



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MANEJO DE TEMPERATURA E USO DO SUPLEMENTO URUCUM NA
ALIMENTAÇÃO DE *BETTA SPLENDENS*

LARISSA SELINI DORCE

Dourados - MS
Março-2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MANEJO DE TEMPERATURA E USO DO SUPLEMENTO URUCUM NA
ALIMENTAÇÃO DE *BETTA SPLENDENS*

Larissa Selini Dorce

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claucia Aparecida Honorato
Coorientador: Prof. Dr. Klaus Casaro Saturnino

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Área de Concentração: Produção Animal.

Dourados - MS
Março- 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

I	Dorce, Larissa Selini
694m	Manejo de temperatura e uso do suplemento urucum na alimentação de <i>Betta splendens</i> / Larissa Selini Dorce -- Dourados: UFGD, 2022.
	Orientadora: Prof ^ª . Dra. Claucia Aparecida Honorato da Silva.
	Coorientador: Prof. Dr. Klaus Casaro Saturnino.
	Dissertação (Mestrado em Zootecnia) FCA, Faculdade de Ciências Agrárias - Universidade Federal da Grande Dourados.
	1. Aquicultura Ornamental. 2. Aditivo. 3. <i>Bixa orellana</i> L.
	4. Desempenho. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

**MANEJO DE TEMPERATURA E USO DO SUPLEMENTO URUCUM NA
ALIMENTAÇÃO DE *BETTA SPLENDENS***

Por

Larissa Selini Dorce

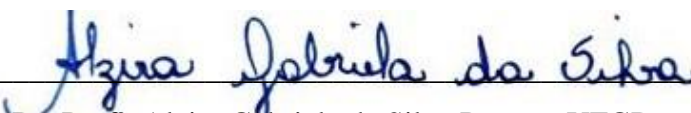
Defesa apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título
de MESTRE EM ZOOTECNIA

Aprovado em: 18/03/2022

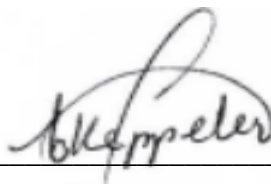


Dr. Prof^a. Cláudia A. Honorato

Orientadora - UFGD/FCA



Dr. Prof^a. Alzira Gabriela da Silva Pause – UFGD



Dr^a. Prof^a. Erlei Cassiano Keppeler - UFAC

RESUMO

DORCE, Larissa Selini, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, Março de 2022. **Manejo de temperatura e uso do suplemento urucum na alimentação de *Betta splendens***. Orientadora: Cláucia Aparecida Honorato; Coorientador: Klaus Casaro Saturnino.

Resumo: Dentre as espécies com importante potencial na piscicultura ornamental, o *Betta splendens* apresenta grande relevância, por ser um peixe amplamente difundido pelo Brasil, destacando-se por sua beleza, coloração marcante e rusticidade. Neste contexto, a demanda crescente por espécies de cunho ornamental tem induzido cultivos cada vez mais intensivos. Sendo assim, torna-se imprescindível a produção de dietas que atendam exigências cada vez mais específicas destes animais, e a utilização de aditivos alimentares para as espécies ornamentais pode contribuir para a confecção de rações, colaborando para o fortalecimento da imunidade, a intensificação da coloração corporal, o aumento da digestibilidade dos ingredientes, atendimento às exigências nutricionais das espécies, além de colaborar com o bem-estar durante o cultivo. Um bom exemplo é o urucum, por possuir compostos bioativos, como carotenóides, oriundos do metabolismo secundário das plantas, e com importantes propriedades antioxidantes, responsáveis pela proteção celular. Neste contexto, compreendendo que a utilização de substâncias bioativas, têm crescente atenção e utilização em rações comerciais pela sua ação antioxidante em animais cultivados, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos de diferentes níveis de inclusão de extrato de urucum na alimentação de *Bettas splendens*, como promotor de bem-estar durante seu cultivo.

Palavras-chave: Aquicultura ornamental; Aditivo; *Bixa orellana L*; Desempenho.

ABSTRACT

DORCE, Larissa Selini, Federal University of Grande Dourados, Dourados MS, march 2022.

Use of annatto in the diet of cultivated ornamental fish as a promoter of well-being.

Advisor: Claucia Aparecida Honorato; Co-Advisor: Klaus Casaro Saturnino.

Abstract: Among the species with important potential in ornamental fish farming, *Betta splendens* has great relevance, as it is a fish widely spread throughout Brazil, standing out for its beauty, striking color and rusticity. In this context, the growing demand for ornamental species has induced increasingly intensive cultivation. Therefore, it is essential to produce diets that meet increasingly specific requirements of these animals, and the use of food additives for ornamental species can contribute to the production of rations, contributing to the strengthening of immunity, the intensification of coloration. corporal, increasing the digestibility of the ingredients, meeting the nutritional requirements of the species, in addition to collaborating with the well-being during cultivation. A good example is annatto, as it has bioactive compounds, such as carotenoids, from the secondary metabolism of plants, and with important antioxidant properties, responsible for cellular protection. In this context, understanding that the use of bioactive substances has increasing attention and use in commercial rations for their antioxidant action in cultivated animals, the objective of the present study is to evaluate the effects of different levels of inclusion of annatto extract in the diet of *Bettas splendens*, as a promoter of well-being during its cultivation.

Keywords: Additive; *Bixa orellana L*; Ornamental aquaculture; Performance.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
CAPITULO I.....	12
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 Aquicultura Ornamental.....	13
1.2 <i>Betta splendens</i>	13
1.3 Substâncias aditivas na alimentação de peixes ornamentais.....	14
1.4 Urucum	15
1.5 Coloração dos peixes e a influência dos carotenoides na pigmentação.....	15
1.6 Influência da temperatura sobre o metabolismo dos peixes	16
1.7 Estudo do comportamento em peixes	17
2. OBJETIVO	17
2.1 Objetivos Específicos	17
3. REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO II.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	23
4. INTRODUÇÃO.....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSSÃO	28
8. CONCLUSÃO.....	29
9. REFERENCIAS	30
CAPÍTULO III	32
ABSTRACT	33

11. MATERIAL E MÉTODOS	35
11.1 Caracterização da matéria-prima de Urucum	35
11.2 Dietas experimentais	36
11.6 Análise estatística.....	39
12. RESULTADOS	39
13. DISCUSSÃO	42
14. CONCLUSÃO	45
15. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etograma avaliados em fêmeas de <i>Betta splendens</i> submetidas a diminuição progressiva e manutenção da temperatura.....	24
Tabela 2: Classificação das alterações comportamentais observadas em fêmeas de <i>Betta splendens</i> submetidas a estresse por diminuição gradativa da temperatura e manutenção por período de 12 horas.....	24
Tabela 3- Caracterização e composição das dietas experimentais acrescidas de extrato oleoso de urucum.....	33
Tabela 4 – atividade digestiva, metabólica e oxidativa de fêmeas de <i>Bettas splendens</i> alimentadas com níveis de extrato oleoso de urucum.....	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Gráfico demonstrando a metodologia empregada no acompanhamento de *Betta splendens* submetidos a queda de temperatura e manutenção fria por 12 horas.....23
- Figura 2** – Representação de modelo estatístico quanto aos batimentos operculares de betas de acordo com a variação de temperatura.....25
- Figura 3.** Representação esquemática, onde nas 6 primeiras horas os animais foram submetidos ao estresse por temperatura, com temperatura inicial de 28°C, ajustada para a temperatura de 14°C, com variação de 2°C a cada uma hora pela adição de gelo. Após o desafio de temperatura os peixes foram mantidos em temperatura de 28°C por 6 horas para recuperação.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	→	Micrograma
ALB	→	Albumina
ALT	→	Alanina aminotransferase
AST	→	Aspartato aminotransferase
CAT	→	Catalase
EOU	→	Extrato oleoso de urucum
Kg	→	Quilograma
mg/L	→	Miligramma por litro
mg kg ⁻¹	→	Miligramma por quilo
SOD	→	Superóxido desmutase

CAPITULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A aquicultura é um processo complexo, diversificado e interativo, que depende de recursos hídricos e humanos, animais e investimentos em capital. Uma grande variedade de organismos aquáticos é encontrada na aquicultura (SUN, et al.,2020), com destaque para a produção de peixes ornamentais.

A piscicultura ornamental de água doce é uma grande atividade centrada na região Sudeste do país, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Mais de 100 espécies da bacia amazônica e da Ásia foram produzidas nas últimas décadas. Algumas delas incluem *Pterophylum scalare*, *Symphysodon aequifasciatus*, *Betta splendens*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* e *Poecilia reticulata* (VALENTI et al., 2021), com a *Betta splendens* com importante relevância comercial. Esta espécie apresenta-se amplamente difundida pelo Brasil, destacando-se por sua popularidade em razão de sua beleza, coloração marcante e rusticidade (SANTOS et al., 2020).

A procura crescente por espécies ornamentais tem induzido a realização de cultivos cada vez mais intensivos. Sendo assim, torna-se imprescindível a produção de dietas que atendam às exigências destes animais, especialmente sob estas condições. A utilização de aditivos alimentares para espécies ornamentais pode contribuir para a confecções de rações, colaborando para o fortalecimento da imunidade, a intensificação da coloração corporal, o aumento da digestibilidade dos ingredientes, além de atender as exigências nutricionais das espécies (GOMES et al., 2021).

Dentre os aditivos utilizados na produção de dietas para espécies ornamentais, existem os pigmentos, com o papel de intensificar a coloração pele (ZUANO et al., 2011). Um dos principais pigmentos utilizados são os carotenoides, que também contribuem para o aumento da resposta imunológica e melhora do desempenho dos peixes (COSTA & MIRANDA-FILHO, 2020)

Como os carotenoides são conhecidamente elementos relacionados com a atividade do sistema imune e a respostas ao estresse, peixes alimentados com dietas carentes deste grupo alimentar, podem apresentar deficiências no que tange a pigmentação desejada da pele e menor capacidade imunológica dos animais (CLOTFELTER et al., 2007).

O uso de aditivos naturais como substâncias bioativas nas rações proporciona um veículo simples de melhorar a saúde e o desenvolvimento dos peixes. Consequentemente, vários

produtos à base de extratos e óleos vegetais têm sido explorados como bioativos em rações comerciais, resultando em efeitos positivos sobre o desempenho e a saúde dos animais (SANTOS et al., 2020).

As substâncias bioativas estão presentes em diversos alimentos na forma ativa, e compõem o grupo dos compostos antocianinas, flavonoides e fenólicos, além de outros compostos que proporcionam vários benefícios a saúde. Grande parte desses componentes é responsável pelas cores dos alimentos, como vermelha, roxa e azul, encontrados em diversos vegetais, flores e frutos (BATISTA et al., 2014). Além disso, a utilização dessas substâncias bioativas, têm crescente atenção, graças a sua ação também antioxidante (FARIA et al., 2016).

O urucum, conhecidamente, possui muitos compostos bioativos, dentre os quais compostos fenólicos e carotenoides, importantes substâncias com propriedades funcionais, como a propriedade antioxidante, responsável pela proteção celular (MOREIRA et al., 2014). Uma destas substâncias é a bixina, o carotenoide de maior concentração nas sementes desta planta, podendo chegar a até 80% de sua constituição (TOCCHINI & MERCADANTE, 2001).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aquicultura Ornamental

Aquicultura industrial é uma atividade relativamente jovem no Brasil, com cerca de meio século de existência (VALENTI et al., 2021). Apresenta-se dividida em várias outras atividades, com destaque a piscicultura ornamental, um campo em ampla expansão no Brasil. Esta atividade trata-se de um componente significativo no comércio da aquicultura internacional, atendendo um público exigente, composto por milhões de aquaristas em todo o mundo (SANTOS et al., 2020).

A aquicultura ornamental é uma atividade que nos últimos anos vem se destacando como um dos setores mais lucrativos da piscicultura brasileira (GOMES et al., 2019). O potencial dessa atividade tem estimulado e alavancado o setor, visto que, o quilo do peixe ornamental produzido pode alcançar até 500% sobre valor do quilo de peixes de corte, variando de acordo com a espécie e linhagem utilizada (BARRETO, 2017). Peixes ornamentais apresentam características marcantes, como formato e coloração diversas, tornando-os um forte atrativo ao comércio (DORCE et al., 2020).

1.2 *Betta splendens*

Dentre as espécies de interesse ornamental, o *Betta splendens* é um peixe muito difundido no Brasil destacando-se principalmente por seus atrativos de aparência, coloração, iridescência, formato da nadadeira e tamanho do corpo (PANIJPAN, et al., 2020). Comumente conhecido como peixe lutador siamês, ocorrem naturalmente em pequenos corpos de água doce na Tailândia e em torno do sudeste da Ásia (CIAMBRONE et al., 2019).

O *Betta splendens* é conhecido por suas formas domesticadas, apreciadas como um peixe ornamental originalmente criado para seu uso em jogos de azar, semelhantes as brigas de galo. Por meio da reprodução em cativeiro, uma ampla variedade de comportamentos e morfologias emergiram, incluindo variação na agressividade, pigmentação, tamanho do corpo e forma das nadadeiras, o que levou a um mercado lucrativo como peixe ornamental (ZHANG et al., 2021).

1.3 Substâncias aditivas na alimentação de peixes ornamentais

A Instrução Normativa nº 13 de 30 de novembro de 2004, regulamenta o uso de aditivos destinados à alimentação animal, podendo serem definidos como quaisquer substâncias ou microrganismos incorporados intencionalmente ao alimento, que afetem ou melhorem as propriedades da dieta ou dos produtos animais (BRASIL, 2004). A relevância do uso de aditivos dentro da aquicultura tem sido enfatizada, devido às suas vantagens em relação ao aumento da produtividade, redução da taxa de mortalidade, a melhora da imunidade e melhora da conversão alimentar (FILHO et al., 2020).

Um estudo realizado por Song et al. (2017) com *Symphysodon* spp. utilizando dietas acrescidas de astaxantina mostrou que ela, quando utilizada de forma dietética, pode melhorar efetivamente a pigmentação da pele dos animais em quatro semanas de uso, em concentrações de 200 mg kg⁻¹ de ração. Em outro estudo com astaxantina natural e sintética na dieta, mas em *P. fridmani*, ficou demonstrado que o tratamento mais eficaz foi com astaxantina natural na concentração de 100 ppm por 70 dias. Os autores demonstraram o efeito da relação combinada e interativa entre concentração e o tempo de suplementação na cor de *P. fridmani*, e como a astaxantina natural é mais eficaz em melhorar a cor dessa espécie de peixe ornamental (JIANG et al., 2019).

Em outro estudo, utilizou-se oleorresinas, páprica, cúrcuma, clorofila e suas combinações, na alimentação de *A. ocellaris* por 60 dias, com concentrações de 20 mg kg⁻¹, buscando avaliar seus efeitos na intensidade da cor da pele, níveis de carotenóides, desempenho de crescimento e atividades de enzimas digestivas na espécie. A intensidade de cor na pele quanto aos tons de vermelho e amarelo, e os níveis de carotenóides totais foram demonstrados

com maior intensidade em peixes alimentados com páprica. Os peixes alimentados com a dieta contendo a combinação de oleorresina apresentaram peso corporal final, taxa de crescimento específico, % de ganho de peso e eficiência alimentar maiores em comparação com outros tratamentos. O conteúdo de carotenoides de corpo inteiro foi maior nos grupos a combinação de oleorresina e páprica (EBENEEZAR et al., 2020).

1.4 Urucum

A *Bixa orellana* L (Urucuzeiro) é uma planta, natural da América Tropical. As sementes de urucum apresentam em sua superfície uma camada denominada de pericarpo, que possui várias substâncias contendo celuloses (40 a 45 %), proteínas (13 a 16 %), açúcares (3,5 a 5,2%), óleo fixo (3 %), óleos essenciais (0,3 a 0,9 %), betacaroteno, e outros carotenoides (4,5 a 5,5%) sendo a bixina e a norbixina os mais abundantes (OLIVEIRAS et al., 2021).

O urucum possui importantes compostos bioativos, oriundos de seu metabolismo, como compostos fenólicos e carotenoides, que por vezes estão envolvidos com propriedades funcionais, como atividade antioxidante, responsável pela proteção à oxidação celular (MOREIRA et al., 2014). Neste contexto, Fries et al. (2014) em estudos realizado com *Carassius auratus*, constataram que a inclusão de farelo de urucum na dieta destes animais mostrou ser um bom promotor no desempenho produtivo dos peixes.

1.5 Coloração dos peixes e a influência dos carotenoides na pigmentação

Para espécies ornamentais, o valor final agregado e sua qualidade são fatores determinados por diversos aspectos, sendo a coloração a mais importante. A pigmentação da pele é uma característica fundamental em peixes, que acentua o valor e demanda no comércio desses indivíduos (EBENEEZAR et al., 2020).

No entanto, a variedade e a complexidade dos padrões de pigmentos são extremamente enigmáticas em peixes, pois possuem até seis tipos diferentes de cromatóforos com pigmentos de identidades químicas diferentes (KOTTLER et al., 2015; CAL et al., 2017).

Entre as diferentes cores dos peixes, a mais explorada na aquicultura é a vermelha e suas variações, que vão para laranja ou amarelo. Para organismos pigmentados aquáticos, a cor da pele é uma característica atraente no mercado, o que estimula seu consumo, onde os indivíduos de cor avermelhada, adquirida principalmente pela presença de astaxantina (um carotenóide não sintetizado por esses animais), possuem maior valor comercial. Desta forma, a astaxantina tem sido incluída nas dietas destes animais nos sistemas de aquicultura (COSTA & MIRANDA-FILHO, 2020).

A astaxantina, o principal carotenoide utilizado na aquicultura, tem a maior atividade antioxidante entre os carotenoides naturais, possuindo um potencial para quelação de radicais livres, maior do que o da vitamina E (MIKI 1991). Além disso, inibe a peroxidação lipídica mitocondrial e contribui para a estabilidade da membrana celular (GOTO et al., 2001).

Em peixes, os carotenoides no tegumento são usados principalmente para camuflagem, sinalização e coloração (DE CARVALHO et al., 2017). Uma vez que os peixes não podem sintetizar carotenoides, a intensidade da coloração do tegumento depende da quantidade e do fornecimento de carotenoides dietéticos, bem como do tipo fornecido (KALINOWSKI et al., 2005). Por outro lado, a falta de carotenoides resulta em animais de cor opaca (LIM et al., 2018). Isso é importante, particularmente para espécies de peixes ornamentais, onde a coloração no tegumento tem um efeito significativo no preço de mercado e peixes mais brilhantes são percebidos como de maior qualidade, o que aumenta a aceitabilidade do consumidor (KAUR & SHAH, 2017; COSTA & MIRANDA-FILHO, 2020).

1.6 Influência da temperatura sobre o metabolismo dos peixes

Dentre os fatores ambientais de grande influência sobre o metabolismo dos peixes destaca-se a temperatura (ZENI & OSTRENSKY, 2016, DE OLIVEIRA et al., 2017). Uma vez que, essa pode ser utilizada para determinar a temperatura ideal de uma espécie por meio de indicadores bioquímicos, de estresse e metabólicos. Deste modo, uma maneira de analisar os impactos que a temperatura tem sobre o metabolismo dos peixes é utilizar as técnicas de alocação de energia celular (CEA) e a taxa de consumo de oxigênio (OCR) (WEN et al., 2017)

Outros métodos de classificar os efeitos da temperatura sobre o metabolismo dos peixes é através de análises de metabólitos como, ácidos graxos livres, cortisol, glicogênio, glicose, hematócrito, hemoglobina, lactato e triacilgliceróis. Também podem ser utilizadas enzimas como, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina hepática e aspartato aminotransferase, para avaliar o metabolismo em peixes. Wen et al. (2017) demonstraram em seu estudo, com *Symphysodon aequifasciatus*, que quando expostos a três diferentes temperaturas (20, 24 e 28°C), houve aumento destas enzimas nas temperaturas mais baixas de forma proporcional.

He et al. (2015) avaliaram os efeitos da baixa temperatura (13°C) em juvenis de *Oreochromis niloticus*, e observaram aumento da atividade das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase, glutathione e catalase no fígado e aumento do malondialdeído em razão da oxidação dos ácidos graxos ocasionando danos oxidativos, demonstrando o efeito da baixa temperatura sobre a resposta antioxidante e oxidativa dos peixes.

1.7 Estudo do comportamento em peixes

O estudo do comportamento animal trata-se do acompanhamento e descrição das atividades que regulam a existência dos organismos (DEL-CLARO,2004). Respostas comportamentais podem ser adotadas como medida compensatória aos estressores ambientais, sendo capaz de ser utilizadas como ferramentas avaliativas de qualidade ambiental (WOLFF & DONATTI.,2016). Levando em consideração que o estudo do comportamento animal pode ser uma técnica crucial para a aquicultura (MARTINS et al., 2011). Espécies de peixes de pequeno porte são pouco estudadas devido à complexidade de coleta de material biológico (DEBOLETO et al., 2020) para as análises comumente utilizadas para detecção de bem-estar e estresse (DA SILVA et al. 2018).

Wolff & Donatti (2016), utilizaram o mecanismo do estudo do comportamento para descrever e comparar os padrões comportamentais do *Phalloceros harpagos*, submetido a um experimento de acidificação artificial. Zhang, et al., (2021) em estudos com juvenis de *Sebastes schlegelii*, analisou e determinou como o tipo e a quantidade de enriquecimento afetaram a resposta ao estresse dos animais, utilizando a taxa de batimento opercular como um indicador comportamental para avaliar a resposta comportamental ao estresse. Brandão et al., (2018), em seus estudos com *Cichlasoma paranaense* avaliaram a influência do aumento e da diminuição da temperatura sobre o comportamento agressivo, tendo, a atividade de natação e interações agressivas em peixes isolados como ferramentas para analisadas dos comportamentos dos peixes.

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos de diferentes níveis de inclusão de extrato oleoso de urucum na alimentação de *Bettas splendens*, como promotor de bem-estar.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da inclusão de extrato oleoso de urucum no desempenho zootécnico de fêmeas vermelhas de *Betta splendens*;
- Avaliar os efeitos do extrato oleoso de urucum sobre coloração de fêmeas vermelhas de *Betta splendens*;
- Analisar a atividade enzimática de fêmeas vermelhas de *Betta splendens* submetidos a dietas com extrato oleoso de urucum;
- Avaliar o comportamento hepático a nível histológico, dos efeitos do extrato oleoso de urucum em fêmeas vermelhas de *Betta splendens*;

-Analisar o comportamento e atividade antioxidante de fêmeas vermelhas *Betta splendens* submetidos ao protocolo alimentar, com dietas acrescidas de extrato oleoso de urucum, quanto ao estresse por temperatura;

3. REFERÊNCIAS

- BARRETO, L.M. Aquicultura ornamental de água doce – Parte I. **Aquicultura Brasil**, v.8, p.14 – 18, 2017.
- BATISTA, Â.G., LENQUISTE, S.A., CAZARIN, C.B.B., DA SILVA, J.K., LUIZ FERREIRA, A., BOGUSZ JR, S., MARÓSTICA JR, M.R. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, 6,450-461, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A Instrução Normativa nº 13 de 30 de novembro de 2004**. Dispõe do regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Brasília: MAPA; 2004
- BRANDÃO, M. L., COLOGNESI, G., BOLOGNESI, M. C., COSTA-FERREIRA, R. S., CARVALHO, T. B., GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Water temperature affects aggressive interactions in a Neotropical cichlid fish. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, 2018.
- CAL, L., SUAREZ-BREGUA, P., CERDÁ-REVERTER, J.M., BRAASCH, I., ROTLLANT, J. Fish pigmentation and the melanocortin system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 211, p. 26-33, 2017.
- CIAMBRONE, C., CHEN, L.R., TOKARZ, D. A., LEWBART, G. A. Chromatophoroma in a Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Veterinary Record Case Reports**, v. 7, n. 2, p. e000840, 2019.
- CLOTFELTER, E.D.; ARDIA, D.R.; MCGRAW, K.J. Red fish, blue fish: trade-offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. **Behavioral Ecology**, v.18, p.1139-1145, 2007.
- DANTAS FILHO, J.V., CAVALI, J., NÓBREGA, B.A., PORTO, M.O. Benefícios da adição da virginiamicina ao desenvolvimento de peixes de cultivo e ao meio ambiente: uma revisão. **Revista Ciência e Saúde Animal**, v. 2, n. 1, 2020.
- DE CARVALHO, C.C.R; CARAMUJO, M.J. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 93, 2017.
- DE OLIVEIRA, M.W.M., SALOMÃO, R.A.S., DE SOUZA SANTOS, R., DE PAULA, T.G., SILVA, M.D.P., MARECO, E. A. Influence of temperature and exercise on growth performance, muscle, and adipose tissue in pacus (*Piaractus mesopotamicus*). **Journal of thermal biology**, v. 69, p. 221-227, 2017.
- DEL-CLARO, K. Comportamento Animal. **Uma introdução à Ecologia Comportamental**. Jundiaí: Livraria Conceito, 2004. 132p
- DORCE, L.S., MENDONÇA, W.C.B., SIQUEIRA, M.S., SANTOS, R.F.B., SOUSA, R.M., ZIEMNICZAK, H.M., HONORATO, C.A.H. Atividade das enzimas digestivas frente a restrição alimentar de peixes ornamentais. **Agrarian**, v. 13, n. 47, p. 107-113, 2020.

EBENEZZAR, S., PRABU, D.L., CHANDRASEKAR, S., TEJPAL, C.S., MADHU, K., SAYOOJ, P., VIJAYAGOPAL, P. 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.

FARIA, G.S., JARDIM, F.B.B., SILVA, A., COSTA, L.L., ABDALLA, D.R. Caracterização química da casca de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*) liofilizada e sua aplicação em leite fermentado potencialmente simbiótico. **Jornal de Ciências Biomédicas e Saúde**, v. 2, n.1, p. 02-09, 2016.

FRIES, E.M.; BITTARELLO, A.C.; ZAMINHAN, M.; SIGNOR, A.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W.R. Urucum em dietas para alevinos de kinguios *Carassius auratus*: desempenho produtivo e pigmentação da pele. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3401-3414, 2014.

GOMES, V.D.S.; AMÂNCIO, A.L.L.; CAVALCANTI, C.R.; BATISTA, J.M.M. Análise das características corporais do peixe *Betta splendens*. **Visão Acadêmica**, v. 20, n. 3, p. 29 – 38, 2019.

GOMES, V.D.S, CAVALCANTI, C.R, BATISTA, J.M.M, DE ALMEIDA, J.L.S, DE ARAÚJO SANTOS, F.G, JORDÃO FILHO, Uso de aditivos alimentares para peixes ornamentais. **Revista Científica Rural**, v. 23, n.1, p. 266-279, 2021.

GOTO, S., KOGURE, K., ABE, K., KIMATA, Y., KITAHAMA, K., YAMASHITA, E., 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 et biophysica acta (BBA)-biomembranes**, v. 1512, n. 2, p. 251-258, 2001.

JIANG, J., NUEZ-ORTIN, W., ANGELL, A., ZENG, C., DE NYS, R., VUCKO, M. J. Enhancing the colouration of the marine ornamental fish *Pseudochromis fridmani* using natural and synthetic sources of astaxanthin. **Algal Research**, v. 42, p. 101596, 2019.

HE, J., QIANG, J., YANG, H., XU, P., ZHU, Z. X., YANG, R. Q. Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress. **Journal of thermal biology**, v. 53, p. 90-97, 2015.

KALINOWSKI, C. T., ROBAINA, L. E., FERNANDEZ-PALACIOS, H., SCHUCHARDT, D., IZQUIERDO, M. S. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. **Aquaculture**, v. 244, n. 1-4, p. 223-231, 2005.

KAUR, RAJINDER; SHAH, TARANG KUMAR. Role of feed additives in pigmentation of ornamental fishes. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 5, n. 2, p. 684-686, 2017.

KOTTLER, V.A.; KÜNSTNER, A.X.E.L; SCHARTL, M. Pheomelanin in fish? **Pigment cell & melanoma research**, v. 28, n. 3, p. 355-356, 2015.

LIM, K.C., YUSOFF, F.M., SHARIFF, M., KAMARUDIN, M.S. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. **Rev Aquac** 10: 738–773. 2018.

MIKI, WATARU. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and applied chemistry**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.

MOREIRA, V.S., REBOUÇAS, T.N.H., DE MORAES, M.O.B., SÃO JOSÉ, A.R., DA SILVA, M. Atividade antioxidante de urucum (*Bixa orellana* L.) IN natura e encapsulado. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 15, n. 2, p. 201-209, 2014.

OLIVEIRAS, H.S., RIBEIRO, A.G., DA SILVA, D.A., MACAMBIRA, G.M., DOS SANTOS, A.C.F., DE SOUSA RODRIGUES, M.R., FERREIRA, M.L.S. Caracterização e utilização do carotenoide bixina, extrato da semente do urucum (*Bixa Orellana* L.) como agente pigmentante nas dietas de animais não-ruminantes. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 64481-64494, 2021.

PANIJPAN, B; SRIWATTANAROTHAI, N; LAOSINCHAI, P. Wild *Betta fighting* fish species in Thailand and other Southeast Asian countries. **ScienceAsia**, v. 46, n. 4, p. 382-391, 2020.

PEREIRA DA COSTA, D; MIRANDA-FILHO, K.C. The use of carotenoid pigments as food additives for aquatic organisms and their functional roles. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1567-1578, 2020.

SANTOS, E.L, OLIVEIRA, W.D.S, LIMA, M.R, SILVA, L.L.A, OLIVEIRA, J.M, SILVA, T.J, SOARES, E.C. Folha de amendoeira como aditivo em dietas para *Betta splendens*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p.233-242, 2020.

SONG, X., WANG, L., LI, X., CHEN, Z., LIANG, G., LENG, X. Dietary astaxanthin improved the body pigmentation and antioxidant function, but not the growth of discus fish (*Symphysodon* spp.). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1359-1367, 2017

SUN, M.; YANG, X.; XIE, Y. Deep learning in aquaculture: A review. **J. Comput**, v. 31, p. 294-319, 2020.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extdietae determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p. 310- 313, 2001.

VALENTI, W.C., BARROS, H.P., MORAES-VALENTI, P., BUENO, G.W., CAVALLI, R.O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, 2021.

WEN, B.; JIN, S.R.; CHEN, Z.Z.; GAO, J.Z.; WANG, L.; LIU, Y.; LIU, H.P. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, v. 481, p. 169-176, 2017.

WOLFF, LUCIANO LAZZARINI; DONATTI, LUCÉLIA. Estudo do comportamento do peixe de água doce *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) submetido à alteração artificial do pH. **LUMINÁRIA**, v. 18, n. 01, 2016.

ZENI, T.O.; OSTRENSKY, A. Respostas adaptativas de peixes a alterações ambientais de temperatura e de oxigênio dissolvido. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 3, 2016.

ZHANG, W., WANG, H., BRANDT, D.Y.C., HU, B., SHENG, J., WANG, M., HONG, Y. The genetic architecture of phenotypic diversity in the betta fish (*Betta splendens*). **bioRxiv**, 2021.

ZHANG, Z., FU, Y., GUO, H., ZHANG, X. Effect of environmental enrichment on the stress response of juvenile black rockfish *Sebastes schlegelii*. **Aquaculture**, v. 533, p. 736088, 2021.

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.

CAPÍTULO II

RESUMO

DORCE, Larissa Selini, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, março de 2022. **Resposta de comportamento de fêmeas vermelhas de *Betta splendens* a temperaturas reduzidas.** Orientadora: Claucia Aparecida Honorato; Coorientador: **Klaus Casaro Saturnino.**

Resumo: O estudo do comportamento animal pode ser uma ferramenta crucial para a aquicultura. Mudanças são os primeiros indicadores de alterações em fatores externos e internos. Alterações na temperatura podem modificar o consumo alimentar, a taxa de transporte de oxigênio, a regulação iônica e o equilíbrio ácido-base, provocar a depressão do sistema imunológico e, conseqüentemente, a diminuição da sobrevivência. Diante desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento e sobrevivência de fêmeas vermelhas de *Betta splendens* submetidas a diminuição de temperatura ambiente. Espécimes de *Betta splendens* fêmea ($n = 72$, $P = 0,983 \pm 0,058g$, $CT = 3,909 \pm 0,268cm$), foram aleatoriamente divididos em 24 aquários (5L) e aclimatados a 26°C. A partir daí, a temperatura foi gradualmente diminuída em aproximadamente 2°C/h pela adição de gelo, até atingirem as temperaturas de 16, 14, 12 e 10 °C, com os animais em jejum. Quando atingiam a respectiva temperatura, os peixes eram mantidos na mesma por 12h. Os respectivos comportamentos foram registrados a cada hora, quando a temperatura de manutenção fria era atingida, durante 12 horas. Não foi observada mortalidade durante o ensaio experimental. Os parâmetros físicos e químicos durante o experimento foram: pH: $6,96 \pm 0,51$; oxigênio dissolvido: $5,2 mg.L^{-1} \pm 1,93$, sem diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,1$). Mordidas e perseguições foram mais observadas nas temperaturas de 14 e 16 °C. Nas temperaturas de 10 e 12 °C observou-se comportamento errático de natação entre os peixes. Os maiores batimentos operculares foram observados para peixes submetidos a temperatura de 12°C e foram diminuindo até a temperatura de 16°C. Desta forma, foi possível demonstrar que a diminuição de temperatura se apresentou como um modulador de comportamento para as fêmeas de *Betta splendens*. Além disso, nas condições estipuladas, os espécimes apresentaram-se capazes de sobreviver, demonstrando sua resistência sob tais condições.

Palavras chaves: Aquicultura; Bem-estar; Estresse; Fisiologia; Ornamental.

ABSTRACT

DORCE, Larissa Selini, Federal University of Grande Dourados, Dourados MS, march 2022.

Behavior response of red *Betta splendens* females at reduced temperatures Advisor:

Claucia Aparecida Honorato; Co-Advisor: Klaus Casaro Saturnino

Abstract: The study of animal behavior can be a crucial tool for aquaculture. Changes are the first indicators of changes in external and internal factors. Changes in temperature can modify food consumption, oxygen transport rate, ionic regulation and acid-base balance, causing depression of the immune system and, consequently, decreased survival. Based on the above, the objective of this study was to evaluate the behavior and survival of red female *Betta splendens* submitted to a decrease in ambient temperature. Female *Betta splendens* specimens ($n = 72$, $P = 0.983 \pm 0.058g$, $CT = 3.909 \pm 0.268cm$), were randomly divided into 24 aquariums (5L) and acclimated to 26°C. Thereafter, the temperature was gradually reduced by

approximately 2°C/h by the addition of ice, until reaching temperatures of 16, 14, 12 and 10°C, with the animals fasting. When they reached the respective temperature, the fish were kept at the same temperature for 12 h. The respective behaviors were recorded every hour, when the cold keeping temperature was reached, for 12 hours. No mortality was observed during the experimental trial. The physicochemical parameters during the experiment were: pH: 6.96 ± 0.51 ; dissolved oxygen: $5.2 \text{mg.L}^{-1} \pm 1.93$, with no significant difference between treatments ($P > 0.1$). Bites and chases were more frequently observed at temperatures of 14 and 16 °C. At temperatures of 10 and 12 °C, erratic swimming behavior was observed among the fish. The highest opercular beats were observed for fish submitted to a temperature of 12°C and decreased until a temperature of 16°C. In this way, it was possible to demonstrate that the decrease in temperature was presented as a modulator of behavior for females of *Betta splendens*. In addition, under the stipulated conditions, the specimens were able to survive, demonstrating their resistance under such conditions.

Keywords: Aquaculture; Ornamental; Physiology; Stress; Welfare

4. INTRODUÇÃO

O estudo do comportamento animal pode ser uma ferramenta crucial para a aquicultura (MARTINS et al., 2011). Espécies de peixes de pequeno porte são pouco estudadas devido à dificuldade de coleta de material biológico (DEBOLETO et al., 2020) para as análises comumente utilizadas para detecção de bem-estar e estresse (DA SILVA et al. 2018).

Mudanças no comportamento animal são os primeiros indicadores de mudanças em fatores externos e internos (BERLINGHIERI et al. 2021). Estressores agudos e crônicos na aquicultura causam mudanças no comportamento do indivíduo e no grupo (WOLFF & DONATTI 2016), sendo o comportamento de natação um indicativo de bem estar dos peixes (MARTINS et al. 2011).

Destaca-se que variações de temperatura é um fator que modifica o consumo alimentar (WEN et al. 2017), alterações na taxa de transporte de oxigênio, na regulação iônica e equilíbrio ácidos-base (WOLFF & DONATTI 2016), além da depressão do sistema imunológico e, conseqüentemente, a diminuição da sobrevivência (JIN et al. 2021). Para manutenção da homeostasia dos peixes é requerido o controle de temperatura que resulta no aumento de custos operacionais. Portanto, a identificação de alterações comportamentais associadas à temperatura, pode ser uma eficiente ferramenta para estudos de adaptações metabólicas dos peixes ornamentais (JIN et al. 2021).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento e sobrevivência de fêmeas vermelhas de *Betta splendens* submetidas à diminuição gradativa de temperatura e manutenção fria por 12 h.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais de cuidado animal foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFGD (CEUA, Protocolo 03/2019).

Espécimes de fêmeas de *Betta splendens* ($n=72$, $P=0,983\pm 0,058g$, $CT=3,909\pm 0,268cm$) foram obtidos de criatório comercial, todas procedentes da mesma desova. Os animais foram aleatoriamente divididos em 24 aquários (5L) e aclimatados a 26°C por 48 horas, sendo alimentados até a saciedade com dieta comercial.

Após a aclimação, os grupos experimentais foram submetidos a diminuição progressiva da temperatura e manutenção ao frio (Figura 1), com base em estudo realizado por JIN et al. (2021), modificado. A água dos aquários foi resfriada pela adição de gelo de modo que a taxa de diminuição fosse de aproximadamente 2°C/h, até atingirem as temperaturas de 16, 14, 12 e 10 °C, respectivamente, com os animais em jejum. A partir da estabilização de cada

grupo experimental, estes foram mantidos com as respectivas temperaturas por um período de 12 horas, período este denominado de manutenção fria.

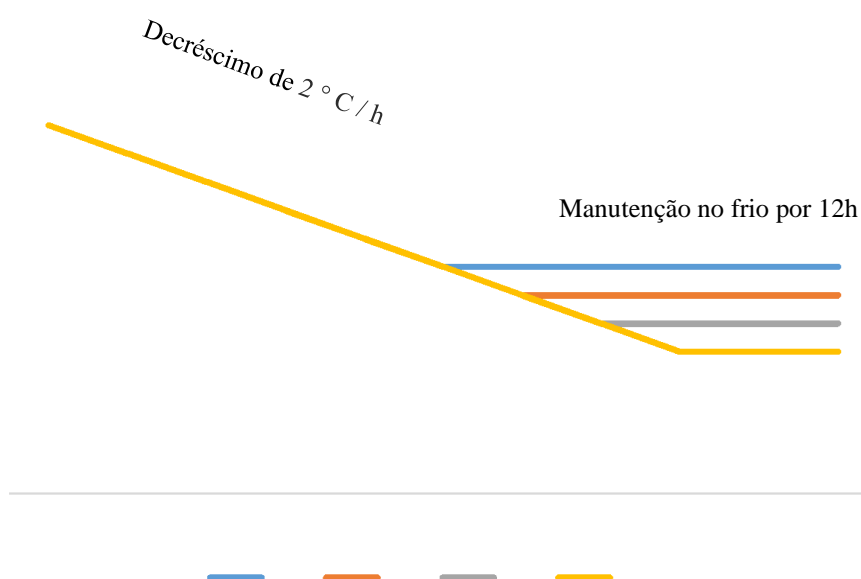


Figura 1 – Gráfico demonstrando a metodologia empregada no acompanhamento de *Betta splendens* submetidos a queda de temperatura e manutenção fria por 12 horas.

O comportamento dos peixes foi registrado quando atingiram a temperatura de manutenção do frio a cada hora por um período de 12 horas (Tabela 1), com registro de alterações quanto a observação de lesões provocadas por mordidas, taxa de movimentação opercular, natação errática e perseguição. As alterações observadas foram classificadas quanto à gravidade, sendo (*) para animais sem alteração comportamental, (+) alteração comportamental leve, (++) alteração comportamental moderada e (+++) para alteração comportamental grave (VANDERZWALMEN et al. 2020). Não foram observadas mortes durante o período experimental. Os parâmetros físico químicos da água durante os tratamentos foram: pH: $6,96 \pm 0,51$; oxigênio dissolvido: $5,2\text{mg.L}^{-1} \pm 1,93$; sem diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,1$). A diminuição de temperatura é um modulador de comportamento de fêmeas de *Betta splendens*. avaliando o comportamento e sobrevivência de fêmeas vermelhas de *Betta splendens* submetidas a diminuição de temperatura ambiente não objetivamos mortalidade em nenhuma das temperaturas.

Tabela 1 – Etograma avaliados em fêmeas de *Betta splendens* submetidas a diminuição progressiva e manutenção da temperatura.

Comportamento	Apresentação
Equilíbrio	Perda parcial ou total do equilíbrio do indivíduo.
Letargia	Incapacidade de reagir e de expressar movimentação.
Mordidas	A ocorrência de indivíduos mordendo uns aos outros.
Natação errática	A ocorrência de natação rápida e mudança de direção, irregularidades.
Taxa de ventilação opercular	Medida pela contagem visual de 20 movimentos operculares ou bucais sucessivos, medindo o tempo decorrido e, a seguir, calculando a frequência por minuto. (baseado em ALVARENGA & VOLPATO, 1995)
Perseguição	A ocorrência de indivíduos perseguindo uns aos outros

6. RESULTADOS

A ocorrência de mordidas e perseguição realizadas no grupo de fêmea de *Betta splendens* submetidas a temperaturas de 14 e 16 °C foram maiores que as observadas nas temperaturas mais baixas. Nas temperaturas de 10 e 12 °C observou-se comportamento errático de natação, perda de equilíbrio e letargia entre os peixes (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação das alterações comportamentais observadas em fêmeas de *Betta splendens* submetidas a estresse por diminuição gradativa da temperatura e manutenção por período de 12 horas.

Alterações comportamentais	Temperatura °C			
	10	12	14	16h
Equilíbrio	+++	++	*	*
Letargia	+++	+	*	*
Mordidas	+	+	+++	++
Natação errática	+++	+++	+	*
Perseguição	+	+	+++	+++

(*) sem sinal clínico, (+) sinal clínico leve, (++) sinal clínico moderado, (+++) sinal clínico grave

Os maiores batimentos operculares foram observados para peixes submetidos a temperatura de 12°C e foram diminuindo até a temperatura de 16°C. Os peixes submetidos a temperatura mais baixa apresentaram os menores valores de batimentos opercular (Figura 2).

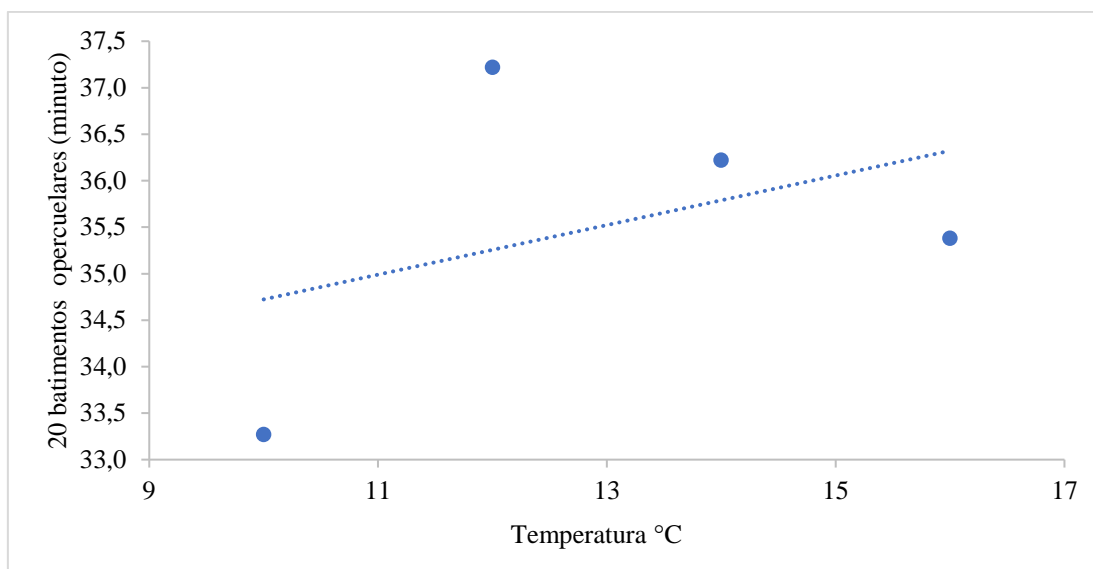


Figura 2 – Representação de modelo estatístico quanto aos batimentos operculares de betas de acordo com a variação de temperatura.

7. DISCUSSÃO

A variação comportamental é uma medida de bem-estar comum, uma vez que, o desvio de comportamentos naturais pode indicar um aumento no estresse, agressão e medo (HUNTINGFORD et al. 2006)

Quando indivíduos são submetidos a alguma reação estressora como o frio nota-se a variação de alguns comportamentos (HU et al. 2016), assim como as fêmeas de *Betta splendens* apresentaram comportamentos alterados de perseguição e mordidas quando submetidas às temperaturas de 14 e 16°C, em comparação com as demais, podendo estar relacionada a ação de hormônios sobre o sistema nervoso central, como a serotonina (BACKSTROM & WINBERG, 2017). Os peixes experimentam estresse pelo frio quando a temperatura da água diminui para seu limite inferior de acordo com a espécie. O estresse pelo frio resulta em uma cascata de respostas fisiológicas e comportamentais, desde a secreção de hormônios e neurotransmissores que agem sobre o sistema nervoso central, até a atividade locomotora, exercida pelos músculos (HU et al. 2016). A ocorrência de perda de equilíbrio, letargia dos animais e movimento natatório errático, são geralmente reduzidos em baixas temperaturas, podendo aumentar para um pico em uma temperatura ideal e, em seguida, diminuir quando a temperatura se aproxima do limite térmico superior (KOUMOUNDOUROS et al. 2002).

Em relação à taxa de ventilação opercular, os maiores níveis de batimento opercular foram observados em temperatura de 12°C, quando comparados com as demais temperaturas, pois a frequência de ventilação é uma medida fácil de avaliar o metabolismo e, indiretamente os efeitos fisiológicos (WU et al. 2021). As mudanças nos ritmos de ventilações branquiais e

metabólicos respiratórios são indicativos de alterações nas condições ambientais ou estados fisiológicos, mostrando a atividade, aclimatação e nível de estresse dos peixes (KAMMERER et al., 2010). Os aumentos na frequência de ventilação branquial nos animais quando estressados indicam que os peixes precisam aumentar o consumo de oxigênio para equilibrar a taxa metabólica (MILLIDINE et al. 2008). Aumentos na taxa de consumo de oxigênio e na frequência de ventilação são induzidos pelo cortisol quando o peixe enfrenta perigo (KAMMERER et al., 2010; WU et al.,2021)

8. CONCLUSÃO

A diminuição de temperatura é um modulador de comportamento de fêmeas de *Betta splendens*. avaliando o comportamento e sobrevivência de fêmeas vermelhas de *Betta splendens* submetidas a diminuição de temperatura ambiente, assim não obteve mortalidade em nenhuma das temperaturas.

9. REFERENCIAS

- ALVARENGA, C.M.D; VOLPATO, G.L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiology & Behavior**, v. 57, n. 1, p. 75-80, 1995.
- BACKSTRÖM, T; WINBERG, S. Serotonin coordinates responses to social stress-What we can learn from fish. **Frontiers in neuroscience**, v. 11, p. 595, 2017.
- BERLINGHIERI, F., PANIZZON, P., PENRY-WILLIAMS, I.L., BROWN, C. Laterality and fish welfare-A review. **Applied Animal Behaviour Science**, p. 105239, 2021.
- DA SILVA, F.F., JACOBSEN, C., KJØRSVIK, E., STØTTRUP, J.G., TOMKIEWICZ, J. Oocyte and egg quality indicators in European eel: Lipid droplet coalescence and fatty acid composition. **Aquaculture**, v.496, p.30-38, 2018
- DEBOLETO S.G.C; SANTOS R.F.B; SOUZA R.M; HONORATO, C. Tolerância crônica de betas (*Betta splendens*) machos a água acrescidas de sal. **Rev Científica Rural**, v.22, p.251–258, 2020.
- HU, P.; LIU, M.; LIU, Y.; WANG, J.; ZHANG, D.; NIU, H. CHEN, L. Transcriptome comparison reveals a genetic network regulating the lower temperature limit in fish. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.
- HUNTINGFORD, F.A. Fish Behaviour: Determinants and Implications for Welfare. In: **The Welfare of Fish**. Springer, Cham, 2020. p. 73-110.
- JIN, S.R., WANG, L., LI, X.X., WEN, B., GAO, J.Z., CHEN, Z.Z. Integrating antioxidant responses and oxidative stress of ornamental discus (*Symphysodon spp.*) to decreased temperatures: Evidence for species-specific thermal resistance. **Aquaculture**, v. 535, p. 736375, 2021.
- KAMMERER, B.D; CECH, J.J; KÜLTZ, D. Mudanças rápidas no cortisol plasmático, osmolalidade e respiração em resposta ao estresse salino em tilápia (*Oreochromis mossambicus*). **Bioquímica e Fisiologia Comparativa Parte A: Fisiologia Molecular e Integrativa**, v. 157, n.3, pág.260-265, 2010.
- KOUMOUNDOUROS, G.; SFAKIANAKIS, D. G.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 4, p. 923-932, 2002.
- MARTINS, C.I.; SILVA, P.I.; CONCEIÇÃO, L.E.; COSTAS, B.; HÖGLUND, E.; ØVERLI, Ø.; SCHRAMA, J.W. Linking fearfulness and coping styles in fish. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 28084, 2011.
- MIEDEMA, H.M.; COCKRAM, M. S.; DWYER, C. M.; MACRAE, A. I. Behavioural predictors of the start of normal and dystocic calving in dairy cows and heifers. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 132, n. 1-2, p. 14-19, 2011.
- MILLIDINE, K.J.; METCALFE, N.B.; ARMSTRONG, J.D. The use of ventilation frequency as an accurate indicator of metabolic rate in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 65, n. 10, p. 2081-2087, 2008.

VANDERZWALMEN, M.; EDMONDS, E.; CAREY, P.; SNELLGROVE, D.; SLOMAN, K.A. Effect of a water conditioner on ornamental fish behaviour during commercial transport. **Aquaculture**, v. 514, p. 734486, 2020.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; GAO, J.Z.; WANG, L.; LIU, Y. LIU, H.P. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, v. 481, p. 169-176, 2017.

WOLFF, L.L; DONATTI, L. Estudo do comportamento do peixe de água doce *Phalloceros harpagos* (*Cyprinodontiformes: Poeciliidae*) submetido à alteração artificial do pH. **Luminária**, v. 18, n. 01, 2016.

WU, S. M., CHEN, J. R., CHANG, C. Y., TSENG, Y. J., PAN, B. S. Potential benefit of I-Tiao-Gung (*Glycine tomentella*) extract to enhance ornamental fish welfare during live transport. **Aquaculture**, v. 534, p. 736304, 2021.

CAPÍTULO III

RESUMO

DORCE, Larissa Selini, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, março de 2022. **Respostas antioxidantes em fêmea vermelhas *Betta splendens* a baixas temperaturas: Evidências do benefício da suplementação do urucum** Orientadora: Cláudia Aparecida Honorato; Coorientador: Klaus Casaro Saturnino.

Resumo: O *Betta splendens* possui grande valor comercial dentro da aquicultura, onde ocupa lugar de destaque na indústria pet. Em razão da sua procura, o *Betta splendens* é exportado há muito tempo para diferentes partes do mundo, onde a temperatura pode atingir níveis mais baixos, e espécies mais resistentes são preferidas devido aos custos de aquecimento de aquários. Essas mudanças de temperaturas, impõe incessantemente uma pressão seletiva em muitos organismos que resulta em plasticidade fenotípica, particularmente pela expressão de diferentes fenótipos adaptativos às variações nas condições ambientais. Em situações estressoras como a oscilações de temperaturas, as espécies reativas de oxigênio em excesso oxidam, danificam lipídios celulares, proteínas e DNA, levando a sua modificação, frequentemente a sua inutilização ou inibindo a sua função normal. Para evitar tais consequências, é importante garantir o controle da produção de radicais livres bem como assegurar níveis adequados de antioxidantes. Essas substâncias presentes na dieta, assumem grande importância como possíveis agentes protetores, reduzindo os danos oxidativos. O estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do uso de extrato oleoso de urucum na alimentação de fêmeas vermelhas de *Bettas splendens*, submetidas ao estresse de temperatura. Foram utilizados 150 juvenis (peso inicial $0,997 \pm 0,038$ g e comprimento total de $3,909 \pm 0,268$ cm), distribuídos aleatoriamente em 15 aquários (20L), em triplicata. Os peixes foram alimentados por 28 dias (4%PV) com as dietas: controle; 2; 4; 6 e 10 ml de extrato oleoso de urucum (EOU) kg^{-1} de dieta, com a finalidade de se obter as quantidades de 0,05; 0,1; 0,15 e 0,25% de Bixina/kg de inclusão extrato na dieta. Ao término dos 28 dias, todos os indivíduos foram submetidos à diminuição progressiva de temperatura e manutenção ao frio, passando então ao teste de recuperação, permanecendo durante seis horas em temperatura de 28°C , seguido de coletas para análises bioquímicas e histopatológicas. Os parâmetros físico químicos da água mantiveram-se com $\text{pH} = 6,80 \pm 0,16$ e oxigênio dissolvido $5,71 \pm 0,28$ mg/L. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao desempenho zootécnico dos animais ($P > 0,05$), assim como morte de animais. A utilização de dietas contendo bixina proveniente de extrato oleoso de urucum não alterou as funções digestivas e a coloração da pele dos peixes. A utilização de dietas com 0,15 mg de bixina. kg de dieta $^{-1}$ apresentaram os maiores valores de ALT e AST. As funções hepáticas foram consideradas normais por houve manutenção da albumina sem diferença estatística entre os tratamentos. Nas brânquias dos peixes foi observado maior atividade da SOD no grupo controle. A utilização de 2 e 10 ml de EOU nas dietas promove aumento da atividade de SOD na pele dos peixes submetidos a diminuição de temperatura. A utilização de 2 e 4 ml EOU resultou na diminuição da atividade de CAT na pele. Neste trabalho observou-se que a brânquia altera a atividade de SOD e CAT frente às variações impostas de temperatura. Altos níveis de EOU em dietas para fêmeas de beta promovem aumento da atividade de CAT branquial na recuperação da temperatura. A atividade da SOD mensurada na pele foi responsiva à presença de EOU, mas não alterou a atividade da CAT. Baseado nas condições em que foi realizado o experimento, recomenda-se uma dieta contendo 10 ml de adição de extrato oleoso de urucum para juvenis fêmeas de *Betta Splendens*, podendo ser um modulador das respostas das atividades metabólicas, promovendo adaptações ao manejo de temperatura.

Palavras-chaves: Bem-estar; Bixina; Dieta; Ornamental.

ABSTRACT

DORCE, Larissa Selini, Federal University of Grande Dourados, Dourados MS, march 2022.

Antioxidant responses in red female *Betta splendens* at low temperatures: Evidence of the benefit of urucum supplementation. Advisor: Claucia Aparecida Honorato; Co-Advisor: Klaus Casaro Saturnino

Abstract: *Betta splendens* has great commercial value within aquaculture, where it occupies a prominent place in the pet industry. Due to its demand, *Betta splendens* has long been exported to different parts of the world, where the temperature can reach lower levels, and more resistant species are preferred due to aquarium heating costs. These temperature changes incessantly impose a selective pressure on many organisms that results in phenotypic plasticity, particularly through the expression of different adaptive phenotypes to variations in environmental conditions. In stressful situations such as temperature fluctuations, excess reactive oxygen species oxidize, damage cellular lipids, proteins and DNA, leading to their modification, often rendering them useless or inhibiting their normal function. To avoid such consequences, it is important to control the production of free radicals as well as ensure adequate levels of antioxidants. These substances present in the diet assume great importance as possible protective agents, reducing oxidative damage. The study aims to evaluate the effects of the use of annatto oil extract in the diet of red female Bettas splendens, subjected to temperature stress. A total of 150 juveniles (initial weight 0.997 ± 0.038 g and total length of 3.909 ± 0.268 cm) were used, randomly distributed in 15 aquariums (20L), in triplicate. Fish were fed for 28 days (4% BW) with the following diets: control; two; 4; 6 and 10 ml of annatto oily extract (EOU) kg⁻¹ of diet, in order to obtain amounts of 0.05; 0.1; 0.15 and 0.25% Bixin/kg of extract inclusion in the diet. At the end of the 28 days, all individuals were submitted to a progressive decrease in temperature and cold maintenance, then passing the recovery test, remaining for six hours at a temperature of 28°C, followed by collections for biochemical and histopathological analyses. The physicochemical parameters of the water remained with pH = 6.80 ± 0.16 and dissolved oxygen 5.71 ± 0.28 mg/L. No significant differences were observed regarding the zootechnical performance of the animals ($P > 0.05$), as well as the death of animals. The use of diets containing bixin from annatto oil extract did not alter the digestive functions and the skin color of the fish. The use of diets with 0.15 mg of bixin.kg of diet⁻¹ showed the highest values of ALT and AST. Liver functions were considered normal as there was maintenance of albumin with no statistical difference between treatments. In the gills of fish, higher SOD activity was observed in the control group. The use of 2 and 10 ml of EOU in the diets promotes an increase in SOD activity in the skin of fish submitted to a decrease in temperature. The use of 2 and 4 ml EOU resulted in a decrease in CAT activity in the skin. In this work, it was observed that the gill changes the activity of SOD and CAT in the face of imposed variations in temperature. High levels of EOU in diets for beta females promote increased gill CAT activity in temperature recovery. The SOD activity measured in the skin was responsive to the presence of EOU, but did not change the CAT activity. Based on the conditions in which the experiment was carried out, a diet containing 10 ml of annatto oily extract is recommended for young female *Betta Splendens*, which may be a modulator of the responses of metabolic activities, promoting adaptations to temperature management.

Keywords: Bixin; Diet; Ornamental; Welfare.

10. INTRODUÇÃO

O peixe ornamental *Betta splendens* possui grande valor comercial dentro da aquicultura brasileira, onde ocupa lugar de destaque na indústria pet (GOMES et al., 2019). Esta espécie de peixe apresenta facilidade ao manejo e sua respiração aérea permite o seu cultivo em aquários sem oxigenação, além da diversificação de cores (PANIJPAN et al., 2020). Em razão da grande procura desse animal, o *Betta splendens* é exportado há muito tempo para diferentes partes do mundo, onde a temperatura pode atingir níveis mais baixos, e espécies mais resistentes são preferidas devido aos custos de aquecimento de aquários (WEN et al., 2017).

Peixes também podem enfrentar eventos frios em uma variedade de escalas de tempo, incluindo estresse agudo causado pela oscilação diária da temperatura e exposição crônica que pode durar de semanas a meses (STEVENS et al., 2016). Essas mudanças de temperaturas, impõem incessantemente uma pressão seletiva em muitos organismos que resulta em plasticidade fenotípica, particularmente pela expressão de diferentes fenótipos adaptativos às variações nas condições ambientais (RAHMAN et al., 2020).

Alterações no comportamento animal geralmente são os primeiros indicadores de oscilações de fatores externos ou internos (BERLINGHIERI et al, 2021). Consequentemente, as respostas comportamentais representam indicadores-chave do bem-estar dos peixes (MARTINS et al., 2012). A preocupação com o bem-estar dos peixes cresceu consideravelmente nos últimos anos, e tendo uma maior compreensão do comportamento dos peixes pode levar ao desenvolvimento de indicadores de bem-estar (BERLINGHIERI et al, 2021).

Em situações estressoras como a oscilações de temperaturas, as espécies reativas de oxigênio em excesso oxidam, danificam lipídios celulares, proteínas e DNA, levando a sua modificação, frequentemente a sua inutilização ou inibindo a sua função normal (VALKO et al., 2007). Para evitar tais consequências, é importante garantir o controle da produção de radicais livres bem como assegurar níveis adequados de antioxidantes. Essas substâncias presentes na dieta assumem grande importância como possíveis agentes protetores, reduzindo os danos oxidativos (FERREIRA; ABREU, 2007). Alguns produtos naturais com atividade protetora podem ser úteis no auxílio ao sistema protetor endógeno, podendo ser utilizados como nutracêuticos (ŠKERGET et al., 2005).

Há evidências que algumas plantas agem como hepatoprotetora (OTA et al., 2019) e também impedem a oxidação celular (GOMES et al., 2021). A suplementação alimentar em níveis adequados promove proteção contra o desequilíbrio do sistema redução-oxidação (redox) surgindo como potencial forma de manejo sustentável na aquicultura. A utilização de

substâncias naturais com altas concentrações de carotenoides tem efeito direto na função hepática de peixes (SONG et al. 2017, WANG et al. 2018, NUNES et al. 2019 COSTA & MIRANDA-FILHO et al.,2020). Estas plantas podem promover efeitos hipolipidêmico e hepatoprotetor, provavelmente em função de sua capacidade antioxidante, metabolismo lipoproteico no fígado e inibição da lipogênese (ABLIZ et al. 2013).

Sabe-se que o urucum possui compostos bioativos, oriundos de seu metabolismo, como compostos fenólicos e carotenoides, que apresentam importantes propriedades funcionais, como a atividade antioxidante, responsável pela proteção à oxidação celular (MOREIRA et al., 2014). O urucum é um pigmento natural extraído da superfície externa das sementes da árvore *Bixa orellana*, que cresce abundantemente nas regiões tropicais. É uma espécie de arbusto originário da América Central e da América do Sul (SANTOS; LOURENZANI; LOURENZANI, 2018). As sementes de urucum apresentam em sua superfície uma camada denominada de pericarpo, que possui várias substâncias contendo celuloses (40 a 45 %), proteínas (13 a 16 %), açúcares (3,5 a 5,2%), óleo fixo (3 %), óleos essenciais (0,3 a 0,9 %), betacaroteno, e outros carotenoides (4,5 a 5,5%) sendo a bixina e a norbixina os mais abundantes (OLIVEIRAS et al., 2021).

A cor vermelha presente na semente do urucum é resultado do corante bixina, do grupo dos carotenoides, que formam um dos grupos de pigmentos mais conhecidos na natureza (ROSSATO et al.,2021). Neste âmbito, alguns agentes pigmentantes, quando acrescentados em rações de animais, podem promover combate aos radicais livres, redução do estresse e aumento nas respostas imunológicas beneficiando o crescimento e auxiliando no bem-estar animal (SHINDO et al., 2007, FRIES et al., 2014). Portanto, pode ser empregado na alimentação como agente antioxidante promovendo respostas favoráveis contra estresse de manejo.

Este trabalho tem como objetivo verificar a concentração de extrato oleoso de urucum para mitigar os efeitos de estresse por baixa temperatura em juvenis de fêmeas *Betta splendens*.

11. MATERIAL E MÉTODOS

11.1 Caracterização da matéria-prima de Urucum

As sementes de urucum foram coletadas no Banco Comunitário de Sementes Crioulas Lucinda Moretti no município de Juti, situado no sul da região Centro-Oeste do Brasil, no Sudoeste de Mato Grosso do Sul (Microrregião de Dourados, 22°51'38" sul, 54°36'10" oeste). O extrato das sementes foi obtido pelo método adaptado de Rohde et al. (2006), onde para cada 20g de sementes de urucum foram adicionados 100ml de óleo vegetal, submetidos a agitação de 200 RPM e depois descanso durante 24 horas, seguido de filtração, secagem e obtenção da

pastas de bixina. A determinação da bixina foi realizada por espectrofotometria (TOCCHINI & MERCADANTE, 2001), os valores obtidos foram de norbixina, convertidos a bixina pelo fator: 1,037 (YABIKU & TAKAHASHI, 1991).

11.2 Dietas experimentais

Foi utilizada uma dieta comercial extrusada (Poytara[®]) para inclusão de 0,00 (controle); 2; 4; 6 e 10 ml de extrato oleoso de urucum (EOU) kg⁻¹ de dieta, com a finalidade de se obter as quantidades de 0,05; 0,1; 0,15 e 0,25% de Bixina. As dietas foram analisadas quanto aos seus teores de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas (A.O.A.C., 2000) (Tabela 3). As dietas foram examinadas quanto a estabilidade e flutuabilidade, a água foi utilizada para mensuração do pH, alcalinidade e condutividade elétrica.

Tabela 3- Caracterização e composição das dietas experimentais acrescidas de extrato oleoso de urucum.

	ml de extrato de urucum na dieta. dieta				
	Controle	2	4	6	10
Composição analisada (%)					
Matéria Seca	95,02±0,30	95,30±0,10	95,125±0,06	94,94±0,18	95,31±0,263
Proteína bruta	71,95±0,40	68,489±1,58	69,828±0,56	66,89±0,73	70,10±0,76
Extrato etéreo	6,675±0,35	7,771±1,63	8,015±0,65	9,44±0,24	10,06±0,78
Matéria Mineral	10,077±0,11	9,947±0,03	9,824±0,13	9,92±0,02	9,75±0,08
Composição (mg.kg⁻¹)					
Bixina (mg.kg ⁻¹)	-	0,05	0,10	0,15	0,25
Parâmetros de cor					
L	39,17±0,60	36,47±0,46	35,60±0,41	35,04±0,17	35,33±0,34
a*	16,22±0,07	17,89±0,04	18,02±0,38	19,11±0,22	19,05±0,26
b*	21,01±0,38	20,76±0,40	19,52±0,54	18,60±0,28	17,68±0,24
Comportamento da dieta experimental (%)					
Estabilidade	99,02±0,03	98,90±0,05	99,07±0,04	98,09±0,09	99,17±0,19
Flutuabilidade	89,91±5,73	93,52±5,71	94,84± 3,86	92,45±4,11	96,66±2,05
Caracterização da água após 15 minutos contendo as dietas					
pH	7,06±0,047	7,13±0,48	7,26±0,12	7,03±0,15	7,14±0,66
Alcalinidade (mg/L)	6,00±0,00	6,00±0,00	6,33±0,47	6,67±0,47	6,45±0,89
Condutividade elétrica (µScm ⁻¹)	157,33±1,24	158,00±5,71	160,03±2,94	161,67±3,09	155,98±5,89

Composição das dietas experimentais acrescidas de extrato oleoso de urucum em diferentes níveis de inclusão na dieta de fêmeas de *Betta splendens*. Análise de luminosidade das dietas foram aferidos por meio de sistema de coordenadas de Hunter L*, a*, b*. Análise do comportamento das dietas em água, e caracterização da água onde as dietas foram submetidas ao teste de comportamento em água.

11.3 Animais e condições experimentais.

Alimentação com extrato de urucum: O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal da Grande Dourados, durante 28 dias. (CEUA/UFGD, Protocolo 03/2019). Foram utilizados 150 juvenis de fêmeas *Betta splendens* ($0,997 \pm 0,038$ g e comprimento total $3,909 \pm 0,268$ cm), distribuídos em 15 aquários (20 L). O sistema foi submetido a fotoperíodo (12:12), alimentados 5 vezes ao dia (08:00, 10:00, 12:00, 14:00 e 17:00 h).

A água dos aquários foi parcialmente trocada semanalmente, juntamente com os resíduos. Durante o período experimental os parâmetros físico químicos da água durante o período experimental foram: pH $6,80 \pm 0,16$, oxigênio dissolvido $5,71 \text{ mg.L}^{-1} \pm 0,28$ x e temperatura $28^\circ\text{C} \pm 0,04$.

Desafio por temperatura: Após o período de alimentação com as diferentes dietas experimentais contendo urucum cada tratamento foi submetido a um programa de diminuição contínua da temperatura e manutenção em ambiente frio (Figura 3), conforme Jin et al. (2021). A taxa de decréscimo foi de 2°C/h , pela adição de gelo, até atingir a temperatura de 14°C (artigo 1) com manutenção por período de 6 horas.

Dez peixes de cada tratamento foram coletados, aleatoriamente, após 6h a 14°C . Ao final do período experimental, a temperatura recuperou de 14°C para 28°C em $\sim 1^\circ\text{C/h}$ (recuperação). Todos os indivíduos restantes foram finalmente amostrados.

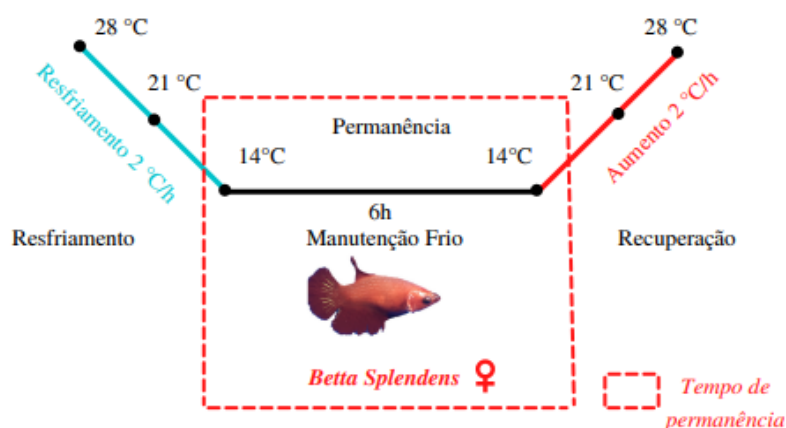


Figura 3. Representação esquemática, onde nas 6 primeiras horas os animais foram submetidos ao estresse por temperatura, com temperatura inicial de 28°C , ajustada para a temperatura de 14°C , com variação de 2°C a cada uma hora pela adição de gelo. Após o desafio de temperatura os peixes foram mantidos em temperatura de 28°C por 6 horas para recuperação.

Em cada amostragem os peixes foram previamente anestesiados com eugenol (INOUE, SANTOS NETO & MORAES, 2003) e dissecados em gelo. Os tecidos, conteúdo abdominal, brânquias e a pele foram coletados, congelados para análises posteriores. As brânquias e pele foram homogeneizadas (1:2, p/v) em tampão fosfato gelado (0,1 M, pH 7,4). As suspensões de célula única foram usadas para medir o teor de EROS.

O conteúdo abdominal foi homogeneizado (1:2, p/v) em uma solução de NaCl 0,7% gelada. Os homogeneizados obtidos foram centrifugados a 3000 g a 4°C por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para determinação da atividade das enzimas digestivas e atividade das enzimas do metabolismo hepático. Para análise histopatológica, fragmentos de fígado e intestino foram coletados e fixados em solução formol 10%.

11.4 Pigmentação da pele dos peixes

No início do ensaio de alimentação todos os peixes foram mensurados quanto a coloração da pele ($L\ 40,44 \pm 1,88$; $a^*8,50 \pm 2,18$; $b^*3,03 \pm 1,39$). Após o período de 28 dias de alimentação os peixes foram novamente avaliados quanto a coloração.

Foi utilizado o fotocolorímetro portátil Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta®), que utiliza sistema de coordenadas de Hunter L^* , a^* , b^* , que mediu a intensidade de L^* que representa brilho ou luminosidade (-100, preto e +100, branco), a cromaticidade de a^* , representado pelas tonalidades de verde (-100) e vermelho (+100) e a cromaticidade de b^* , representado pela tonalidade de azul (-100) e amarelo (+100) (REZENDE et al, 2012). A quantificação foi realizada na região dorsal, logo abaixo da nadadeira dorsal, no peixe in vivo.

11.5 Análises bioquímicas

Foram realizadas análises quanto ao metabolismo hepático (alanina aminotransferase ALT, aspartato aminotransferase AST e albumina), para atividades das enzimas digestivas (amilase, lipase, protease e fosfatase alcalina) e para atividade das enzimas do metabolismo oxidativo (CAT – catalase e SOD- superóxido dismutase).

Para análise da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), amostras de fígado (100 mg) foram homogeneizadas com tampão fosfato de sódio (glicerol v/v em tampão fosfato de sódio 20 mM e Tris 10 mM - pH 7,0) em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Posteriormente, cada amostra foi centrifugada a 4°C por três minutos, a 600 x g e o sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação por oito minutos, a 6000 x g. O sobrenadante foi utilizado para obtenção dos resultados, de acordo com o método de Reitman; Frankel (1957), modificado. As leituras das amostras foram realizadas por espectrofotometria

(espectrofotômetro semi-automático Bioplus S-200), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

Para análise das enzimas digestivas, amostras de intestino (100 mg) foram homogeneizadas com tampão fosfato de sódio (glicerol v/v em tampão fosfato de sódio 20mM e Tris 10mM - pH 7,0) em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Posteriormente, cada amostra foi centrifugada a 4°C por três minutos, a 600 x g e o sobrenadante submetido a uma nova centrifugação por oito minutos, a 6000 x g. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos de amilase, lipase, protease inespecífica e fosfatase alcalina. As leituras das amostras foram realizadas por espectrofotometria (espectrofotômetro semi-automático Bioplus S-200), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

A SOD foi testada por auto-oxidação de pirogalol, que é inibida na presença de SOD (BEUTLER, 1984, modificado). As leituras de absorvância foram realizadas a 420 nm, enquanto 1,0 UI inibe 50% da auto-oxidação do pirogalol. A atividade CAT foi avaliada lendo o decaimento de H₂O₂ a 230 nm (BEUTLER, 1984). Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária em 1,0 μmol de H₂O₂ min⁻¹ de oxidação, e a absorvidade molar usada foi (H₂O₂) ε_{λ230} = 0,071 mM cm⁻¹. A proteína foi determinada com reagente de Bradford contra uma solução padrão de BSA (KRUGER, 2009)

11.6 Análise estatística

A normalidade e variância dos dados foram verificadas pelo Teste de Shapiro–Wilk test e Teste de Levene, respectivamente, com posterior análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey (α=0,05). Os resultados de níveis de extrato oleoso de urucum foram analisados em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos (controle, 2; 4; 6; 10 ml de extrato de urucum) com três repetições.

As diferenças nas atividades das enzimas oxidativas foram testadas através do teste não paramétrico de Kruskal- Wallis o qual verifica se os momentos (antes, após estresse térmico e recuperação) são diferentes entre si. Quando a hipótese de nulidade foi rejeitada, utilizou-se o teste de Dunn para identificar qual dessas categorias diferem das demais.

12. RESULTADOS

A utilização de dietas contendo bixina, proveniente de extrato oleoso de urucum, não alterou as funções digestivas e a coloração da pele dos peixes. A utilização de dietas com 0,10 mg de bixina.kg de dieta⁻¹ apresentaram os maiores valores de ALT e AST (Tabela 4). As

funções hepáticas foram consideradas normais pois houve manutenção da albumina sem diferença estatística entre os tratamentos.

Nas brânquias dos peixes foi observado maior atividade da SOD no grupo controle. A atividade da SOD mensurada na pele foi responsiva à presença de EOU, mas não alterou a atividade da CAT.

Tabela 4 – atividade digestiva, metabólica e oxidativa de fêmeas de *Bettas splendens* alimentadas com níveis de extrato oleoso de urucum.

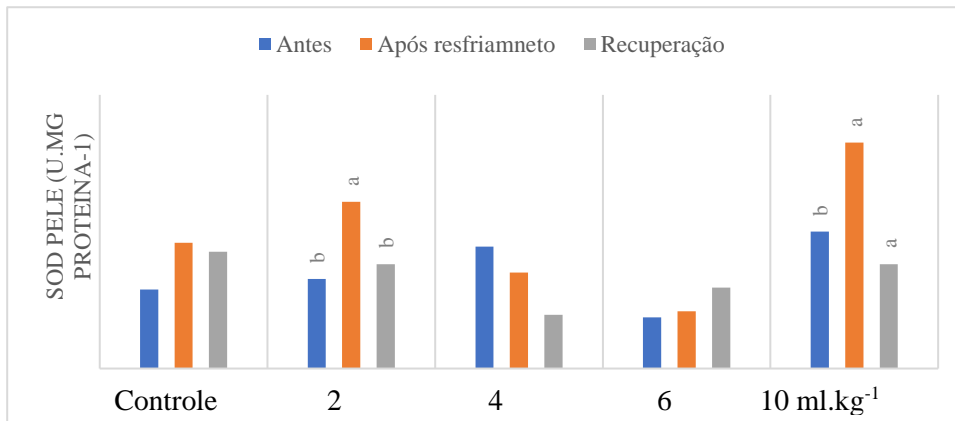
	ml de extrato de urucum na dieta.kg ⁻¹ dieta					P-value
	Controle	2	4	6	10	
<i>Desempenho zootécnico</i>						
Ganho em peso (mg)	0,089±0,156	0,017±0,015	0,007±0,012	0,008±0,012	0,007±0,009	0,480
Consumo (mg)	0,207±0,006	0,204±0,007	0,218±0,005	0,217±0,003	0,203±0,007	0,321
<i>Atividade digestiva (U.mg de proteína⁻¹)</i>						
Fosfatase alcalina	2.177 ± 0.302	2.215 ± 0.337	2.443 ± 0.352	2.319 ± 0.282	2.241 ± 0.922	0,817
Lipase	0.129 ± 0.243	0.080 ± 0.329	0.181 ± 0.187	0.037 ± 0.351	0.048 ± 0.332	0,097
Protease	1.423 ± 0.014	1.424 ± 0.013	1.383 ± 0.079	1.415 ± 0.007	1.427 ± 0.012	0,108
Amilase	0.181 ± 0.110	0.159 ± 0.159	0.132 ± 0.055	0.097 ± 0.032	0.362 ± 0.406	0,094
<i>Atividade metabólica (U.mg de proteína⁻¹)</i>						
Proteína	0.039 ± 0.026 ^{bc}	0.027 ± 0.014 ^c	0.067 ± 0.014 ^a	0.033 ± 0.023 ^{bc}	0.055 ± 0.036 ^{ab}	0,001
Albumina	0.027 ± 0.022	0.019 ± 0.005	0.024 ± 0.022	0.021 ± 0.009	0.024 ± 0.004	0,782
AST	0.629 ± 0.060 ^b	0.581 ± 0.127 ^b	0.850 ± 0.152 ^a	0.608 ± 0.185 ^b	0.620 ± 0.186 ^b	<0,001
ALT	0.817 ± 0.109 ^b	0.715 ± 0.235 ^{abc}	0.979 ± 0.228 ^a	0.858 ± 0.170 ^{abc}	0.658 ± 0.131 ^c	0,003
<i>Atividade antioxidante das brânquias (U.mg de proteína⁻¹)</i>						
SODb	0.678 ± 0.444 ^a	0.461 ± 0.180 ^{ab}	0.441 ± 0.183 ^b	0.466 ± 0.156 ^{ab}	0.405 ± 0.140 ^b	0,015
CATb	0.220 ± 0.125 ^{bc}	0.165 ± 0.081 ^c	0.525 ± 0.495 ^a	0.564 ± 0.568 ^a	0.504 ± 0.644 ^a	<0,001
<i>Atividade antioxidante da pele (U.mg de proteína⁻¹)</i>						
SODp	0.109 ± 0.076 ^b	0.113 ± 0.071 ^b	0.133 ± 0.115 ^b	0.140 ± 0.078 ^b	0.258 ± 0.178 ^a	0,002
CATp	0.091 ± 0.076	0.163 ± 0.216	0.016 ± 0.017	0.035 ± 0.024	0.069 ± 0.038	0,126
<i>Coloração da pele</i>						
L	39,433±1,277	38,907±0,989	39,938±2,204	39,373±1,591	37,903±1,919	0,982
a*	8,580±3,425	8,283±1,307	7,517±2,503	7,56±2,5950	9,363±3,428	0,134
b*	3,190±1,577	2,403±0,745	2,976±2,154	3,290±1,799	3,033±1,373	0,506

AST- Aspartato Aminotransferase, ALT - Alanina Aminotransferase. SOD- Superóxido Dismutase; CAT- Catalase, coloração sistema de coordenadas de Hunter L*, a*, b*.

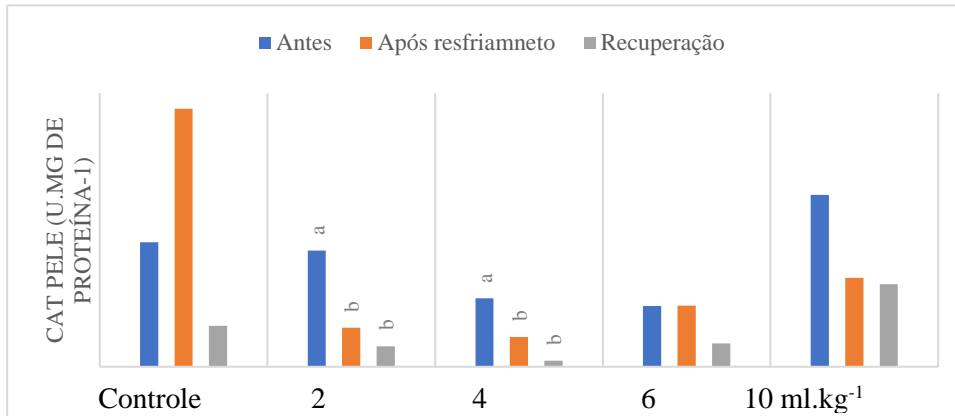
A utilização de 2 e 10 mL de EOU nas dietas promove aumento da atividade de SOD na pele dos peixes submetidos a diminuição de temperatura (A). A utilização de 2 e 4 mL de EOU resultou na diminuição da atividade de CAT na pele (B).

Observa-se que nas brânquias houve alteração da atividade de SOD e CAT frente às variações impostas de temperatura (oC). Altos níveis de EOU em dietas para fêmeas de *Betta splendens* promove aumento da atividade de CAT branquial na recuperação da temperatura (D).

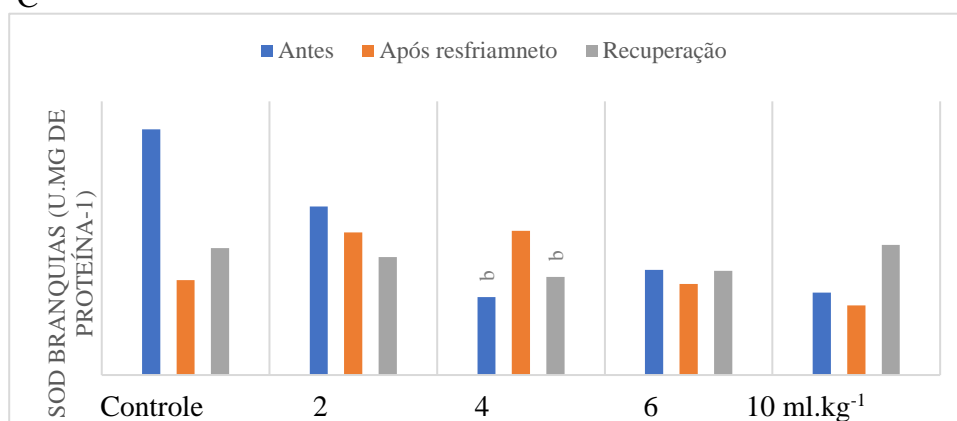
A



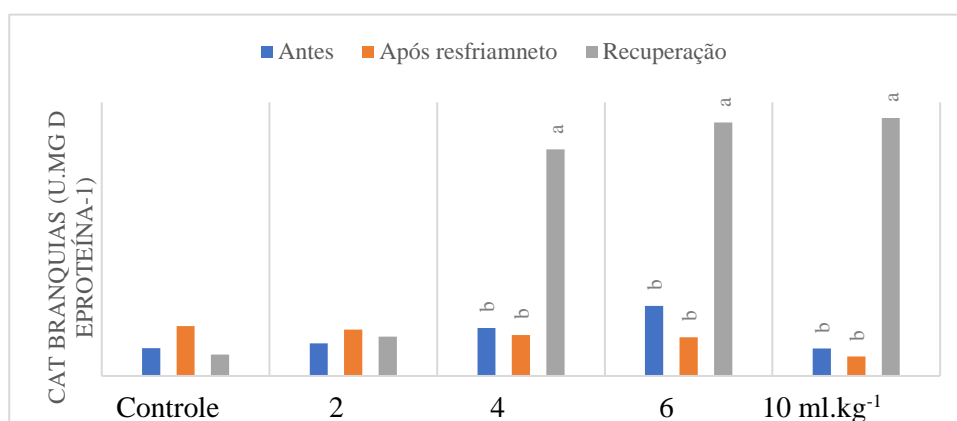
B



C



D



13. DISCUSSÃO

A utilização de EOU na alimentação de fêmeas de *Bettas splendens* pode ser um modulador das respostas das atividades metabólicas promovendo adaptações ao manejo de temperatura. O EOU demonstrou que não possui efeito inibitório nas atividades digestivas das fêmeas de *Bettas splendens*, garantindo assim a segurança de sua inclusão na alimentação de peixes ornamentais, pois ele não prejudica a função digestiva dos animais. Em estudos realizados com *Carassius auratus* alimentados com dietas acrescidas de urucum não apresentou alterações de desenvolvimento Freis et al. (2014), o que garante funções digestivas (DORCE et al.,2020).

A utilização de substâncias naturais com alta concentração de carotenoides tem efeito direto na função hepática de peixes (SONG et al. 2017, WANG et al. 2018, NUNES et al. 2019 COSTA & MIRANDA-FILHO et al.,2020). Estas plantas podem promover efeitos

hipolipidêmico e hepatoprotetor, provavelmente em função de sua capacidade antioxidante, metabolismo lipoproteico no fígado e inibição da lipogênese (ABLIZ et al. 2013).

Ao submeter os animais a alimentação de dietas acrescidas de EOU estamos buscando um efeito hepatoprotetor frente a diminuição das atividades da AST e ALT. O aumento da atividade da AST e ALT são consideradas as respostas dos organismos a estressores e ao metabolismo nutricional e é visto como um indicativo de órgão lesionado ou danificado (MENGA et al., 2018). ALT e AST estão geralmente relacionados ao metabolismo de aminoácidos (HANSEN et al., 2007). O aumento das atividades AST e ALT em resposta à aclimação térmica geralmente revela a mobilização de aminoácidos livres para a produção de energia para compensar o estresse (DALVI et al., 2017). Em estudo, com *S. aequifasciatus* exposto a temperaturas diminuídas as atividades de ALT e AST apareceram aumentadas durante todo o período de exposição (dia 0-28), indicando a resposta rápida e contínua ao estresse pelo frio (WEN et al., 2017).

Em relação, às atividades enzimáticas de todas as enzimas metabólicas selecionadas no tecido hepático, elas foram aumentadas com a diminuição das temperaturas (WEN et al., 2017). Sob estresse de temperatura, o sistema de defesa antioxidante inibiria um excesso de formação oxirradical (YE et al., 2016; REN et al., 2018). A SOD e CAT, geralmente atua de forma coordenada para garantir a proteção ideal contra o estresse oxidativo (MORALES-MEDINA et al., 2017). Enzimas antioxidantes endógenas desempenham um papel crucial na eliminação de derivados de oxigênio reativos prejudiciais, que foram indicadores importantes da resposta antioxidante (ALIKO et al. 2018).

A atividade da SOD mensurada na pele foi responsiva à presença de EOU, mas não alterou a atividade da CAT. Alterações nas atividades de CAT e SOD são reportadas ao uso de astaxantina em *Channa argus* (LI et al., 2019). Algumas plantas são reportadas na literatura como eficiente em promover melhoras na resposta antioxidante. (WANG et al., 2017). O que difere os peixes ornamentais de outras espécies em relação a dieta balanceada são as diferentes rotas metabólicas para os carotenoides (FRIES et al., 2014). Além da pigmentação o uso de aditivos naturais faz com que aumente a imunidade, desse modo agregando bem estar animal. Estudos apontam que frutas além de fornecer nutrientes, contêm níveis significantes de carotenoides, tocoferóis e fenólicos em sua polpa (NUNES et al., 2018).

Portanto, produtos originários de frutas demonstram serem eficazes quanto a sua implementação na dieta de peixes ornamentais. Há evidências experimentais de que a coloração animal pode demonstrar redução se apresentar uma boa atividade antioxidante (PEREZ et al., 2008). Ou seja, há a hipótese de que aqueles indivíduos que apresentam boa defesa antioxidante

podem fazer com que se desvie a função do carotenoide no metabolismo. Uma pesquisa na qual foi utilizada dieta mista na qual consiste em dieta formulada suplementada com microalgas e biomassa do *Ankistrodesmus gracilis* houve influência na coloração da pele do peixe anjo (MORAIS et al., 2015). Ou seja, isso demonstra que fazer uso de aditivos naturais e vivos podem complementar positivamente na dieta, assim sendo viável na nutrição ornamental, embora exige mais estudos.

As alterações de SOD e CAT branquial são importantes por este órgão estar em contato direto com o meio aquático (JIN et al., 2021), sendo o órgão alvo para mensurações das alterações ambientais (HU et al., 2016). Neste trabalho observou-se que a brânquia alteração da atividade de SOD e CAT frente às variações impostas de temperatura, no entanto, ainda são preliminares esta cascata de reação uma vez que ainda não temos os resultados histopatológicos de brânquias para elucidar.

Apesar do aumento da atividade antioxidante na pele de *Betta splendens*, não foi observada nenhuma alteração no padrão da coloração. A inclusão de EOU não reportou alteração na cromaticidade de *Betta splendens*. A utilização de pigmentos de fontes naturais têm demonstrado eficácia na pigmentação da pele dos peixes, como na utilização de tomate (*Solanum lycopersicum*), cenoura (*Daucus carota*) (MIRZAEI et al., 2012) e beterraba (*Beta vulgaris*) (XU et al. 2006), relataram o aumento da deposição de carotenoides em *Carassius auratus* alimentados por 15 dias com 80 mg/kg aumentam a deposição de carotenoides de 0,118 para 0,339.

No entanto, alguns produtos apesar da presença de pigmentos na sua composição quando adicionados em dietas para peixes não confere alteração na coloração da pele, podemos destacar a utilização do óleo essencial de pimenta rosa para o mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) (PORTO et al., 2020) e com adição de óleo de polpa de bacuri (*Attalea phalerata* Mart. ex Spreng) (PORTO et al., 2020b).

A pigmentação dos peixes está associada à espécie de peixes, a capacidade do corante em pigmentar e a concentração deste na dieta (LI et al.; 2017) e principalmente a forma de inclusão (DETHLEFSEN et al. 2016). Devemos nos atentar que a busca por corantes capazes de conferir aumento de coloração ainda é incipiente. Mas ressalta-se que a bixina, é o carotenoide de maior quantidade no urucum (OLIVEIRAS et al., 2021). Pode auxiliar nas funções metabólicas e aumentando a plasticidade destes peixes ao manejo. Há relatos principalmente de que para maior expressão da coloração há necessidade de aumentar a disponibilidade de outros antioxidantes (não pigmentares) (PÉREZ et al. 2008).

14. CONCLUSÃO

A utilização de 10ml de extrato oleoso de urucum kg^{-1} de dieta é eficiente para mitigar os efeitos de estresse por baixa temperatura em juvenis de fêmeas *Betta splendens*.

15. REFERÊNCIAS

- ABLIZ, D., DUAN, Y., STEUERNAGEL, L., XIE, L., LI, D., ZIEGMANN, G. Curing methods for advanced polymer composites-a review. **Polymers and Polymer Composites**, v. 21, n. 6, p. 341-348, 2013.
- ALIKO, V., QIRJO M, SULA, E., MORINA, V. FAGGIO, C. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. **Fish & shellfish immunology**, v. 76, p. 101-109, 2018.
- ALZAID, A., HORI, T. S., HALL, J. R., RISE, M. L., GAMPERL, A. K. Cold-induced changes in stress hormone and steroidogenic transcript levels in cunner (*Tautoglabrus adspersus*), a fish capable of metabolic depression. **General and comparative endocrinology**, v. 224, p. 126-135, 2015.
- AOAC. Association of official Analytical Chemist. Horwitz, W. (ED) Oficial Methods of Analysis of Association Official Analytical Chemists. 17^o edição, **Arlington**: AOAC Inc, v. 1 e v. 2, 2000
- BARRETO, L. M. Aquicultura ornamental de água doce – Parte I. **Aquicultura Brasil**, v.8, p.14 – 18, 2017.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.
- BERLINGHIERI, F., PANIZZON, P., PENRY-WILLIAMS, I. L., BROWN, C. Laterality and fish welfare-a review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 236, p. 105239, 2021.
- BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*; 3rd ed. **Grune & Stratton**: New York, 1984; ISBN 0808916726.
- BEVELHIMER, M.; BENNETT, W. Assessing cumulative thermal stress in fish during chronic intermittent exposure to high temperatures. **Environmental Science & Policy**, v. 3, p. 211-216, 2000.
- BLEHER, H., STÖLTING, K.N., SALZBURGER, W.; MEYER, A. Revision of the genus *Symphysodon* Heckel, 1840 (Teleostei: Perciformes: *Cichlidae*) based on molecular and morphological characters. **Aqua**, v. 12, n. 4, p. 133-174, 2007.
- BERLINGHIERI, F., PANIZZON, P., PENRY-WILLIAMS, I. L., BROWN, C. Laterality and fish welfare-a review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 236, p. 105239, 2021.
- BOWDEN, A. J., GARDINER, N. M., COUTURIER, C. S., STECYK, J. A. W., NILSSON, G. E., MUNDAY, P. L., RUMMER, J.L. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 175, p. 64-71, 2014.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRYANT, HEATHER J.; CHUNG, DILLON J.; SCHULTE, PATRICIA M. Subspecies differences in thermal acclimation of mitochondrial function and the role of uncoupling proteins in killifish. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 24, p. jeb186320, 2018.

CHONG, A. S. C.; HASHIM, R.; ALI, A. B. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodonaequifasciata*) using in vivo and in vitro methods. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 229-238, 2002

CHUNG, Dillon James; BRYANT, Heather J.; SCHULTE, Patricia M. Thermal acclimation and subspecies-specific effects on heart and brain mitochondrial performance in a eurythermal teleost (*Fundulus heteroclitus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 8, p. 1459-1471, 2017.

DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, H.N.; BRANCO, A.; AGRA, M.F., BARBOSA, M.R.V.; QUEIROZ, L.P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007.

DETHLEFSEN, M. W., HJERMITSLEV, N. H., FROSCH, S. & NIELSEN, M. E. 2016. Effect of storage on oxidative quality and stability of extruded astaxanthin-coated fish feed pellets. **Animal Feed Science and Technology**, 221:157–166.

DHANANJAYA, B.L, ZANIEER F, GIRISH KS, D'SOUZA C.J. Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. against *Daboia russellii* (*Russell's viper*) venom. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 48, p. 175-183, 2011.

DORCE, L.S; MENDONÇA, W.C.B; SIQUEIRA, M.S, SANTOS; R.F.B, SOUSA, R.M, ZIEMNICZAK; H.M, HONORATO, C.A. Atividade de enzimas digestivas contra a restrição alimentar de peixes ornamentais. **Revista Agrária**, v. 13, n.47, pág.107-113, 2020.

EBENEZAR, S., PRABU, D. L., CHANDRASEKAR, S., TEJPAL, C. S., MADHU, K., SAYOOJ, P., VIJAYAGOPAL, P. 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.

FARIAS, I.P; HRBEK, T. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon spp. Cichlidae*) of the Amazon basin. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 49, n. 1, p. 32-43, 2008.

FERREIRA, I.C; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FRIES, E. M.; BITTARELLO, A. C.; ZAMINHAN, M.; SIGNOR, A.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. Urucum em dietas para alevinos de kinguios *Carassius auratus*: desempenho produtivo e pigmentação da pele. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3401-3414, 2014.

GOMES, V.D.S.; AMÂNCIO, A.L.L.; CAVALCANTI, C.R.; BATISTA, J.M.M. Análise das características corporais do peixe *Betta splendens*. **Visão Acadêmica**, v. 20, n. 3, p. 29 – 38, 2019.

GOMES, V.D.S, CAVALCANTI, C.R, BATISTA, J.M.M, DE ALMEIDA, J.L.S, DE ARAÚJO SANTOS, F.G, JORDÃO FILHO, Uso de aditivos alimentares para peixes ornamentais. **Revista Científica Rural**, v. 23, n.1, p. 266-279, 2021

GOODWIN T W (1962) **Carotenoids, their comparative biochemistry**. 3. ed. New York: New York, chemical

GOUVEIA, L., REMA, P., PEREIRA, O., Empis, J. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 123-129, 2003.

HANSEN, J. T., BRÖER, S., BRÖER, A., BUBB, W. A., BALCAR, V. J., NASRALLAH, F. A., RAE, C. Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain. **Journal of neurochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1758-1770, 2007.

HU, P.; LIU, M.; LIU, Y.; WANG, J.; ZHANG, D.; NIU, H. CHEN, L. Transcriptome comparison reveals a genetic network regulating the lower temperature limit in fish. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

IBGE. **IBGE – População de animais de estimação no Brasil**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf>. Acesso em: 20 de Outubro. 2021.

INOUE, L. A. K. A., SANTOS NETO, C. D., MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, p. 943-947, 2003.

ISAAK, D.J., WOLLRAB, S., HORAN, D., CHANDLER, G. Climate change effects on stream and river temperatures across the northwest US from 1980–2009 and implications for salmonid fishes. **Climatic change**, v. 113, n. 2, p. 499-524, 2012.

JIN, S.R., WANG, L., LI, X.X., WEN, B., GAO, J.Z., CHEN, Z.Z. Integrating antioxidant responses and oxidative stress of ornamental discus (*Symphysodon spp.*) to decreased temperatures: Evidence for species-specific thermal resistance. **Aquaculture**, v. 535, p. 736375, 2021.

JOHANSEN, J. L.; JONES, G. P. Increasing Ocean temperature reduces the metabolic performance and swimming ability of coral reef damselfishes. **Global Change Biology**, v. 17, n. 9, p. 2971-2979, 2011. J.L. Johansen, G.P. Jones

JOHANSSON, LARS H.; BORG, LA HÅKAN. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Analytical biochemistry**, v. 174, n. 1, p. 331-336, 1988.S.

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantitation. **The protein protocols handbook**, p. 17-24, 2009.

LI, M. Y., LIU, X. Y., XIA, C. G. ZHANG, D. M. Astaxanthin enhances hematology, antioxidant and immunological parameters, immune-related gene expression, and disease resistance against in *Channa argus*. **Aquaculture International**, v. 27, n. 3, p. 735-746, 2019.

LI, M., RAHMAN, M. M., WU, B. LIN, Y. C. Effects of dietary canthaxanthin on growth and body colour of blood parrot cichlid *Amphilophus citrinellus*×*Paraneetroplus synspilus*. **Aquaculture International**, v.25 p.705–713, 2017

MARTINS, C. I., GALHARDO, L., NOBLE, C., DAMSGÅRD, B., SPEDICATO, M. T., ZUPA, W., KRISTIANSEN, T. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 17-41, 2012.

MARTINS, C.I.; SILVA, P.I.; CONCEIÇÃO, L.E.; COSTAS, B.; HÖGLUND, E.; ØVERLI, Ø.; SCHRAMA, J.W. Linking fearfulness and coping styles in fish. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 28084, 2011.

MENGA, F; SWYNGEDOUW, ERIK (Ed.). **Water, technology and the nation-state**. Routledge, 2018.

MIRZAEI, S., SHABANI, A., REZAEI, S., HOSSEINZADEH, M. The effect of synthetic and natural pigments on the color of the guppy fish (*Poecilia reticulata*). **Global Veterinaria**, v. 9, n. 2, p. 171-174, 2012.

MORAIS, F. A., FERNANDES, J.B., TAVARES, L.H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration of ornamental fish *Hyphessobrycon eques* (Steindacher 1882). **Aquaculture research**, v. 47, n. 10, p. 3061-3069, 2015

MORALES-MEDINA, R., PÉREZ-GÁLVEZ, R., GUADIX, A., GUADIX, E. M. MULTIOBJECTIVE optimization of the antioxidant activities of horse mackerel hydrolysates produced with protease mixtures. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 149-158, 2017.

MOREIRA, V. S., REBOUÇAS, T. N. H., DE MORAES, M. O. B., SÃO JOSÉ, A. R., DA SILVA, M. Atividade antioxidante de urucum (*Bixa orellana* L.) IN natura e encapsulado. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 15, n. 2, p. 201-209, 2014.

NUNES, K. C., EYNG, C., PINTRO, P. T. M., GARCIA, R. G., MURAKAMI, A. E., VITAL, A. C. P., NUNES, R. V. NESELLO, P. O. Dietary inclusion of dehydrated bocaiuva pulp increases the antioxidant potential of quail eggs. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 103, n. 1, p. 64-71, 2019.

OTA, E.C, HONORATO, C. A., HEREDIA-VIEIRA, S. C., FLORES-QUINTANA, C. I., CASTRO, T. S., INOUE, L. A. K. A., CARDOSO, C. A. L. Hepatic and gastroprotective activity of *Serjania marginata* leaf aqueous extract in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 1051-1065, 2019.

OLIVEIRAS, H.S., RIBEIRO, A.G., DA SILVA, D.A., MACAMBIRA, G.M., DOS SANTOS, A.C.F., DE SOUSA RODRIGUES, M.R., FERREIRA, M.L.S. Caracterização e utilização do carotenoide bixina, extrato da semente do urucum (*Bixa Orellana* L.) como agente pigmentante nas dietas de animais não-ruminantes. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 64481-64494, 2021.

PANIJPAN, B; SRIWATTANAROTHAI, N; LAOSINCHAI, P. Wild *Betta fighting* fish species in Thailand and other Southeast Asian countries. **ScienceAsia**, v. 46, n. 4, p. 382-391, 2020.

PEREIRA DA COSTA, D; MIRANDA-FILHO, K.C. The use of carotenoid pigments as food additives for aquatic organisms and their functional roles. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1567-1578, 2020.

PÉREZ, C; LORES, M; VELANDO, A. Availability of nonpigmentary antioxidant affects red coloration in gulls. **Behavioral Ecology**, v. 19, n. 5, p. 967-973, 2008.

PORTO, E.L.N., LIMA, F.F.; SOUSA, R.M.; MENDONÇA, W.C.B.; HONORATO, C.A. *Schinus terebinthifolius* raddi pepper oil used as na addictive in *Hyphessobrycon eques* steindachner fish diet. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 6, p. e192963118-e192963118, 2020.

PORTO, E.L.N., DE LIMA, F.F., SOUSA, R.M., MENDONÇA, W.C.B., HONORATO, C.A. The *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) coloration influenced by the addition of *Attalea Phalerata* Mart. ex spreng crude oil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 3, p. e97932578-e97932578, 2020.

RAHMAN, M., PINKEY, I. A., FERTHOUS, J., ARAFAT, S. T., RAHMAN, S. M., ASADUZZAMAN, M., ROUF, M. A. Modulation of phenotypic traits under different rearing temperatures: Experimental evidence in male guppy (*Poecilia reticulata*). **International Journal of Aquatic Biology**, v. 8, n. 5, p. 344-364, 2020.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. **American journal of clinical pathology.**, v. 28, p.56, 1957

REN, J.; LIU, C.; ZHAO, D.; FU, J. The role of heat shock protein 70 in oxidant stress and inflammatory injury in quail spleen induced by cold stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 21, p. 21011-21023, 2018

REZENDE, F.P; VIDAL JÚNIOR, M.V; ANDRADE, D.R; MENDONÇA, P.P; SANTOS, M.V.B. Characterization of a new methodology based on the intensity of skin staining of ornamental fish with applications in nutrition. **Journal of Agricultural Science and Technology. B**, v. 2, n. 5B, p. 606, 2012.

ROHDE, D. C., SILVEIRA, S. O., VARGAS, V. R. A. O uso do corante urucum (*Bixa orellana* L.) na técnica de colodietahistológica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, p. 119-121, 2006.

ROSSATO, S., NOVACK, M. M. E., DE PELLEGRINI, L. G., DA SILVA, G. R., FRONZA, R. T. L., DA SILVA, E. J., DOS SANTOS, G. Avaliação do crescimento e análise da qualidade da carne de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas suplementadas com colorífico de urucum. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9749-9766, 2021.

SANTOS, E.J.; LOURENZANI, W.L.; LOURENZANI, A.E.B.S. Histórico e ascensão do urucum na microrregião de dracena-SÃO PAULO. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, v.12, n.1, p. 29-39, 2018.

SILVA, L.S. **Avaliação de parâmetros bioquímicos nutricionais e do estresse oxidativo em ratos tratados com extrato oleoso de bixina (pa lipo 8%).** 2009

SHINDO, K.; KIKUTA, K.; SUZUKI, A.; KATSUTA, A.; KASAI, H.; YASUMOTOHIROSE, M.; MATSUO, Y.; MISAWA, N.; TAKAICHI, S. Rare carotenoids, (3R) saproxanthin and (3R,2'S)-myxol, isolated from novel marine bacteria (Flavobacteriaceae) and their antioxidative activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.1350-1357, 2007.

ŠKERUET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M. HRA, AR, SIMONIŠ, M. KNEZ. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 191-198, fev. 2005.

SONG, X., WANG, L., LI, X., CHEN, Z., LIANG, G. LENG, X. Dietary astaxanthin improved the body pigmentation and antioxidant function, but not the growth of discus fish (*Symphysodon spp.*). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1359-1367, 2017.

STEVENS, P. W., BLEWETT, D.A., BOUCEK, R.E., REHAGE, J.S., WINNER, B.L., YOUNG, J.M., PAPERNO, R. Resilience of a tropical sport fish population to a severe cold event varies across five estuaries in southern Florida. **Ecosphere**, v. 7, n. 8, p. e01400, 2016.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extdietae determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p. 310- 313, 2001.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WANG, C.Y.; LI, Z.B.; SUN, Y.Z.; CHEN, Q.; LI, W. J.; HUANG, Y.C., LU, J.. Effects of Chinese herbal medicines mixture on growth performance digestive enzyme activity immune response of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 683-693, 2018.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; GAO, J.Z.; WANG, L.; LIU, Y. LIU, H.P. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, v. 481, p. 169-176, 2017.

WU, S. M., CHEN, J. R., CHANG, C. Y., TSENG, Y. J., PAN, B. S. Potential benefit of I-Tiao-Gung (*Glycine tomentella*) extract to enhance ornamental fish welfare during live transport. **Aquaculture**, v. 534, p. 736304, 2021.

XU, J., KUHN, G., HOLBOURN, A. H., NILS, B. G. (2006): **Magnesium/Calcium ratios and sea surface temperature estimation for sediments of the Timor Sea.**

XU, Z., REGENSTEIN, J. M., XIE, D., LU, W., REN, X., YUAN, J., MAO, L. The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 72, p. 564-571, 2018.

YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y. Avaliação dos métodos analíticos para determinação da bixina em grãos de urucum e suas correlações. **Seminário de corantes naturais para alimentos, simpósio internacional de urucum**, Campinas v. 2, p.275-279, 1991.

YE, C. X., WAN, F., SUN, Z. Z., CHENG, C. H., LING, R. Z., FAN, L. F., WANG, A. L. Effect of phosphorus supplementation on cell viability, anti-oxidative capacity and comparative proteomic profiles of puffer fish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress. **Aquaculture**, v. 452, p. 200-208, 2016.

YI, X. et al. Effects of dietary lutein/canthaxanthin ratio on the growth and pigmentation of large yellow croaker *Larimichthys croceus*. **Aquaculture Nutrition**, v.22, n.3, p. 683-690, 2015.

ZHANG, W., WANG, H., BRANDT, D. Y. C., HU, B., SHENG, J., WANG, M., HONG, Y. The genetic architecture of phenotypic diversity in the betta fish (*Betta splendens*). **BioRxiv**, 2021.