. *et al.* Avaliação do comércio de peixes ornamentais no estado do Amazonas – Brasil. **Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana**. 2020.
- GOMES, V.D.S. *et al.* Uso de aditivos alimentares para peixes ornamentais. **Revista Científica Rural**. v. 23, 2021.
- GUEDES, A.C.; SOUSA-PINTO, I.; MALCATA, F.X. Application of Microalgae Protein to Aquafeed. In: KIM, SE-KWON. **Handbook of marine microalgae**. Busan, South Korea: Academic Press, 2015, p. 93-125.
- HAN, S. *et al.* Astaxanthin biosynthesis promotion with pH shock in the green microalga, *Haematococcus lacustris*. **Bioresource technology**, v. 314, p. 123725, 2020.
- HODAR, A.R. *et al.* Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: a review. **Journal of Experimental Zoology, India**. v. 23, p. 13-21, 2020.
- IGARASHI, M.A. Potencial econômico do agronegócio da produção de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, p. 293-313, 2004.
- JIANG, J. *et al.* Enhancing the colouration of the marine ornamental fish *Pseudochromis fridmani* using natural and synthetic sources of astaxanthin. **Algal Research**, v. 42, p. 101596, 2019.

DA SILVA, L.I.P.; DAIRIKI, J.K. Suplementação de vitamina B1 (tiamina) na nutrição de juvenis de tambaqui. **Circular técnica EMBRAPA**, 2021.

KASMI, M. *et al.* Feasibility and strategy of developing the agribusiness of marine ornamental fish for export. **Poeciliid Research**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.

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

KUMAR, S. *et al.* Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1064-1082, 2022.

LINDEN, J.V. *et al.* Aquaculture Applications of the Family Gobiidae. **UF/IFAS Extension**, FA226, p.1-7, 2020.

MOTA, G.C.P. *et al.* Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 598-609, 2022.

NAM, S.; RHEE, J. Complete mitochondrial genome of the fire goby, *Nemateleotris magnifica* (Perciformes, Gobiidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 5, n. 2, p. 1894-1896, 2020.

NAM, SANG-EUN.; RHEE, JAE-SUNG. Complete mitochondrial genome of the yellow prawn-goby, *Cryptocentrus cinctus* (Perciformes, Gobiidae). **Mitochondrial DNA Part B**. v. 5, p. 1993-1995, 2020.

NOTTINGHAM, M.C.; CUNHA, F.E.A.; MONTEIRO-NETO, C. Captura de peixes ornamentais marinhos no estado do Ceará. **Arquivo de Ciências do Mar**. v. 33, p. 113-118, 2000.

PATZNER, R.A.; VAN, T.J.L.; KOVACIC, M.; KAPOOR, B.G. **The biology of gobies**. Science Publishers Inc., New Hampshire, p. 320, 2011.

SANDAMALIKA, W.M.G. *et al.* The possible role of catalase in innate immunity and diminution of cellular oxidative stress: Insights into its molecular characteristics, antioxidant activity, DNA protection, and transcriptional regulation in response to immune stimuli in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 113, p. 106-117, 2021.

SCHMEISSER, J. *et al.* Molecular Mechanism Involved in Carotenoid Metabolism in Post-Smolt Atlantic Salmon: Astaxanthin Metabolism During Flesh Pigmentation and Its Antioxidant Properties. **Marine Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 653-670, 2021.

SHAH, M.R. *et al.* Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 531, 2016.

THACKER, C.E.; THOMPSON, A.R.; ROJE, D.M. Phylogeny and evolution of Indo-Pacific shrimp-associated gobies (Gobiiformes: Gobiidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 59, n. 1, p. 168-176, 2011.

WAN, A.H.L. *et al.* Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-35, 2018.

XIE, J. *et al.* Study on mechanism of synthetic astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* improving the growth performance and antioxidant capacity under acute hypoxia stress of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) and enhancing anti-inflammatory by activating Nrf2-ARE pathway to antagonize the NF- κ B pathway. **Aquaculture**, v. 518, p. 734657, 2020.

ZHANG, Z. *et al.* A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 113, n. 10, p. 2088-2099, 2016.

ZHAO, W. *et al.* Effects of synthetic astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth, antioxidant capacity, immune response, and hepato-morphology of *Oncorhynchus mykiss* under cage culture with flowing freshwater. **Aquaculture**, v. 562, p. 738860, 2023.

ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L.; FURUYA, W.M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 40, p. 165-174, 2011.