



LAÍS TEODORO LIBECK

**ALIMENTAÇÃO DURANTE A FASE INICIAL DA
LARVICULTURA DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**LAVRAS –MG
2019**

LAÍS TEODORO LIBECK

**ALIMENTAÇÃO DURANTE A FASE INICIAL DA LARVICULTURA DE
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Libeck, Laís Teodoro.

Alimentação durante a fase inicial da larvicultura de
Zebrafish (*Daniorerio*) / Laís Teodoro Libeck. - 2019.
62 p. : il.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Larvicultura de peixes. 2. Zebrafish. 3. Alimento vivo. I.
Solis Murgas, Luis David. II. Título.

LAÍS TEODORO LIBECK

**ALIMENTAÇÃO DURANTE A FASE INICIAL DA LARVICULTURA DE
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**FEEDING DURING THE INITIAL PHASE OF ZEBRAFISH LARVICULTURE
(*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30/10/2019

Dr. Luis David Solis Murgas

Dr. Marcos Ferrante

Dr^a Aline Ferreira Souza de Carvalho

UFLA

UFLA

UNINCor

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só foi possível com a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este fato, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta conquista se tornasse uma realidade.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me proporcionar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar diante das dificuldades. Agradeço a Ele pela minha força e pela paz nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir.

Aos meus pais Marcia e Rodes, que sempre me motivaram, e muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre demonstraram por mim. Agradeço pelo exemplo de dignidade e perseverança, pela confiança na minha capacidade, por sempre me incentivarem perante os desafios, a fazer mais e melhor, quero partilhar convosco esta alegria de conseguirmos vencer continuamente. Ao meu irmão Ian e aos demais familiares que sempre me incentivaram e torceram pelas minhas conquistas. Agradeço à minha sogra Fernanda, por tanto carinho que a mim depositara e por tanta confiança, amor e admiração.

Agradeço ao meu “bem”, Adriano, com quem eu sei que passarei por muitos momentos de felicidade como este e que é a pessoa que a vida escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins. Agradeço pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional, pela enorme compreensão, generosidade e alegria com que brinda as minhas vitórias constantemente. Por ser ouvinte atento de algumas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pela confiança e pela valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem para vencer qualquer obstáculo. Por todas as atitudes que o faz merecedor do meu amor.

Aos meus colegas de laboratório, do Biotério Central da Ala de peixes, quero agradecer-lhes os momentos, por vezes, magníficos, que passamos. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e, a alegria que sempre se instalava. Em especial, agradeço ao Gilmar, a oportunidade de tê-lo conhecido e crescido pessoalmente e profissionalmente. Agradeço pela confiança, amizade, conselhos e paciência. És um exemplo de simplicidade, compreensão, dedicação, amor ao trabalho e competência, pessoa que carregarei para sempre comigo. À minha colega de trabalho Renata por todo o auxílio, amizade, risadas e a sua

sempre inteira disponibilidade em todos os momentos em que precisei. O meu muito obrigada. Ao meus amigos da pós graduação William, Naiara Melo, Barbara, Aline e as meninas da graduação: Amanda, Sarah, Kiara e Isabela Miranda, pela amizade demonstrada e, pela ajuda preciosa dada ao desenvolvimento do meu trabalho laboratorial.

Ao Professor Murgas, pela oportunidade de tê-lo como orientador, e sobretudo, um querido amigo, pela pessoa e profissional que é. Obrigada por sua dedicação, que o fez, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. E, principalmente, obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho que se iniciaram ainda no Ensino Médio desde o Bic-Junior, Iniciação Científica e agora finalizando o meu Mestrado. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pelo meu desenvolvimento acadêmico, e pela minha formação profissional. Agradeço por tantos anos de companheirismo, pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência.

Às demais pessoas que contribuíram na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, o meu profundo agradecimento.

RESUMO GERAL

O estágio larval é considerado a fase mais crítica no cultivo de peixes, devido à elevada vulnerabilidade dos indivíduos aos vários parâmetros de cultivo. O fornecimento de uma dieta inadequada às exigências nutricionais, resulta em diminuição do crescimento e sobrevivência dos peixes. O *Danio rerio* é uma espécie de peixe com várias características que o tornam um organismo modelo na pesquisa científica, entretanto pouca informação existe na literatura acerca de um protocolo alimentar adequado para as larvas destes peixes. Objetivou-se determinar um protocolo de alimentação utilizando alimento vivo e alimentos formulados para larvas de zebrafish. O experimento foi conduzido no Biotério Central da UFLA e teve duração de 32 dias. Foram utilizadas 900 larvas de zebrafish obtidas de reprodutores do Biotério Central. No 8º dia pós fertilização (dpf), ocorreu o início do fornecimento das dietas propostas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo utilizado alimento vivo (*Artemia sp* (A)), e alimentos formulados (artêmia liofilizada (AL)), ração com spirulina (RSp), ração com chlorella (RCh) e ração comercial (RC). A densidade utilizada foi de 45 larvas/ L, totalizando 5 tratamentos e 4 repetições. As larvas foram alimentadas 6 vezes ao dia (8h; 10h; 12h; 14h; 16h; 18h). Para mensuração de parâmetros morfométricos, as larvas foram pesadas nos dias 0, 12, 22 e 32 dias após o início do experimento, onde foi calculado o peso médio das larvas, e para constatação do crescimento, as larvas foram fotografadas em microscópio óptico (objetiva 4X) e posteriormente avaliadas utilizando o programa Motic Image Plus®. Análises histológicas foram realizadas nos dias 12, 22 e 32 após o início do experimento, para avaliação do crescimento da musculatura esquelética (hipertrofia e hiperplasia). Os maiores valores para sobrevivência foram obtidos com alimentação AL e o tratamento A obteve os valores mínimos de sobrevivência. A dieta RC apresentou comprimento total e do diâmetro ocular significativamente maior ($p < 0,05$) que as demais dietas até os 22 dias. Resultados significativamente inferiores ($p < 0,05$) foram apresentados pela dieta RSp, em todas as variáveis analisadas de crescimento. Analisando à abertura da boca aos 12 dias, o tratamento contendo AL foi significativamente maior ($p < 0,05$) seguido pelo tratamento A, e aos 22 dias, a dieta AL apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) comparativamente a dieta RCh. Este trabalho demonstrou que, nas fases iniciais de desenvolvimento do zebrafish podem ser utilizadas dietas a base de artêmia liofilizada como alimento principal.

Palavras-chaves: Alimento vivo. Larvicultura. Peixe zebra.

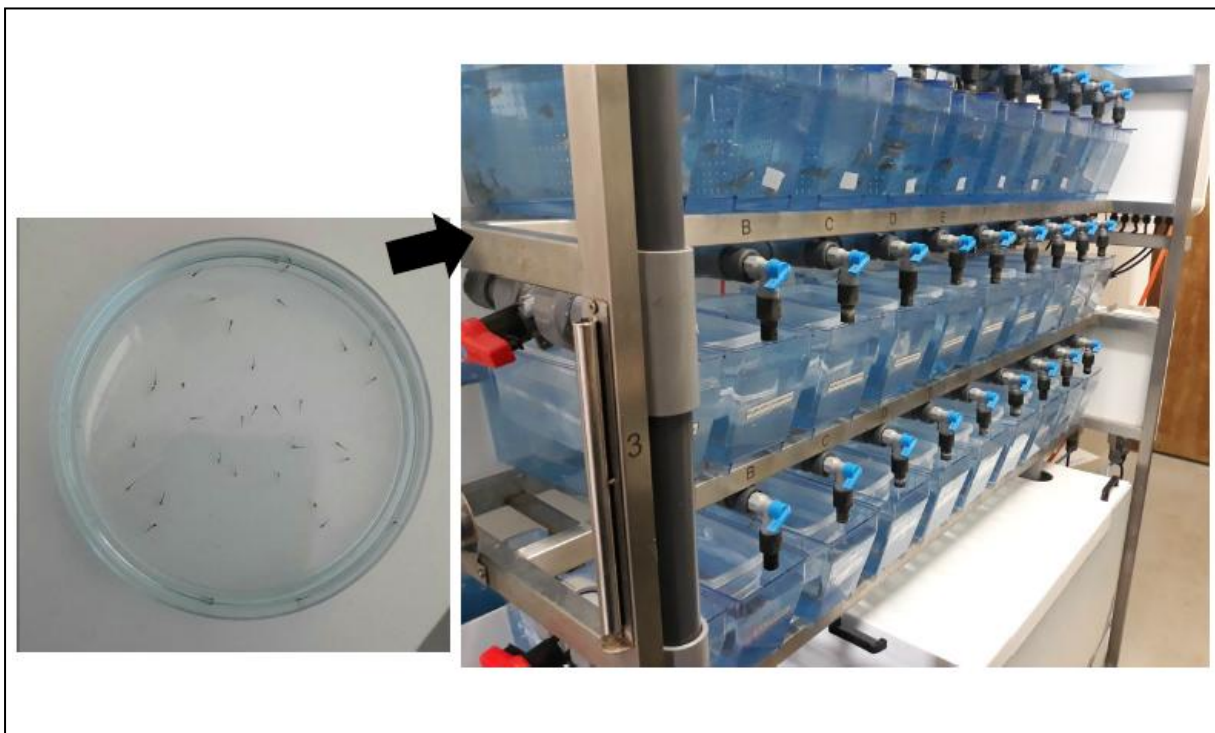
GENERAL ABSTRACT

The larval stage is considered the most critical phase in fish cultivation due to high vulnerability of individuals to various cultivation parameters. Providing an inadequate diet and nutritional requirements results in decreased fish growth and survival. *Danio rerio* is a species of fish with several characteristics that make it a model organism in scientific research. However, little information exists in the literature about an adequate food protocol for these fish larvae. The objective was to determine a feeding protocol using live food and formulated food for zebrafish larvae. The experiment was conducted at UFLA Central Biottery and lasted 32 days. 900 zebrafish larvae obtained from Central Biottery breeders were used. On the 8th day after fertilization (dpf), the supply of the proposed diets began. The experimental design was completely randomized, using live feed (*Artemia* sp (A).) And formulated feed (freeze-dried brine shrimp (AL), spirulina feed (RSp), chlorella feed (RCh) and commercial feed (RC). The density used was 45 larvae/L, totaling 5 treatments and 4 repetitions. The larvae were fed 6 times a day (8h; 10h; 12h; 14h; 16h; 18h). For measurement of morphometric parameters, the larvae were weighed on days 0, 12, 22 and 32 days after the beginning of the experiment in which the average weight of the larvae was calculated. They were also photographed in optic microscope (objective 4X) for growth rate and then evaluated using the Motic Image Plus® program. Histological analyzes were performed on days 12, 22 and 32 after the beginning of the experiment, to evaluate the growth of skeletal muscles (hypertrophy and hyperplasia). The highest survival values were obtained with AL feeding and treatment A obtained the minimum survival values. The RC diet presented significantly greater total length and eye diameter ($p < 0.05$) than the other diets up to 22 days. Significantly lower results ($p < 0.05$) were presented by the RSp diet in all analyzed growth variables. Analyzing mouth opening at 12 days, the treatment containing AL was significantly higher ($p < 0.05$) followed by treatment A, and at 22 days, the AL diet showed significant differences ($p < 0.05$) compared to the RCh diet. This work showed that in the early stages of zebrafish development, diets of lyophilized brine shrimp should be used as food and the diet may be supplemented with other foods to obtain better results.

Keywords: Live food. Larviculture. Zebrafish.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

A criação das larvas é um ponto crítico na produção dos peixes, e a oferta de alimento de alto valor nutricional associado à frequência alimentar são parâmetros importantes para garantir uma boa taxa de sobrevivência e crescimento satisfatório. O zebrafish (*Danio rerio*) tem sido amplamente utilizado como modelo animal em pesquisas científicas, além disso, caracteriza-se por ser uma das espécies ornamentais preferidas pelos aquarófilos. As pesquisas relacionadas ao fornecimento de dietas que atendam as exigências nutricionais das larvas de zebrafish são escassas. Desta forma, objetivou-se determinar protocolos alimentares utilizando alimentos vivos e alimentos formulados para larvas de zebrafish. O experimento foi realizado no Biotério Central- Ala peixes, UFLA e teve duração de 32 dias. Foram utilizadas 900 larvas de zebrafish obtidas de reprodutores do Biotério Central, sendo 45 larvas por litro (5 tratamentos e 4 repetições). No 8º dia pós fertilização, ocorreu o início do fornecimento das dietas propostas. Foram utilizados alimento vivo: *Artemia sp* e alimentos formulados: artêmia liofilizada, ração com spirulina, ração com chlorella e ração comercial (alimentadas 6 vezes ao dia). As larvas foram pesadas nos dias 0, 12, 22 e 32 dias após o início do experimento, onde foi calculado o peso médio das larvas, e para constatação do crescimento, as larvas foram fotografadas em microscópio óptico e posteriormente avaliadas utilizando o programa Motic Image Plus®. Análises histológicas foram realizadas nos dias 12, 22 e 32 após o início do experimento, para avaliação do crescimento da musculatura esquelética. Os maiores valores para sobrevivência e abertura da boca foram obtidos com alimentação da dieta artêmia liofilizada e a dieta *Artemia sp* obteve os valores mínimos de sobrevivência. Este trabalho demonstrou que, nas fases iniciais de desenvolvimento do zebrafish podem ser utilizadas dieta com artêmia liofilizada como alimento principal.



O zebrafish (*Danio rerio*) é uma espécie de peixe amplamente utilizada nas pesquisas científicas e para fins ornamentais. Existe uma problemática na criação de larvas de zebrafish em laboratório principalmente relacionadas a sua alimentação, portanto, há necessidade de determinação de protocolos alimentares, visando altas taxas de sobrevivência e crescimento satisfatório das larvas desta espécie. Através da utilização de alimento vivo e alimentos inertes, foi constatado que a artêmia liofilizada é uma dieta que pode ser utilizada como primeira alimentação para larvas de zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	14
Figura 2 – Sistema de recirculação de água de cultivo das larvas zebrafish utilizadas, onde se mantiveram os espécimes dos 8 aos 40 dpf.....	29
Figura 3 – Incubadoras de náuplios de artêmia para cada horário de oferta de alimentação das larvas.....	33
Figura 4 – Representação das análises feitas nos tratamentos e os demais dias em que estas análises foram efetuadas.....	35
Figura 5 – Taxa de sobrevivência das larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>), dados obtidos diariamente (dia 0 à 32 experimental) de acordo com as dietas utilizadas nos tratamentos. ...	38
Figura 6 – Comprimento total médio dos peixes dos vários tratamentos aos 12, 22 e 32 após o início do experimento.....	40
Figura 7 – Comprimento padrão médio dos peixes dos vários tratamentos aos 0, 12, 22 e 32 após o início do experimento.....	41
Figura 8 – Diâmetro médio ocular dos peixes dos vários tratamentos aos 0, 12, 22 e 32 após o início do experimento.....	42
Figura 9 – Abertura média da boca dos peixes dos vários tratamentos aos 0, 12, 22 e 32 após o início do experimento.....	42
Figura 10 – Valores do diâmetro da musculatura esquelética (mm) dos vários tratamentos nos dia 12, 22 e 32 após o início do experimento.....	44
Figura 11 – Valores de comprimento da musculatura esquelética (mm) dos vários tratamentos nos dia 12, 22 e 32 após o início do experimento.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação Taxonômica do Peixe-Zebra	15
Tabela 2- Estágios de vida do zebrafish. Adaptado de “Zebrafish: A Practical Approach” ...	18
Tabela 3- Composição química da ração com inclusão de Chlorella.....	30
Tabela 4- Análises químicas dos ingredientes utilizados na dieta experimental com Chlorella.	30
Tabela 5- Composição percentual da ração com inclusão de Spirulina.	30
Tabela 6- Análises químicas dos ingredientes utilizados na dieta experimental com Spirulina.	31
Tabela 7- Composição e ingredientes da Ração Comercial (dados obtidos a partir do fabricante). SI = sem informação disponível.....	31
Tabela 8- Composição da Artêmia Liofilizada; Resultados expressos em 100% da matéria seca (MS); Análises feitas em duplicata, sendo expresso o valor médio. Dados determinados pela EsalqLab, Departamento de Zootecnia; Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ; Universidade de São Paulo – USP.	32
Tabela 9- Valores médios das características físico-químicos da água.....	32

SUMÁRIO

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	14
2.2 Larvicultura de peixes.....	17
2.3 Utilização de alimento vivo na larvicultura de peixes.....	18
2.4 Utilização de microalgas na alimentação de peixes.....	21
2.4.1 <i>Chlorella</i>	22
2.4.2 <i>Spirulina</i>	23
2.5 Alimentação para larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Preceitos éticos.....	27
3.2 Descrição dos métodos.....	27
3.2.1 Reprodução e manutenção dos embriões.....	27
3.2.2 Desenho experimental e tratamentos.....	28
3.2.3 Cultivo de alimento vivo.....	32
3.2.4 Processo de liofilização dos náuplios de artêmia.....	33
3.2.5 Amostragem.....	34
3.2.6 Determinação da taxa de sobrevivência e crescimento das larvas.....	35
3.3. Análise histológica de musculatura esquelética.....	36
3.3.1 Coleta, fixação e inclusão do material em parafina.....	36
3.3.2 Corte das amostras.....	36
3.3.3 Desparafinação.....	36
3.4 Registro fotográfico.....	36
3.5 Análises estatísticas.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Determinação da taxa de sobrevivência e crescimento das larvas.....	37
4.3 Análise histológica de musculatura esquelética nas diferentes dietas.....	42
5 CONCLUSÃO.....	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O zebrafish (*Danio rerio*) tem sido amplamente utilizado como modelo animal em pesquisas científicas das mais diversas áreas da biomedicina a toxicologia. É uma espécie que apresenta genoma inteiramente sequenciado, fácil manejo reprodutivo, alta prolificidade, ovos transparentes, fecundação externa e importante semelhança genética com humanos (JONES, 2007). Além disso, caracteriza-se por ser uma das espécies ornamentais preferidas pelos aquarofilistas, sendo possível serem mantidos em aquários comunitários devido ao seu pequeno tamanho. Apesar do aumento da sua utilização como modelo biológico nos laboratórios e para fins ornamentais, existem poucas informações sobre suas exigências nutricionais (ULLOA, 2011), evidenciando a importância de novos conhecimentos nessa área, fundamentais para o crescimento e bem-estar adequados desta espécie.

A alimentação dos peixes em cativeiro necessita ser priorizada com base nas exigências individuais de cada espécie, uma vez que a mesma interfere em todas as respostas biológicas dos animais. O aumento da demanda por essa espécie para fins científicos e econômicos fundamenta a importância por pesquisas para a realização de protocolos alimentares adequados à sua criação na larvicultura. A fase inicial dos peixes apresenta dificuldades principalmente relacionadas à sua alimentação, ocasionando altas taxas de mortalidade nas pisciculturas. A criação de zebrafish em laboratórios ocorre de forma semelhante, já que são observadas altas taxas de mortalidade para esta espécie, principalmente nas fases iniciais do seu desenvolvimento. O fornecimento de alimento de alto valor nutricional associado à frequência de alimentação são parâmetros importantes para garantir uma boa taxa de sobrevivência e crescimento satisfatório (FURUYA et al., 1999; FERNANDES et al., 2002; JOMORI et al., 2005; LUZ e PORTELLA, 2005; SILVA, 2008; ZUANON et al., 2011).

São escassas as pesquisas que buscam por informações a fim de garantir o fornecimento de dietas que atendem aos requerimentos nutricionais do zebrafish. Além disso, estes estudos são direcionados preferencialmente as fases juvenis e adultas, e minimizados à fase larval. Inicialmente a alimentação das larvas de zebrafish ocorre por uma combinação de alimentos vivos como o *Paramecium sp.* ou rotíferos. Em seguida, a dieta destas larvas baseia-se na utilização de náuplios de artêmia complementada com ração formulada (LAWRENCE et al., 2011).

Com base no exposto, objetiva-se avaliar diferentes protocolos de alimentação utilizando alimento vivo e inerte para larvas de zebrafish (*Danio rerio*), avaliando o

desempenho zootécnico e parâmetros morfométricos e avaliação de hipertrofia e hiperplasia da musculatura esquelética.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

O *Danio rerio* é pertencente à família Cyprinidae (NELSON, 1994), classificada como a maior família de peixes de água doce, com mais de 2000 espécies. O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo de água doce, originário do sul da Ásia, nativo dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal que são regiões caracterizadas por estações com secas e chuvas acentuadas. É um peixe comumente encontrado em regiões alagadiças, águas rasas, paradas ou de baixa movimentação, com grande ocorrência de oscilações de pH e temperatura. Por este motivo, o zebrafish é considerado um peixe extremamente resistente às variações no que diz respeito à qualidade da água. Sua tolerância às variações ambientais associado a sua alta prolificidade, tornaram esta espécie popular na aquariofilia (ENGESZER et al., 2007; OLMEDA; SANCHEZ, 2011). A classificação taxonômica do peixe-zebra está representada na Tabela 1.

Figura 1 – Zebrafish (*Danio rerio*)



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 1- Classificação Taxonômica do Peixe-Zebra

Zebrafish	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Teleostei
Ordem	Cypriniformes
Família	Cyprinidae
Gênero	Danio
Espécie	Danio Rerio

Fonte: Integrated Taxonomic Information System (ITIS)

São peixes que podem alcançar até 5 cm de comprimento, e apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos caracterizados por apresentar o corpo mais esguio se comparado ao corpo das fêmeas (MAACK; SEGNER, 2003; SPENCE et. al., 2008). Outra característica comumente observada são as fêmeas serem maiores que os machos, tendo o corpo com forma arredondada, uma vez que na sua cavidade abdominal estão alojados os ovos que darão origem à futuros embriões.

O zebrafish possui hábito alimentar onívoro, e, portanto, se alimentam de uma grande variedade de alimentos. Na natureza se alimentam preferencialmente de zooplânctons e insetos, podendo se alimentar também de algas e alguns materiais orgânicos. (DUTTA, 1993; MOYLE; CECH, 2000; ENGESZER et al., 2007). Outra característica evidenciada no zebrafish é a anatomia da sua boca que por sua vez é posicionada para cima, de forma a auxiliar na apreensão e sucção dos alimentos. (LAWRENCE; HARPER, 2010).

A espécie *Danio rerio* é considerada gregária, ou seja, necessitam viver em cardumes de até 20 indivíduos, e isso possibilita que eles assumam condições favoráveis a seu bem-estar. Entretanto, apesar de ser uma espécie social, podem desempenhar comportamentos agonistas entre indivíduos do mesmo sexo ou entre sexos diferentes. Esse comportamento é evidenciado no período reprodutivo ou em processos de dominância hierárquicas (LAWRENCE; HARPER, 2010).

Os estágios de desenvolvimento do zebrafish são caracterizados pela fase larval, juvenil e adulta. A fase larval é considerada o período em que as larvas alcançam até aproximadamente 28 dias pós fertilização (dpf), a fase juvenil se inicia entre 28 a 31 dias pós fertilização e se finaliza aos 90 dias, determinando assim, o início da fase adulta. A fase

juvenil se caracteriza por apresentar crescimento exponencial e alterações morfológicas (PARICHY et al., 2009). Enquanto durante a fase adulta, os peixes apresentam crescimento quase estagnado, podendo chegar de 4 a 5 cm por volta de 2 a 3 anos (SINGLEMAN; HOLTZMAN, 2014).

O fotoperíodo regular é importante quando estes peixes são mantidos em ambientes artificiais, pois ele auxilia na manutenção dos processos fisiológicos, bioquímicos, comportamentais e reprodutivos do zebrafish, uma vez que é um peixe tipicamente diurno, e realiza suas atividades principalmente nas primeiras horas da manhã (WESTERFIELD, 2000).

Em seu habitat natural, a reprodução do zebrafish ocorre principalmente no início do dia, em períodos chuvosos que são caracterizados por abundância de alimentos. A reprodução ocorre em águas rasas, paradas e de vegetação densa e os ovos ficam alojados no fundo dos rios, em razão da espécie não apresentar cuidado parental (LAWRENCE; HARPER, 2010). Em uma mesma desova, a fêmea pode eclodir de 200 a 300 ovos, e se mantidos em boas condições, este ciclo pode se repetir de 5 a 7 dias. São peixes que atingem a maturação sexual precocemente, com cerca de 3 a 6 meses (HILL et al., 2005).

O zebrafish é amplamente difundido como modelo biológico na pesquisa, apresentando cerca de 70% de semelhança genética com os mamíferos (JONES; RACHEL, 2007), além disso, constituem estudos nas áreas de ecotoxicologia (RICHARD et al., 2004; BOYLE et al., 2010), neurociências (LEUNG et al., 2013; ARREBERG; DRIEVER, 2013), comportamento (KERMEN et al., 2013; MAASWINKEL et al., 2013; MORIN et al., 2013; PORTUGUES et al., 2014;), genética (HOWE et al., 2013), nutrição (FLYNN et al., 2009; ULLOA et al., 2011; MADDISON; CHEN, 2012; YOKOBORI, et al., 2012; ULLOA et al., 2014), aquicultura (DAHM; GEISLER, 2006; ULLOA et al., 2011; ULLOA et al., 2014), entre outros. Suas características são notáveis não apenas pelos pesquisadores, mas também por criadores com fins ornamentais. São peixes que possuem embriões grandes e transparentes, permitindo visualização de todo o desenvolvimento embrionário, além disso, são animais que apresentam pequeno tamanho, isso corrobora para a disposição de pequenos espaços em laboratórios para sua manutenção. São animais com curto intervalo de geração, sendo responsáveis por produção constante de ovos, desencadeando em proles numerosas, que apresentam fecundação externa; (GRUNWALD; EISEN, 2002; CLARK, 2003; MULLER; GROSSNIKLAUS, 2010; LAWRENCE et al. 2012; NÜSSLEIN-VOLHARD, 2012). Por sua vez, dispõem de ferramentas moleculares e informações genômicas, que podem auxiliar nos

estudos envolvendo as áreas de toxicologia, neurobiologia, comportamentais entre outros. (JOHNSTON et al., 2008; KALUEFF et al., 2014).

Na literatura existem poucos estudos enfatizados em estabelecer as exigências nutricionais do zebrafish em suas diferentes fases de desenvolvimento. Uma dieta apropriada para cada espécie é, então, essencial para a manutenção de peixes em cativeiro, de modo a promover um crescimento ótimo e uma ocorrência mínima de mortalidade. Isto acarretará em melhor qualidade do peixe cultivado e maior rendimento para o produtor ornamental ou para fins científicos. Por este motivo, é importante o conhecimento a respeito das necessidades nutricionais básicas desta espécie (LAWRENCE, 2007; LIU et al., 2013).

Em cativeiro o zebrafish pode ser facilmente alimentado com alimentos vivos como, por exemplo, *Artemia* sp. e *Brachionus* sp. (WATANABE et al., 1983). Ulloa et al. (2011), a partir disso, realizaram estudos que sugerem que o zebrafish é capaz de se adaptar e inclusive modificar o seu sistema digestório em função da dieta fornecida. Isso demonstra a possibilidade de criação de protocolos alimentares capazes de se ajustarem à fisiologia do seu sistema digestório, associando ao seu comportamento no momento da alimentação.

2.2 Larvicultura de peixes

Apesar dos avanços tecnológicos e estudos baseados na larvicultura de peixes, esta é ainda uma fase caracterizada por apresentar dificuldades e entraves, uma vez que ainda se tem pouco conhecimento sobre as preferências individuais de cada espécie, particularmente relacionadas com a sua alimentação (ATENCIO-GARCIA, ZANIBONI FILHO, 2006; GANDRA, 2010). O não suprimento das necessidades nutricionais das larvas pode ocasionar altas taxas de mortalidade, levando dessa forma a baixos índices de produtividade (LANDINES-PARRA, 2003; PORTELLA; DRABROWSKI, 2008). A larvicultura é um ponto crítico na produção dos peixes, e a oferta de alimento de alto valor nutricional associado à frequência alimentar são parâmetros importantes para garantir uma boa taxa de sobrevivência e crescimento satisfatório (FURUYA et al., 1999; FERNANDES *et al.*, 2002; JOMORI *et al.*, 2005; LUZ e PORTELLA, 2005; SILVA, 2008; ZUANON *et al.*, 2011).

O estágio larval do zebrafish tem início cerca de 48 a 72 horas pós fertilização, neste período, essas larvas possuem cerca de 3,5 mm de comprimento. Ao longo do tempo, as larvas desenvolvem e inflam suas bexigas natatórias, possibilitando sua alimentação com pequenos zooplânctons. Alguns autores definem o período larval com 28 dias pós fertilização e nestas circunstâncias, as larvas se desenvolvem alcançando até 7 mm. Essas larvas recém

eclodidas permanecem em águas rasas durante o seu desenvolvimento e à medida que avançam e atingem a maturação, migram para águas mais profundas. (LAWRENCE; HARPER, 2010).

Na tabela 1, estão apresentados os estágios de desenvolvimento do corpo do zebrafish de acordo com seu comprimento, descrevendo os eventos que ocorrem ao longo da idade.

Tabela 2- Estágios de vida do zebrafish. Adaptado de “Zebrafish: A Practical Approach”.

Estágio (dias)	Comprimento (mm)	Descrição
Larva jovem	3,5	Nada livremente, posicionamento vertical
Larva	6	Bexiga natatória cheia, procura alimento, crescimento
Juvenil	10	Nadadeiras e pigmentação dos adultos
Adulto jovem	20	Reprodução
Adulto	40-50	Final da vida

Fonte: NÜSSLEIN-VOLHARD C. (2002)

Segundo Kaushik et al., (2011), além do zebrafish ser utilizado como modelo no desenvolvimento biológico, suas larvas apresentam ausência de canibalismo entre elas, e facilidade em buscar alimentos inertes, essas características o tornam um peixe com potencial para ser utilizado em estudos de protocolos alimentares para outras espécies.

2.3 Utilização de alimento vivo na larvicultura de peixes

São inúmeras espécies de peixes produzidas no Brasil e dentre estas espécies, existe uma classificação da larvicultura quanto ao desenvolvimento do trato digestivo e das enzimas secretadas no intestino logo após a eclosão destas larvas. Pode-se classificá-las em dois grupos: trato digestivo completo e trato digestivo rudimentar. Aquelas larvas que possuem sistemas digestivos rudimentares, imaturos ou pouco desenvolvidos na primeira fase de vida são mais difíceis de alimentar e frequentemente necessitam de alimentos vivos como parte de suas dietas. Já as espécies que possuem tratos digestivos completos, possuem menor ou nenhum problema com a alimentação inicial. A alimentação na fase de larvicultura é baseada no uso de alimento vivo natural ou cultivado (RADUNZ-NETO, 1999). No entanto, quando se trata de alimentos artificiais, há uma baixa aceitação na fase inicial pela maioria dos peixes. A pequena porcentagem de peixes que aceitam estes alimentos artificiais nas fases iniciais muitas vezes apresenta crescimento reduzido, resultando futuramente em problemas no seu desenvolvimento. No início do seu desenvolvimento, as larvas apresentam elevadas

exigências nutricionais devido a altas taxas de crescimento. Desta forma, a alimentação deve suprir esses requerimentos nutricionais da espécie (HUNG et al.,1989). Na literatura, são relatados vários experimentos com pós larvas de espécies brasileiras e têm demonstrado a importância e a necessidade de alimento vivo durante a larvicultura (SENHORINI; MENDONÇA, 1997; LUZ et al., 2001; GUERRERO-ALVARADO, 2003; FRACALOSSO et al., 2004). O alimento vivo é atrativo às larvas devido a estímulos visuais e químicos, e dessa forma, atribui melhores resultados de sobrevivência e crescimento, sendo estes obtidos em função da elevada aceitabilidade e conseqüente maior consumo (ORTEGA, 2000). Além do fator nutricional, as larvas de peixes diferem morfológicamente dos adultos, apresentando pequeno tamanho, pouca habilidade natatória, aparelho digestório ainda rudimentar e ausência de enzimas digestivas (LEIS; TRNSKI, 1989; KUBITZA,1997).

A partir da espécie de peixe escolhida para criação na larvicultura, se seleciona os organismos que serão utilizados como alimentos vivos que mais se adequam àquelas larvas, considerando o tamanho adequado, valor nutritivo e a facilidade de cultivo (BARROS; VALENTI, 2003).

É através da escolha de uma dieta apropriada que se garantem altas taxas de sobrevivência e crescimentos satisfatórios das larvas. Além de fornecer os alimentos que suprirão as necessidades nutricionais destas larvas, é necessário atentar as dimensões do alimento fornecido. O zebrafish principalmente se tratando do seu estado larval, possui uma capacidade de abertura bucal limitada, com aproximadamente 100 µm. Isso salienta o fato de que é essencial que os alimentos fornecidos respeitem o tamanho da abertura bucal destas larvas, dessa forma, o alimento consegue ser capturado e ingerido de forma eficiente (LAWRENCE, 2007).

Diferentes espécies de microalgas, rotíferos, copépodes, nematoides, *Artemia* sp., entre outros grupos taxonômicos podem ser utilizados como alimentos vivos para larvas de peixes (SORGELOS et. al., 1993; WATANABE; KIRON, 1994; FURUYA et. al., 1999; CÓRDOVA et. al., 2010). A escolha pelo melhor alimento vivo a ser utilizado vai depender da sua disponibilidade, custo de produção, valor nutricional e tamanho adequado àquela espécie de peixe.

Um alimento vivo há muito tempo preconizado nos setores de larvicultura é a *Artemia* sp. São inúmeras as qualidades que a tornam um organismo potencial como alimento para larvas desde a década de 1930. Este microcrustáceo possui alto valor nutricional (LEGER et. al., 1987), disponibilidade em forma de cistos e náuplios, facilitando o seu armazenamento e utilização. Uma vez que, estes cistos são ovos resistentes, tolerantes a desidratação por longos

períodos (PRIETO; ATENCIO, 2008; SANTANGELO, 2009). A *Artemia* sp. é um microcrustáceo de ambientes salinos, e seus cistos podem ser facilmente adquiridos no mercado por um fornecedor idôneo (WEINGARTNER; ZANIBONI FILHO, 2004). O primeiro estágio larval das artêmias é chamado de náuplio. Trata-se de um importante estágio para muitas larvas de peixes e crustáceos, uma vez que fornece proteínas, energia, além de vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados essenciais, pigmentos e esteróis (HEMAISWARYA et.al, 2011). Em seu estado adulto chegam a medir 17 a 18 mm (HOSHIBA, 2007), e possuem movimentação relativamente lenta, facilitando desta forma sua captura e ingestão. As artêmias apresentam alto valor de enzimas proteolíticas e substâncias benéficas à pós larva (LEE; OSTROWSKI, 2001). São organismos que se destacam também pela facilidade de sua produção em laboratório (BASILE-MARTINS et al., 1986; VERISCHELE et al.,1990; KOLKOVSKY et al.,1997), e por possuírem tecnologia de cultivo conhecida (BEUX et al., 2003). Apesar das inúmeras vantagens, como as artêmias são obtidas diretamente da natureza, a disponibilidade dos cistos é imprevisível. Dessa forma, ocorrem oscilações em sua disponibilidade e preço de compra de acordo com a queda na oferta do mercado (PRIETO; ATENCIO, 2008). Outro fator limitante, se refere a alta mortalidade destes microcrustáceos em ambientes com baixa salinidade, levando a prejudicar a qualidade da água. (LOPES, 2007).

Quando se trata de espécies de peixes cujas pequenas larvas recém eclodidas possuem certa dificuldade de ingerir os náuplios de artêmia, pode se optar por rotíferos do gênero *Brachionus* spp, que também são alimentos vivos muito utilizados. Estes representam um avanço na aquicultura, e podem ser oferecidos para larvas de peixes de água doce ou peixes de água salgada. Sua facilidade de cultivo em grande escala associado a capacidade de bioencapsulação, o tornam um alimento amplamente empregado nas fases larvais iniciais (FAO, 1998). Estes organismos aquáticos podem viver em ambientes de água doce, salgada e águas salobras (DHERT, 2001) sendo considerada uma espécie eurialina. Além do seu tamanho diminuto que facilita sua oferta no início da alimentação larval, possui baixa mobilidade, o que facilita sua captura e visualização pelas larvas.

Existem diferentes seres vivos que podem ser utilizados como alimento vivo, desde pequenos organismos, alguns microscópicos a organismos maiores, pertencentes ao zooplâncton por exemplo. Todos eles auxiliando no fornecimento de nutrientes essenciais para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das larvas de peixes. (FURUYA et al., 1999; MARTÍNEZ et al., 2010).

2.4 Utilização de microalgas na alimentação de peixes

Os alimentos vivos utilizados na larvicultura como microalgas, zooplânctons e outros organismos, são produzidos em diferentes fases e etapas. Alguns autores como Nandini et al. (2011), Fallahi et al. (2011), Xuwang et al. (2011) estudaram a utilização de microalgas verdes na alimentação dos peixes, e demonstraram que seu uso pode ser benéfico por se tratar de um alimento rico nutricionalmente.

Algumas características quando presentes tornam desejáveis as utilizações das microalgas na aquicultura, por exemplo, quando apresentam, alta taxa de crescimento, fácil cultivo, ser atóxica, apresentar forma e tamanho adequados para ser capturada e ingerida pelo animal de interesse, caso constatados a presença de parede celular, ser digestível ou ausente, facilitando assim o acesso aos nutrientes contidos.

A base da cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos é composta por microalgas, estas são em sua maior parte, autotróficas, fotossintéticas, além de absorverem e metabolizarem nutrientes dissolvidos na água (CHRISTI, 2008; HEMAISWARYA et al., 2011). Além disso, pequenas variações no cultivo destas microalgas como: temperatura, nitrogênio e CO₂ podem desencadear alterações na composição destas microalgas (UGWU et al., 2008; VOLTOLINA et al, 2008; TONON et al., 2002; LI et al., 2007).

Na década de 1970, pesquisadores da Universidade de São Paulo iniciaram os primeiros estudos com cultivo de microalgas diatomácea. Nesta época, se iniciavam as primeiras coleções de microalgas marinhas e de água doce. Entretanto, somente a partir dos anos 80 é que os cultivos realmente começaram a se expandir por pesquisadores e universidades.

A utilização das microalgas na alimentação humana e animal vêm obtendo resultados satisfatórios como suplementos nutricionais. As microalgas são ricas em diversos nutrientes, como proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, sais minerais, pigmentos, enzimas, entre outros metabólitos biologicamente ativos (BOROWITZKA, 1988; GOUVEIA et al., 2008; SPOLAORE et. al., 2006). Em conjunto, estas características, tornam a microalga um excelente alimento para os organismos aquáticos. Além disso, podem ser fornecidas aos organismos que serão utilizados na alimentação da larvicultura como forma de enriquecer o conteúdo nutricional destes organismos, suplementando esta alimentação será oferecida às larvas (MORRIS et al, 1999; CHAKRABORTY et al., 2007).

Espécies de microalgas dos gêneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Chlamydomonas* são muito empregadas na aquicultura para alimentação de animais de água

doce, principalmente microcrustáceos zooplancctônicos (BOERSMA; VIJEVERBERG 1996; MICHELS; MEESTER, 1998; SIPAÚBA et al., 2001; MARTÍNEZ et al., 2007; WANG et al., 2009; NANDINI et al., 2009; NANDINI et al., 2011; FLORES et al., 2011; FALLAHI et al., 2011; XUWANG et al., 2011). E as principais microalgas cultivadas comercialmente e que possuem potencial de cultivo bem difundido são as espécies dos gêneros *Chlorella* (*Chlorophyceae*) e *Spirulina* (*Cyanophyceae*) (BECKER, 2004).

Trabalhos realizados com algumas espécies de crustáceos utilizados como alimento vivo na aquicultura, mostraram que quando sua alimentação se apresentava enriquecida com microalgas verdes tais como, *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Pseudokirchneriella subcapitata*, seu desenvolvimento se tornou acelerado. (BARRERA et al., 2007; DUMONT; ADRIAENS, 2009; BRITO et al., 2009; SRIPUTHORN; SANOAMUANG, 2010; BRITO et al., 2010; BRITO et al., 2011).

A substituição de até 75% da farinha de peixe na dieta de *Litopenaeus vannamei* pela microalga *Arthrospira platensis*, anteriormente chamada *Spirulina platensis*, apresentou resultados quanto à melhora no sistema imune deste camarão (SANCHO et al., 2014).

2.4.1 *Chlorella*

O gênero *Chlorella*, foi descrito por Beyerinck em 1890, e é um gênero de algas verdes unicelulares, presentes em águas continentais, com ampla distribuição geográfica (SIPAÚBA et al., 2009; MOHAN et al., 2009), pertencentes ao Filo Chlorophyta. A origem do termo *Chlorella* provém do grego *chloros*, que significa verde e do sufixo *ella*: pequeno. Esta espécie de microalga é caracterizada como sendo a espécie com maior quantidade do pigmento clorofila e durante o seu crescimento, é capaz de acumular nutrientes essenciais responsáveis pelo desempenho do organismo. Esta microalga tem se destacado entre os pesquisadores por sua elevada produção de biomassa (CHISTI, 2007; KONG et al., 2010; MATA et al., 2010).

No início dos anos 1960, o Japão através da empresa Nihon Chlorella iniciou em grande escala uma cultura de *Chlorella*. (SPOLAORE et al., 2006). Atualmente, os estudos com o cultivo de microalgas continuam evidenciados, pelas abrangentes aplicações e potenciais produtos provenientes deste tipo de cultivo (SUALI; SARBATLY, 2012).

Na literatura existem estudos que comprovam que a utilização de determinadas microalgas confere uma maior sobrevivência para as pós larvas de algumas espécies. Faria et

al., (2001), comprovaram essa maior taxa de sobrevivência em pós larvas de tilápia do Nilo utilizando algumas microalgas.

Nos setores aquícolas, estas microalgas têm surtido papel de destaque, por corresponderem a um gênero de microalgas fornecedoras dos nutrientes necessários à dieta dos organismos aquáticos, além de serem facilmente digeridas, e conseqüentemente, desempenhando papel no ganho de peso destes animais (KIM, et al., 2002; LOURENÇO, 2006; BADWAY et al., 2008; XU et al., 2014).

Em sua composição, a *Chlorella* sp. possui aproximadamente 60% de proteínas, sendo observada a presença de vários aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais gorduras, carboidratos, água e fibra dietética. Esta microalga também dispõe de uma substância denominada Fator de Crescimento de Chlorella, que é composta por pigmentos, tocoferol e componente ativo como antimicrobianos e antioxidantes. Desta forma, é eminente que a utilização de microalgas na alimentação é considerada eficaz (SYAHRUL, 2016).

Diversos estudos foram realizados incluindo algas em dietas de peixes, a *Chlorella* utilizada como suplemento alimentar desempenha efeitos benéficos em vários aspectos tais como: imunidade, atividade oxidante, crescimento e reconstrução tecidual (GUZMAN, et al., 2001). Foi comprovada a inclusão dietética de 5 a 15% de *Chlorella* atuando na proteção de tilápias do Nilo contra estresses oxidativos (ZAHARAN; RISHA, 2014). Como foi observado para *Cyprinus Carpio*, a suplementação com *Chlorella* sp. desempenha papel importante na estimulação do seu sistema imune (KHANI, et al., 2017). Estes resultados não são apenas observados em peixes, estudos realizados com frangos de corte, com dietas enriquecidas com Chlorella, obtêm-se melhora no ganho de peso corporal, características imunológicas e produção de bactérias *Lactobacillus* na microflora intestinal destes animais (KANG et al., 2013).

2.4.2 Spirulina

As *Arthrospira*, são espécies de cianobactérias pertencentes ao filo Cyanobacteria (MARLES et. al., 2011), e recentemente foram designadas como pertencentes a espécie *Arthrospira* sp. No passado, eram consideradas cianobactérias membros da espécie *Spirulina* sp., e com esta atual mudança taxômica, ainda são comumente e comercialmente denominadas como Spirulina. São espécies que ocorrem naturalmente em ambientes de águas doces e salgadas (BOLD; WYNNE, 1985), e como todas as cianofíceas, necessitam de luz no ambiente para desempenharem o seu processo de crescimento (RICHMOND, 1990). Na

literatura podem ser encontradas como cianobactérias, e trata-se de organismos procariotos fotossintetizantes, sendo as espécies mais comumente utilizadas na dieta a *S. máxima*, *S. platensis*, *S. fusiformis*. Estas cianobactérias já são cultivadas em diversos países para fins comerciais (CENCIC; CHINGWARU, 2010; FDA, 2017).

Esta espécie é amplamente distribuída na natureza e extremamente tolerantes às variações ambientais, podendo sobreviver em estado latente por longos períodos e retomar seu desenvolvimento normal (COZZA, K.L.; COSTA, J.A.V, 2000).

Estas desempenham papel inclusive como fonte de alimento e suplemento em programas espaciais da NASA (National Aeronautics and Space Administration) (SHWETA et al., 2011). Sua utilização vem sendo preconizada desde a década de 1970 na aquicultura, tendo foco na piscicultura (RICHMOND, 2004).

As spirulinas são organismos ricos em minerais, proteínas, antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, entre outros compostos, que os tornam extremamente desejados para a indústria como suplemento dietético (KEPEKÇI et al., 2013; NGO-MATIP et al., 2014).

Além de sua utilização na indústria alimentícia, também são explorados como agentes terapêuticos (RICHMOND, 2004), atuando como modulador do sistema imunológico (RAVI et al., 2010), regulador da resposta alérgica (PAO et al., 2005; CINGI et al., 2008) e atuando para o aumento na absorção intestinal de vitaminas e minerais (TSUCHIHASHI, 1987). Possuem espaço no mercado de biopigmentos, antioxidantes, enzimas, diversos fármacos, e são instrumentos de pesquisa no tratamento de águas residuais (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; MEZZOMO, et al., 2010).

Uma avaliação detalhada visando identificar a qualidade dos produtos da Spirulina, seria possível através de uma análise dos seus constituintes, o seu teor de proteína que é até 70%, ácidos graxos essenciais, aminoácidos essenciais, vitaminas, antioxidantes, pigmentos, clorofila e polissacarídeos (OLIVEIRA et al., 1999; BABADZHAYOV et al., 2004; AKBARNEZHAD et al, 2016).

A *Spirulina platensis*, cianobactéria filamentosa pertencente à família *Phormidiaceae*, apresenta características que despertam interesse de sua utilização na aquicultura (GUROY et al., 2012). Benjamin et al., (2013), avaliaram o efeito da dieta de *S. platensis* na taxa de desempenho de reprodução em fêmeas de zebrafish (*Danio rerio*) e os efeitos de *S. platensis* na sobrevivência de larvas de peixes e observaram que as larvas alimentadas exclusivamente com *S. platensis* apresentaram baixa taxa de sobrevivência, fato que pode ser justificado pela pouca atratividade e disponibilidade em que a *S. platensis* foi ofertada às larvas. Por outro

lado, as larvas alimentadas com a *Spirulina* sp. de forma encapsulada e associada a outros compostos alimentares, apresentaram altas taxas de sobrevivência. As características como a cor, tamanho, disponibilidade e atratividade presentes nesta forma encapsulada de *Spirulina* sp., foram fundamentais para que as larvas conseguissem capturar e ingerir este alimento prontamente.

O enriquecimento com *Spirulina* sp. nos alimentos de juvenil de esturção (*Acipenser baeri*) alcançou resultados satisfatórios, aumentando a taxa de crescimento, taxa de conversão alimentar e eficiência protéica dos juvenis de esturção quando comparado a dieta controle sem a presença da *Spirulina* sp. (PALMEGIANO et al., 2005).

Em um trabalho realizado com tilápias (*Oreochromis niloticus*), Lu et al. (2004), avaliaram as taxas de ingestão e assimilação de três espécies de microalgas: *A. platensis*, *Euglena gracilis* e *Chlorella vulgaris*, e observaram que a espécie de microalga *A. platensis* apresentou as melhores taxas de ingestão e assimilação pelas larvas de tilápia. Este mesmo resultado foi observado para outras espécies.

Na dieta de tilápias (*Oreochromis niloticus*), estas microalgas ricas em ácidos graxos poli-insaturados se destacam como suplementos alimentares, uma vez que estimulam o sistema imunológico destes animais (Lu et al., 2002; REGUNATHAN; WESLEY, 2006; MOREIRA et al., 2010; MOREIRA et al., 2011), reduzem as mortalidades e aumentam a taxa de crescimento dos peixes (LU; TAKEUCHI, 2004).

Na literatura os estudos com a utilização de microalgas têm se destacado, e a *Spirulina* sp. exibindo características favoráveis na alimentação humana e animal, tem se tornado foco nas pesquisas com dietas na aquicultura.

2.5 Alimentação para larvas de zebrafish (*Danio rerio*)

Conforme a pesquisa e utilização do zebrafish (*Danio rerio*) nas ciências biológicas alcançam crescimento exponencial, os estudos com novos métodos para criação de larvas de zebrafish se mantiveram de forma estagnada. Isto desencadeia essencialidade pela busca por instruções sobre protocolos e métodos para criação e alimentação destas larvas, surtindo efeitos positivos no crescimento e sobrevivência, que futuramente serão observados na disponibilidade e desempenho do animal adulto.

A escassez por informações na literatura sobre as exigências nutricionais e alimentação do zebrafish (LAWRENCE, 2007; KAUSHIK et al., 2011), determina uma criação embasada nos protocolos disponíveis para Cyprinidae, família ao qual este grupo de

peixes é pertencente (WESTERFIELD, 2007; KAUSHIK, 2011). Entretanto, isso gera uma preocupação, pois dificulta a padronização de um protocolo de criação em diferentes instalações (WATTS et al., 2012; WILSON, 2012).

O fornecimento de uma nutrição adequada é importante não só para estabelecer altas taxas de crescimento e sobrevivência (LAWRENCE, 2007), como também contribui para alcançar sucesso reprodutivo (BRENDAN; DELBOS, 2011), uma vez que afeta diretamente a aptidão da prole (MARKOVICH et al., 2007).

A alimentação do zebrafish tradicionalmente ocorre por uma combinação de alimentos vivos e alimentos formulados. Os 5 a 7 primeiros dias após a fertilização (dpf), a alimentação das larvas acontece através de suas reservas vitelínicas. Após o esgotamento destas reservas, se inicia o fornecimento de alimentação exógena. As larvas de zebrafish são comumente alimentadas com *Paramecium* sp. ou rotíferos até 9-15 dpf. Em seguida, a dieta destas larvas baseia-se no uso de náuplios de artêmia complementada com ração formulada (LAWRENCE et. al., 2011; REED; JENNINGS, 2011).

As características presentes na alimentação viva como: alta digestibilidade, encorajamento ao comportamento de captura de presas, perfil nutricional, palatabilidade (REED; JENNINGS, 2011), apesar de serem benéficas na criação da larvicultura, necessitam ser suplementadas a outros alimentos (HARPER, LAWRENCE, 2011; MEHRAD et al., 2012).

Pesquisas recentes foram publicadas baseadas nos requisitos nutricionais do zebrafish com o objetivo de encontrar um protocolo de alimentação adequado às necessidades nutricionais dessa espécie (SICCARDI et al., 2008; BRENDAN; DELBOS, 2011; YOSSA et al., 2011; GONZALES, 2012; WATTS, et al., 2012; ULLOA et al., 2013). Apesar disso, estes estudos se concentram na busca por um protocolo otimizado principalmente para as fases juvenis e adultas, desprezando a alimentação da fase larval.

Farias et al., (2016), compararam a utilização de três rações comerciais (ZM, Zeigler Larval AP100 e Skretting Gemma Micro) em três diferentes linhagens de larvas de zebrafish, com três diferentes regimes de alimentação a partir do 9º dpf (somente ração comercial, ração comercial associada a alimentação viva e apenas alimentação viva) e observaram que os melhores resultados foram obtidos com o uso de ração comercial combinada à alimentação viva. Da Silva et al., (2009), utilizou quatro regimes alimentares consistindo em rotíferos, náuplios de artêmia e alimento inerte (Cyclop-eeze™ e BeneluxNV), e os dados obtidos sugeriram que os rotíferos não alcançaram resultados satisfatórios quanto aos parâmetros zootécnicos desta espécie, sendo demonstrado este mesmo resultado quando utilizados

náuplios de artêmia nos primeiros dias pós fertilização na dieta destas larvas. Já a associação entre alimentos demonstrou-se favorável ao desenvolvimento nas fases iniciais do zebrafish.

Martínez et al., (2012) testou diferentes regimes alimentares para larvas de zebrafish, com o objetivo de estabelecer métodos alternativos e simplistas para a criação destas larvas nas diferentes localidades, de forma a estabelecer um método bem sucedido com o fornecimento de alimento comercial durante a primeira semana de alimentação, em sequência de fornecimento de náuplios de artêmia recém eclodida durante as semanas seguintes.

Segundo alguns autores, a frequência da oferta de alimentação é outro ponto crítico na fase larval a ser ressaltado, quando comparadas larvas de zebrafish alimentadas com cinco refeições diárias, quatro refeições diárias, duas refeições, diárias e uma refeição diária, o tratamento que estabelecia quatro refeições diárias mostrou os melhores resultados quanto a taxa de sobrevivência e conversão alimentar (NEKOUBINI et al., 2013). Isso fundamenta a importância da realização de pesquisas para o desenvolvimento de protocolos alimentares atentando às necessidades nutricionais nas diferentes fases de criação do zebrafish.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preceitos éticos

Este experimento foi realizado seguindo as diretrizes de bem-estar animal, sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais protocolo nº 108/18 da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Descrição dos métodos

3.2.1 Reprodução e manutenção dos embriões

As larvas de zebrafish (*Danio rerio*) foram obtidas através de reprodutores do Biotério Central, UFLA. Os reprodutores encontravam-se na proporção de 2 fêmeas: 1 macho, em um conjunto de 9 animais, totalizando 81 reprodutores. Após a ocorrência da fecundação, os ovos foram coletados utilizando uma pipeta de pasteur e adicionados em meio egg water, em placas de petri (100 embriões por placa), e finalmente encaminhados para a estufa à 28°C, por onde permaneceram até completarem 7 dias pós fertilização (dpf). O meio egg water consiste em

um meio o qual permite a padronização do desenvolvimento embrionário do zebrafish, além de evitar contaminações por fungos (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, e 0,1% de azul de metileno (DI PRINZIO et al., 2010).

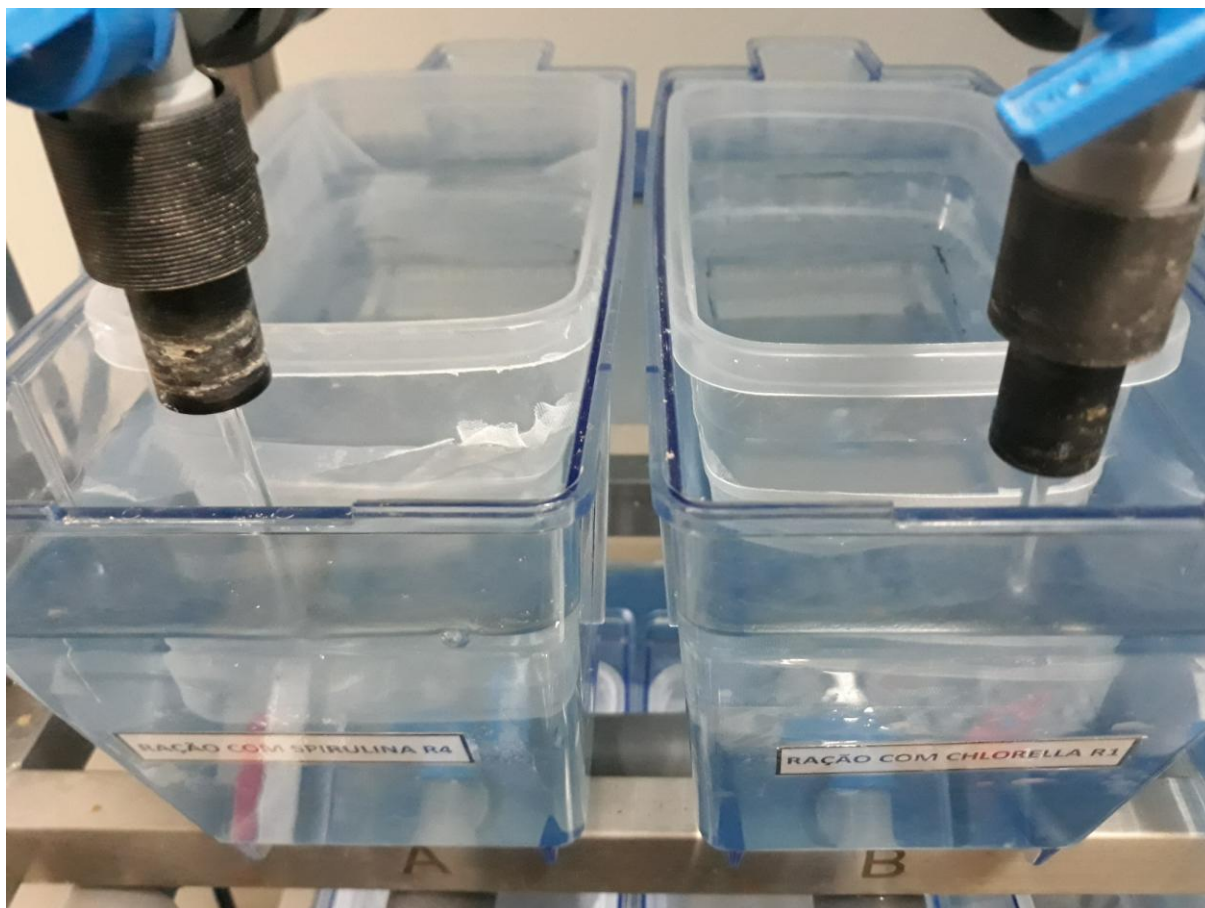
Durante a permanência dos embriões na estufa, ocorreu a eclosão dos ovos com cerca de dois a três dias (dfp), em seguida, estes ovos recém eclodidos deram origem às larvas, que permanecem em período lecitotrófico, sendo assim, sua alimentação é obtida através de suas reservas vitelínicas, portanto não é necessário o fornecimento de uma dieta artificial. No sétimo dia pré-experimental (dpf), as larvas foram distribuídas nos aquários de experimentação. Após a transferência para as unidades experimentais, foram monitoradas para constatação de presença de mortalidades, para que fosse possível a reposição destas larvas antes de iniciar o período experimental.

3.2.2 Desenho experimental e tratamentos

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo utilizadas 45 larvas por tratamento, totalizando 900 larvas experimentais. No 8º dpf as larvas foram distribuídas aleatoriamente em 20 aquários com 1 L⁻¹ de volume útil, em uma densidade de 45 animais/L⁻¹.

As larvas utilizadas foram mantidas sob fotoperíodo artificial de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão e temperatura ambiente média de 28° C, tal como sugerido por Westerfield et al., (2007). Estes animais foram condicionados em incubadoras fabricadas manualmente em potes de plástico de 1,2L com uma malha de 150 mm colada ao fundo deste pote. Os potes foram colocados dentro de cada aquário da Rack Hydrus da Alesco, onde ocorrem constantes trocas e renovações de água, com presença de filtro físico e biológico responsáveis pela manutenção da qualidade da água, além de um sistema de ultravioleta para esterilização do sistema. Cada aquário da rack possui 3L de volume de água e monitoramento de variáveis como pH, temperatura e condutividade. As incubadoras acopladas dentro de cada aquário foram mantidas com 1 litro de água na densidade de estocagem de 45 peixes/litro, 45 peixes por aquário (Figura 2).

Figura 2 – Sistema de recirculação de água de cultivo das larvas zebrafish utilizadas, onde se mantiveram os espécimes dos 8 aos 40 dpf.



Fonte: Do autor (2019).

Foram adotados 5 tratamentos, cada um correspondente a uma dieta específica, sendo estas dietas fracionadas em 6 alimentações ao dia (8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas e 18 horas). As dietas experimentais foram divididas em: Náuplios de artêmia: (A); Artêmia liofilizada (AL); Ração com Chlorella: (RCh); Ração com Spirulina: (RSp); Ração Comercial: (RC).

As quantidades diárias de alimento foram às seguintes: 0,02754g/tratamento/dia dos tratamentos AL, RCh, RSp e RC e 4590 náuplios de artêmia/tratamento/dia para o tratamento A (MARTÍNEZ et. al., 2012; FARIA et. al., 2016).

A composição das alimentações e as análises químicas dos ingredientes utilizados na dieta experimental correspondentes aos alimentos inertes são observados nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

Tabela 3- Composição química da ração com inclusão de Chlorella.

Ingredientes	Quantidade	Unidade
Farelo de soja	59,4462	-
Milho	31,8208	-
Farinha de peixe	3	-
Fosfato bicálcio	2,3478	-
Alga Chlorella	2	-
Óleo de soja	0,3013	-
Sal comum	0,5	-
PREMIX	0,5	-
Cálcario	0,0639	-
BTH	0,02	-

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 4- Análises químicas dos ingredientes utilizados na dieta experimental com Chlorella.

Componente nutricional	Quantidade	Unidade
Proteína bruta	32,96	%
Energia bruta	4032,0001	Kcal
Ácido linoleico	1,2286	%
Amido	27,2984	%
Cálcio	0,9	%
Cinzas	7,3059	%
Fósforo total	0,9	%
Gordura	2,4973	%
Lisina total	1,8842	%
Metionina total	0,4622	%

Matéria seca - % (MS): 89,90; Proteína bruta - % (PB): 31,50; Extrato etéreo - % (EE): 2,90; Matéria mineral - % (MM): 8,23; Resultados expressos em 100% da matéria seca (MS). Análises foram feitas em duplicata, sendo expresso o valor médio. Dados determinados pela EsalqLab, Departamento de Zootecnia; Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ; Universidade de São Paulo – USP.

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 5- Composição percentual da ração com inclusão de Spirulina.

Ingredientes	Quantidade	Unidade
Farelo de soja	59,4462	-
Milho	31,8208	-
Farinha de peixe	3	-
Fosfato bicálcio	2,3478	-
Alga Spirulina	2	-
Óleo de soja	0,3013	-
Sal comum	0,5	-
PREMIX	0,5	-
Cálcario	0,0639	-
BTH	0,02	-

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 6- Análises químicas dos ingredientes utilizados na dieta experimental com Spirulina.

Componente nutricional	Quantidade	Unidade
Proteína bruta	32,96	%
Energia bruta	4032,0001	Kcal
Ácido linoleico	1,2286	%
Amido	27,2984	%
Cálcio	0,9	%
Cinzas	7,3059	%
Fósforo total	0,9	%
Gordura	2,4973	%
Lisina total	1,8842	%
Metionina total	0,4622	%

Matéria seca - % (MS): 88,97; Proteína bruta - % (PB) : 32,57; Extrato etéreo - % (EE) : 2,78; Matéria mineral - % (MM): 8,54; Resultados expressos em 100% da matéria seca (MS)

Análises foram feitas em duplicata, sendo expresso o valor médio. Dados determinados pela EsalqLab, Departamento de Zootecnia; Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ; Universidade de São Paulo – USP.

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 7- Composição e ingredientes da Ração Comercial (dados obtidos a partir do fabricante). SI = sem informação disponível.

Composição/Ingredientes	Quantidade	Unidade
Farelo de soja	SI	-
Farinha de peixe	SI	-
Creme de milho	SI	-
Farinha de lula	SI	-
Adsorvente de micotoxinas	SI	-
Leveduras	SI	-
Óleo de soja refinado	SI	-
Espirulina desidratada	SI	-
Corantes naturais (cochonilha, urucum, cúrcuma)	1,54	%
Proteína isolada de soja	SI	-
Óleo de peixe	SI	-
Fécula de mandioca	SI	-
Beterraba desidratada	SI	-
Farinha de minhoca	SI	-
PREMIX	0,85	%
Aditivo prebiótico	0,09	%
Cloreto de sódio	SI	-
Antioxidantes (BTH)	SI	-
Aditivo enzimático	0,05	%

Matéria seca - % (MS): 92,00; Proteína bruta - % (PB): 45,70; Extrato etéreo - % (EE): 11,60; Matéria mineral - % (MM): 11,20

Resultados expressos em 100% da matéria seca (MS)

Análises foram feitas em duplicata, sendo expresso o valor médio, Dados determinados pela EsalqLab, Departamento de Zootecnia; Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ; Universidade de São Paulo – USP.

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 8- Composição da Artêmia Liofilizada; Resultados expressos em 100% da matéria seca (MS); Análises feitas em duplicata, sendo expresso o valor médio. Dados determinados pela EsalqLab, Departamento de Zootecnia; Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ; Universidade de São Paulo – USP.

Composição	Quantidade	Unidade
Matéria seca	84,5	%
Proteína bruta	58,7	%
Extrato etéreo	18,3	%
Matéria mineral	0,33	%

Fonte: Do autor (2019).

O experimento foi realizado em sistema de recirculação de água. Para análises referentes à qualidade da água, diariamente foram obtidos resultados através do monitoramento em tempo real no sistema de rack Hydrus da Alesco, além disso, foram utilizados aparelhos para mensuração das variáveis de pH com pHmetro digital e amônia kit Labcon®) (Tabela 8). Procedeu-se a renovação da água pelo sistema de recirculação de água da rack, além ocorrer constantemente a retirada de restos de alimentos presentes na superfície das incubadoras, bem como larvas mortas e fezes, através da sifonação.

Tabela 9- Valores médios das características físico-químicos da água.

Parâmetros	Médias ±
Temperatura (°C)	28,1 ± 0,04
pH	7,8 ± 0,05
Salinidade (mS)	0,3 ± 0
Amônia (ppm)	0 ± 0

Parâmetros físico-químicos da qualidade da água mensurados diariamente em todos os tratamentos.

Fonte: Do autor (2019).

3.2.3 Cultivo de alimento vivo

Para utilização do alimento vivo proposto em um dos tratamentos do desenho experimental, foi necessário o cultivo de cistos de artêmia. Este alimento vivo é bastante utilizado e descrito na aquacultura, por seus ótimos resultados no desempenho da criação na larvicultura (DHERT, et al., 1996).

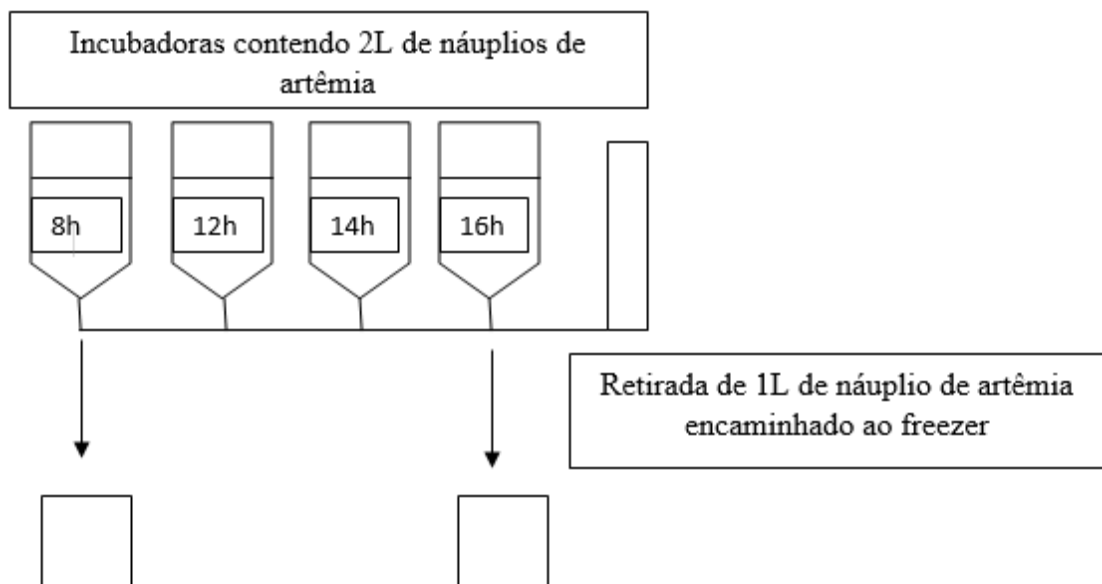
Os cistos de artêmia foram obtidos do fabricante Artêmia Salina do RN. Na manhã anterior à alimentação das larvas, eram preparadas quatro culturas em diferentes horários,

com o objetivo de fornecer náuplios de artêmia no dia seguinte que estariam com 24 horas pós eclosão.

Em laboratório, foram pesados 4g de cistos e 60g de sal para dois litros de água em cada incubadora, contendo aeração e temperatura controladas constantemente. Os cistos de artêmia foram colocados para incubar, entre 17-24 horas. Após eclosão dos náuplios, estes foram filtrados por uma peneira de 200 μm e lavados com água corrente, e finalmente utilizados na alimentação das larvas no devido horário estabelecido no experimento.

Nas alimentações de 8h e 16h, a quantidade de 1L de náuplios de artêmia era coletado e acondicionado ao freezer para ser utilizado nas alimentações de 10h e 18h (figura 5), desta forma, a baixa temperatura presente no freezer, ocasiona em diminuição do metabolismo dos náuplios de artêmia, e conseqüentemente impossibilita que estes náuplios alcancem estágios seguintes do seu desenvolvimento, e, portanto, quando ofertados, estavam com aproximadamente o mesmo tamanho e teor de nutrientes dos náuplios contendo 24 horas pós eclosão.

Figura 3 – Incubadoras de náuplios de artêmia para cada horário de oferta de alimentação das larvas.



Fonte: Do autor (2019).

3.2.4 Processo de liofilização dos náuplios de artêmia

A liofilização consiste em uma desidratação, a fim de preservar alimentos perecíveis, princípios ativos, bactérias, entre outros. Neste processo, a água é retirada de forma a não

passar pelo estado líquido e condições como baixa pressão e temperatura, tornam-se determinantes para a preservação dos nutrientes do alimento.

No laboratório do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Lavras, foi utilizado o liofilizador de modelo L101, com o propósito de produzir artêmia liofilizada.

Na semana anterior ao início do experimento, foram realizadas produções de náuplios de artêmia com 24 horas pós eclosão, que foram lavados em água corrente e adicionados a recipientes de vidro, para serem congelados no freezer antes do processo de liofilização. Após o total congelamento, os recipientes de vidro contendo os náuplios de artêmia foram encaminhados ao laboratório dentro de uma caixa de isopor e então colocados no liofilizador.

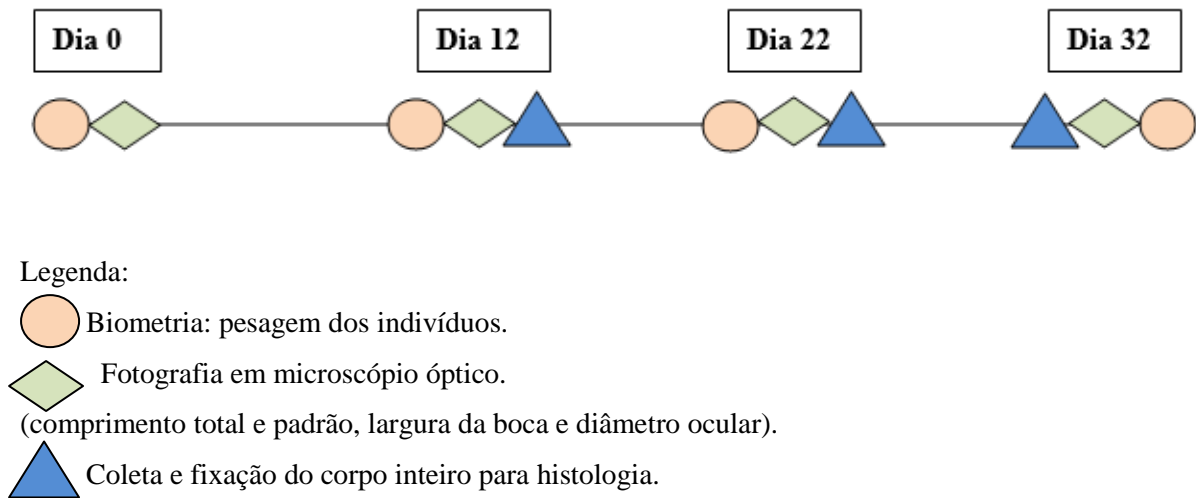
Os recipientes ao serem condicionados no liofilizador sofreram uma aplicação de vácuo associados a um aumento gradativo de temperatura, ocasionando em uma redução da pressão. Isso permite que a artêmia congelada no material passe do estado líquido para o estado sólido, sem que sejam comprometidos os componentes nutricionais do alimento.

Após 24 horas em processo de liofilização, às amostras foram retiradas, devidamente tampadas para evitar a presença de umidade, e então encaminhadas para serem retiradas dos recipientes e adicionadas aos devidos recipientes correspondentes ao tratamento.

3.2.5 Amostragem

Nos dias 0, 12, 22 e 32 durante o período experimental, procedeu-se à amostragem de um grupo de 8 indivíduos de cada um dos 5 tratamentos para posteriores análises. Os exemplares foram anestesiados e sacrificados com Tricaína e fixados em 4% paraformaldeído (PFA –, Sigma) durante 24 horas e posteriormente condicionados à álcool 70% até o dia em que foram levados para processamento histológico. A figura 4 ilustra as análises efetuadas com relação aos dias experimentais.

Figura 4 – Representação das análises feitas nos tratamentos e os demais dias em que estas análises foram efetuadas.



Fonte: Do autor (2019).

3.2.6 Determinação da taxa de sobrevivência e crescimento das larvas

A mortalidade foi determinada diariamente, pela contagem de larvas mortas ao final de cada dia. O crescimento foi avaliado pela determinação do comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), largura da boca (LB) e diâmetro ocular (DO) de 8 larvas de cada tratamento recolhidas aos 0, 12, 22 e 32 dias a partir do início do experimento. Foi utilizado um microscópio óptico na objetiva 4X para visualização das larvas e do software Motic Image Plus® para fotografar cada larva e posteriormente mensuração das variáveis: CT, CP, LB e DO. As mensurações das variáveis de crescimento foram efetuadas através do software Motic Image Plus®, no qual após ser calibrado de acordo com a objetiva 4X em que os animais foram fotografados, é possível por meio de uma régua presente no software, calcular o crescimento de um ponto à outro das demais variáveis em mm. O CT e CP no dia 32 experimental, foi obtido através de um paquímetro digital, pois os animais já apresentavam um tamanho considerável à fim de ser utilizado outro instrumento para medição. Para a biometria inicial, as larvas foram pesadas em balança analítica digital com precisão de 0.0001g, em grupo (n=40) e em seguida, foi calculado o peso médio total. Para as biometrias seguintes (12, 22 e 32 dias após início do experimento), as larvas foram pesadas na mesma balança utilizada na biometria inicial, em grupo de 8 indivíduos de cada tratamento, totalizando 40 animais em cada dia de biometria.

3.3. Análise histológica de musculatura esquelética

3.3.1 Coleta, fixação e inclusão do material em parafina

Os animais correspondentes às semanas de coletas nos dias: 12, 22 e 32 após o início do experimento foram fixados com corpo inteiro em 4% paraformaldeído (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Uma vez fixadas por 24 horas, às amostras foram transferidas para álcool 70%, onde permaneceram até a inclusão. A substância utilizada foi a parafina e como esta substância é insolúvel em água, foi necessário que na primeira etapa de inclusão, ocorresse uma desidratação, para que a água dos tecidos fosse retirada e substituída por álcool. Esta desidratação ocorreu através de uma série crescente alcoólica por 20 minutos em cada álcool: 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. Em seguida, o álcool foi substituído por xilol, e finalmente, a impregnação, por meio do qual o xilol é substituído pela parafina propriamente dita.

3.3.2 Corte das amostras

Foram, então, feitas secções de 3-4 μm , com orientação longitudinal. As fitas obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. Em seguida, estas foram secas a 40 °C e armazenadas até posterior utilização.

3.3.3 Desparafinação

Antes da utilização das secções para a análise posterior, estas foram sujeitas a um processo desparafinação. Foi, então, aplicado um processo de banhos graduais para remoção da parafina e, uma vez que o xilol não dilui em água, uma série de banhos com etanol para hidratação das amostras. Após a microtomia, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

3.4 Registro fotográfico

Após o processamento histológico, foram realizadas as capturas de imagens em microscópio biológico de 40X, o registro fotográfico foi feito com o equipamento CX-31,

acoplado a uma câmera digital modelo Olympus SC30. Foram capturadas imagens das larvas de corpo inteiro em posição longitudinal, e mensurados o comprimento e o diâmetro das fibras musculares.

3.5 Análises estatísticas

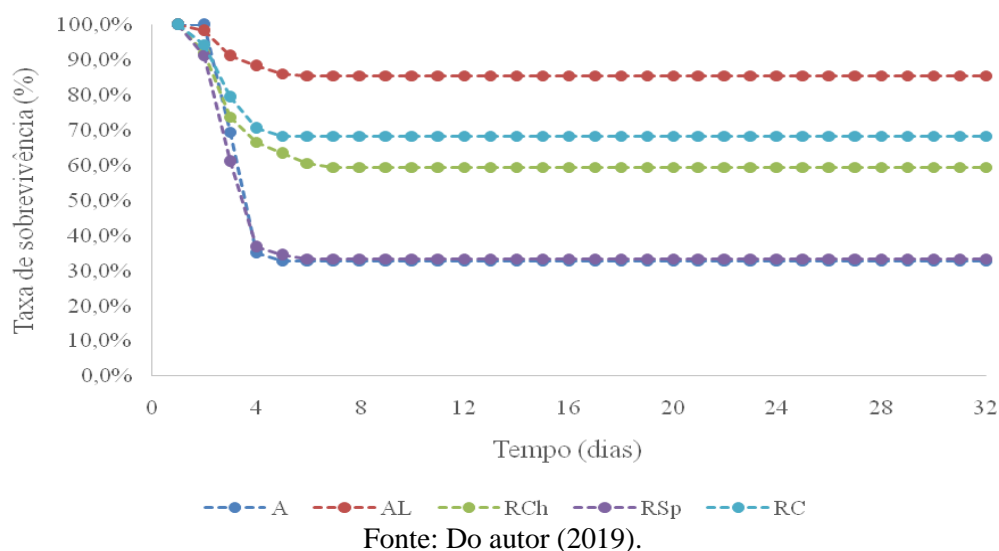
Os dados referentes aos parâmetros morfométricos, desempenho zootécnico e análises histológicas foram submetidos aos testes de normalidade e, como não foi constatada distribuição normal, procedeu-se o Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, não paramétrico. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R 3.2.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da taxa de sobrevivência e crescimento das larvas

De um modo geral, em todos os tratamentos verificou-se um pico de mortalidade entre os 0 e 4 dias após o início do experimento (dpe) (Figura 6). Existiram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) deste parâmetro entre os tratamentos, sendo Náuplios de Artêmia (A) e Ração com Spirulina (RSp), as dietas que apresentaram uma mortalidade superior aos demais tratamentos aos 4 dpe (cerca de 70%). É importante destacar que esta elevada mortalidade impediu a continuação dos tratamentos com amostragem suficiente para as consecutivas biometrias, este resultado infere que estas dietas não são consideradas adequadas à serem utilizadas no início da alimentação das larvas de zebrafish. A dieta Artêmia Liofilizada (AL) foi a que apresentou valores mais altos de sobrevivência (~ 90%) e as dietas Ração com Chlorella (RCh) e Ração Comercial (RC) mantiveram as taxas de sobrevivência (60% e 70%) ao longo do experimento.

Figura 5 – Taxa de sobrevivência das larvas de zebrafish (*Danio rerio*), dados obtidos diariamente (dia 0 à 32 experimental) de acordo com as dietas utilizadas nos tratamentos.



Nas fases iniciais de desenvolvimento do zebrafish (*Danio rerio*), sua alimentação é estabelecida através da utilização de alimentos vivos como por exemplo, náuplios de artêmia, rotíferos e, ainda, paramécias (LAWRENCE, 2007; WESTERFIELD, 2007). Segundo demonstraram alguns autores, o uso de alimentos processados e/ou inertes é limitado na criação de larvas desta espécie (CARVALHO et al., 2006; GOOLISH et al., 1999), assim como em outros teleósteos (BLAIR et al., 2003). Relativamente aos parâmetros de sobrevivência, os dados obtidos neste trabalho sugerem que os náuplios de artêmia (A) utilizados individualmente não constituem um alimento adequado ao desenvolvimento das larvas de zebrafish, tendo sido obtidos valores mínimos de sobrevivência.

A qualidade da água manteve-se dentro dos parâmetros considerados normais, portanto a elevada mortalidade devido a este fator não foi considerada. A produção de peixes ornamentais nas fases iniciais é enfatizada por vários autores, pela utilização de náuplios de artêmia, por apresentar grande valor nutricional (EARLE, 1995; SOARES et al., 2000; LIM et al., 2003). Contudo, a produção e uso desta fonte de alimento natural deve ser limitada a animais com capacidade de captura deste alimento através do tamanho da abertura de sua boca. De acordo com Takahashi et al. em 2010, utilizando exemplares de pós-larvas de acará bandeira *Pterophyllum scalare*, os animais alimentados com dieta exclusivamente de náuplios de artêmia, apresentaram maiores valores de sobrevivência (~98,2%), em contrapartida, o peso final foi observado em animais cujo tratamento foi através de dieta inerte em flocos.

Resultados encontrados por Carvalho et al., 2006, foram semelhantes, as larvas de zebrafish criadas em tanques, obtiveram maiores taxas de sobrevivência (~86%) no tratamento no qual a dieta consistia de náuplios de artêmia. Os parâmetros de sobrevivência obtidos em peixes alimentados com náuplios de artêmia no presente trabalho não vão de encontro aos obtidos por Carvalho et al. 2006. Este fato pode estar relacionado a outros parâmetros de cultivo, tais como o sistema de cultivo e a densidade. Apesar de Carvalho et al. 2006 também utilizarem um sistema de recirculação de água desde o início do tratamento, os animais eram mantidos em tanques, portanto a recirculação de água não ocorria da mesma forma de um sistema de rack, onde ocorre intensa troca de água. Desta maneira, é possível a ocorrência de uma maior permanência destes náuplios de artêmia nos tanques à fim de serem capturados, além da possível presença de outros microorganismos. Os melhores resultados quanto à taxa de sobrevivência (~ 90%) foram observados no tratamento onde se fornecia a artêmia liofilizada (AL), pois apesar de ter sofrido o processo de liofilização, suas características como coloração, odor e perfil nutricional permaneceram. Estas características são consideradas atrativas às larvas e promovem aceitabilidade e conseqüente captura deste alimento, alcançando resultados satisfatórios quanto à sobrevivência e desenvolvimento.

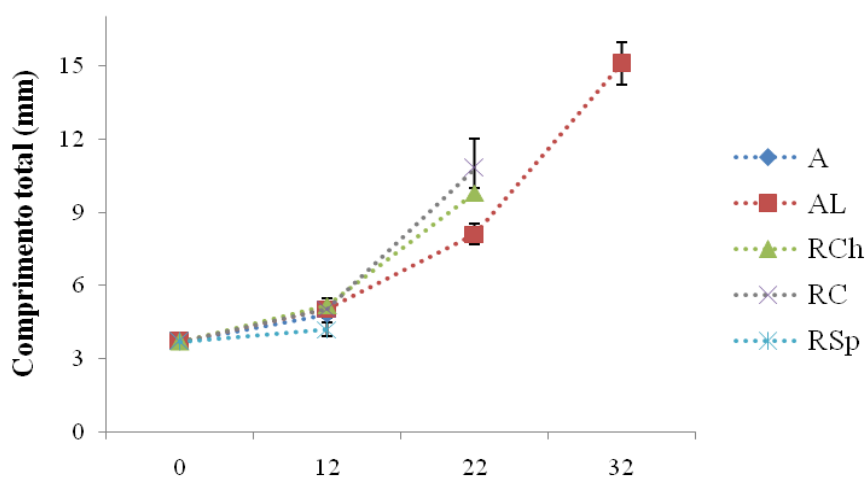
Considerando os dados de biometria que permitem avaliar o efeito da dieta ao nível do crescimento, verificaram-se diferenças evidentes nos comprimentos entre tratamentos. A dieta A apresentou comprimentos significativamente inferiores aos 12 dias após início do experimento ($p < 0.05$), exceto no que diz respeito ao diâmetro ocular comparativamente às dietas AL, RSp e RCh (figura 7) e abertura da boca, RC, RCh e RSp (figura 8) aos 12 dias. A e RC não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$) nesta idade, relativamente a todas as medidas efetuadas.

Nesta etapa, a dieta RC apresentou maior comprimento ($p < 0.05$) seguida da dieta RCh. Verificou-se uma ligeira diferença ($p < 0.5$) na dieta AL, apresentando o comprimento menor das dietas testadas. Esta diferença foi mais acentuada nas biometrias anteriores, tendo o tratamento AL como o único tratamento onde foi possível a coleta de amostras no último dia experimental, nos tratamentos RC e RCh não haviam mais animais, portanto, não foram feitas as análises biométricas (CT, CP, AB e DO). Assim como em outros trabalhos, o uso de alimentos inertes pode trazer resultados positivos, como no caso de *Lates calcarifer* (Bloch), no qual Curnow et al., 2006, mostraram o uso desnecessário de artêmia na transição alimentar para dietas comerciais. Porém, a exclusão completa de alimento vivo não revelou resultados positivos na mesma espécie.

Apesar dos resultados negativos quanto à sobrevivência nos tratamentos com alimentos inertes nas fases iniciais de desenvolvimento, as variáveis de comprimento (CT, CP, AB, DO) foram significativamente positivas até os 22 dias após o início do experimento. A incapacidade de apreensão e palatabilidade de alimentos inertes no início da alimentação exógena das larvas de zebrafish, ocasionou desta forma, em altas taxas de mortalidade. Segundo autores, existem resultados positivos em termos de crescimento e sobrevivência, na utilização de dietas mistas em alimento vivo e alimento inerte em outras espécies (CAÑAVATE et al., 1999) e também no zebrafish (ÖNAL et al., 2000). Estes autores mostraram que o uso complementar de rações microparticuladas com náuplios de artêmia, podem produzir bons resultados quanto ao crescimento ou a sobrevivência.

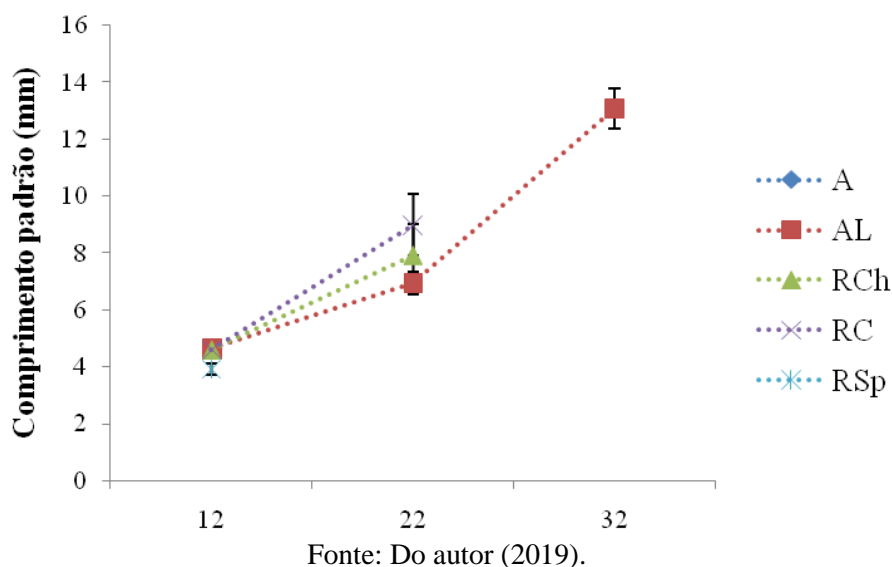
O tratamento de ração com chlorella (RCh) apresentou diferenças significativas aos 12 dias após o início do experimento ($p < 0,05$) quando comparado ao tratamento com a outra microalga adicionada à ração (RSp) quanto as variáveis de crescimento (CT, CP, DO) e sobrevivência. Dados positivos com a adição da microalga Chlorella também foram observados por Shi, et al, 2017, onde investigaram os efeitos de substituição da farinha de peixe pela farinha de Chlorella com suplementação dietética de celulase, avaliando as variáveis de crescimento, atividades enzimáticas digestivas, histologia e expressão de genes miogênicos em juvenis de carpa *Carassius auratus*. Os resultados mostraram que a farinha de Chlorella poderia substituir totalmente a farinha de peixe nas dietas, com aumento significativo do crescimento, utilização de alimentos, atividade da amilase e a expressão de Myod, Mrf4 e Myf5 para carpa.

Figura 6 – Comprimento total médio dos peixes dos vários tratamentos aos 12, 22 e 32 após o início do experimento.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 7 – Comprimento padrão médio dos peixes dos vários tratamentos aos 0, 12, 22 e 32 após o início do experimento.



Aos 12 dias, o tratamento RC seguido ao tratamento A, obtiveram melhores resultados em relação ao diâmetro ocular de seus animais. A dieta AL, apresentou seus dados de diâmetro ocular reduzidos comparativamente aos tratamentos anteriores, porém o resultado foi superior quanto aos tratamentos RCh e RSp (figura 9). A dieta RC, continua a destacar-se com relação ao diâmetro ocular aos 22 dias, seguida de RCh e AL. Contudo, aos 12 dias, a dieta AL obteve maiores resultados em relação as dietas RC e RCh quanto ao parâmetro de abertura da boca. A abertura da boca é um dos primeiros aspectos a serem levados em consideração na alimentação da larvicultura. A ausência de conhecimento em relação às dimensões da boca das larvas da espécie estudada pode desencadear em um fornecimento de partículas grandes se tratando de alimentos inertes ou presas grandes quanto a alimentos vivos para as larvas ingerirem, proporcionando altas taxas de mortalidade por subnutrição. Isso remete a idéia de que estas larvas conseguiram capturar o alimento, e que estes alimentos além de serem de tamanho adequados à abertura da boca das larvas de zebrafish, forneciam os nutrientes suficientes às necessidades nutricionais da espécie, e desta forma, a dieta AL proporcionou resultados positivos quanto às taxas de sobrevivência.

Os dados de sobrevivência obtidos sugerem que ocorre um período crítico, no desenvolvimento das larvas de zebrafish, entre os 10 e os 14 dpf, portanto um estudo aprofundado sobre a alimentação e demais cuidados até estes dias descritos torna-se importante, de modo a conhecer as vulnerabilidades da espécie em cativeiro.

Figura 8 – Diâmetro médio ocular dos peixes dos vários tratamentos aos 0, 12, 22 e 32 após o início do experimento.

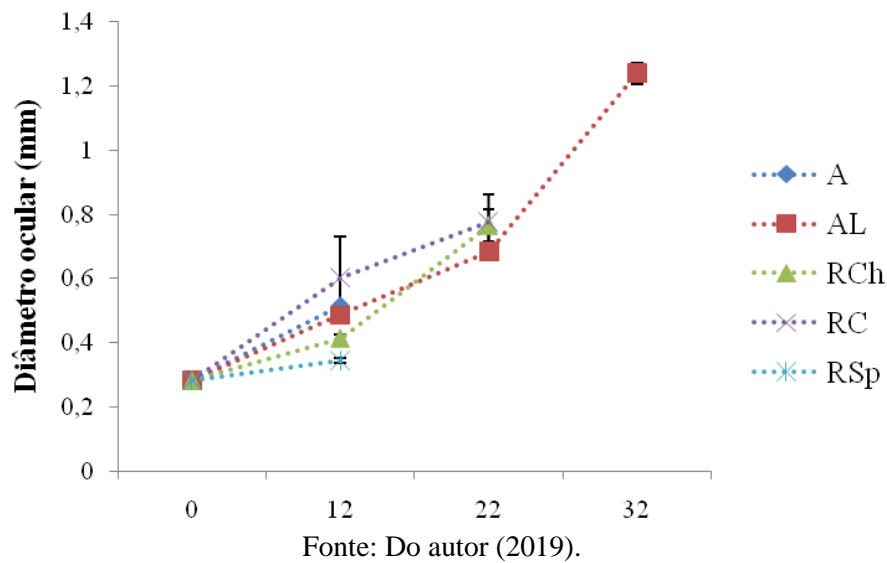
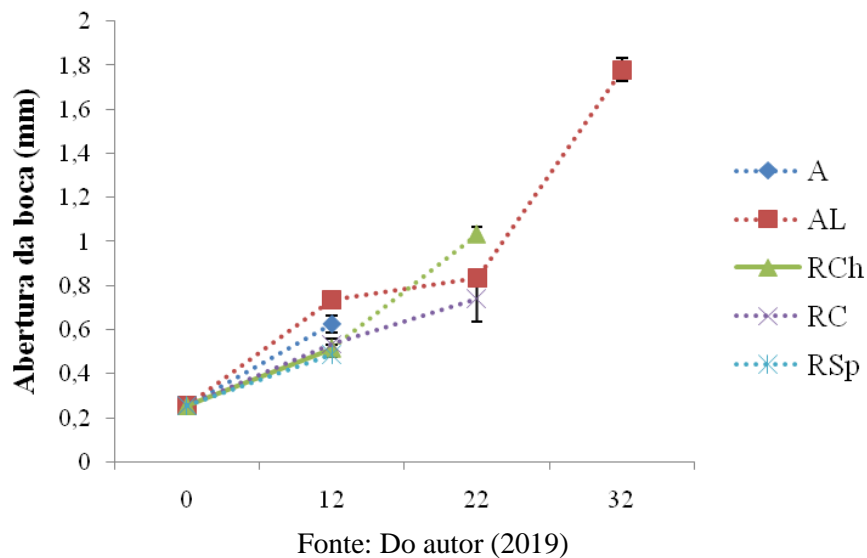


Figura 9 – Abertura média da boca dos peixes dos vários tratamentos aos 0, 12, 22 e 32 após o início do experimento.



4.3 Análise histológica de musculatura esquelética nas diferentes dietas

O processo de formação das fibras musculares é denominado miogênese, em peixes esse processo ocorre durante a fase de embriogênese (JOHNSTON, 1980; CURRIE; INGHAM, 2001). A ocorrência do crescimento muscular é caracterizada por dois processos: a hiperplasia e hipertrofia. Na hipertrofia ocorre aumento do volume das fibras musculares, enquanto a hiperplasia ocorre pelo aumento no número de fibras, sendo o último dividido em

hiperplasia estratificada e em mosaico (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; DALPAI-SILVA et al., 2007). A hiperplasia estratificada ocorre devido ao aumento da espessura de camadas musculares a partir de zonas germinais de proliferação celular, sendo predominante na fase larval dos peixes teleósteos (JOHNSTON, 2006). Já a hiperplasia em mosaico ocorre principalmente na fase juvenil dos peixes. Na hipertrofia, as células satélites se fundem com fibras musculares existentes e conseqüentemente, contribuindo para o aumento no diâmetro das fibras (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001).

Existem fatores determinantes como: fatores bióticos e abióticos, temperatura, fotoperíodo, regime alimentar e composição da dieta, que são responsáveis pela taxa de crescimento e tamanho que a espécie atingirá (JOHNSTON, 2006).

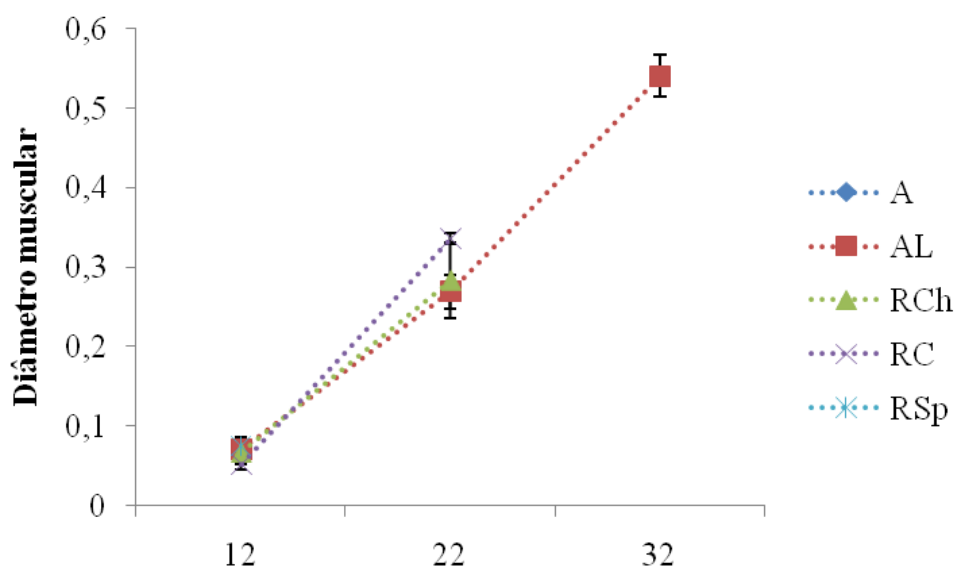
Como demonstrado na figura 14, os maiores valores de diâmetro da musculatura esquelética foram vistos na dieta RC e RCh aos 22 dias, respectivamente, seguidos pelo tratamento em que a dieta consistia em AL, onde apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o tratamento RCh. Aos 32 dias as análises eram correspondentes à apenas o tratamento AL, uma vez que os demais tratamentos não obtiveram animais suficientes para as análises descritas.

A alimentação na larvicultura é fundamental que se estabeleça fornecendo todos os nutrientes essenciais às exigências da espécie. Esta importância do fornecimento de nutrientes está associada ao rápido crescimento e desenvolvimento que as larvas de peixes apresentam. Desta forma, os alimentos proporcionados devem ser ricos em proteínas e energia, a fim de promover o crescimento das larvas, além de vitaminas e minerais. Estudos sugerem que larvas que passam por esta alimentação adequada, a sua fase de proliferação dos mioblastos pode ser mais longa, e desta maneira, favorece o maior recrutamento de células musculares (LEITÃO et al., 2011).

Pesquisadores objetivando produzir e avaliar dietas microencapsuladas, comparadas a tratamentos controle (náuplios de artêmia e dieta comercial) para larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*, analisaram as alterações morfológicas do trato digestório e celularidade do músculo esquelético dos animais, além da expressão de genes relacionados com a miogênese e crescimento muscular desempenhadas pelos tratamentos. As análises histológicas demonstraram atraso no desenvolvimento de alguns tecidos dos animais alimentados com as dietas microencapsuladas, assim como na musculatura esquelética. Além dos animais alimentados com dietas microencapsuladas apresentarem mudanças nos diâmetros das fibras musculares comparativamente à animais alimentados com náuplios de artêmia e dieta comercial (LEITÃO et al., 2013).

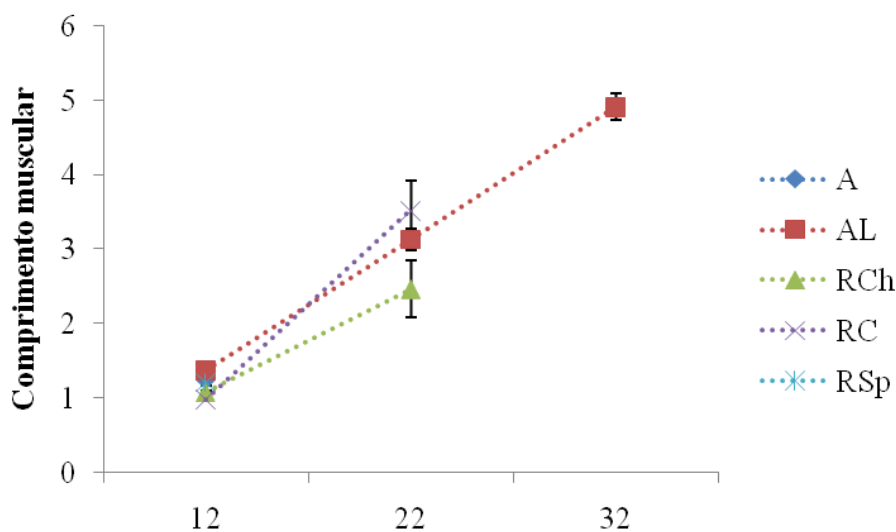
Além do tipo de alimentação sofrer influência em mudanças na estrutura das fibras musculares, o jejum também pode desencadear estes tipos de alterações nas fases iniciais de desenvolvimento dos peixes, sendo elas: alterações morfológicas do trato digestório (GISBERT et. al., 2004; MENOSSI et. al., 2012), desempenho e crescimento muscular (LEITÃO et. al., 2011). Kojima et. al., 2012 determinaram o ponto-de-não retorno (PNR) de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e avaliaram o impacto de diferentes períodos de jejum sobre a taxa de sobrevivência, crescimento, desenvolvimento muscular e o crescimento compensatório após diferentes períodos de restrição nas primeiras fases de desenvolvimento. E as análises morfológicas e morfométrica das fibras musculares dos peixes nesse experimento demonstraram redução do diâmetro das fibras dos animais após os períodos de jejum no momento em que ocorre redução do peso das mesmas. Após o restabelecimento da alimentação, a síntese de proteínas aumenta e o crescimento muscular é retomado (HORNICK et al., 2000).

Figura 10 – Valores do diâmetro da musculatura esquelética (mm) dos vários tratamentos nos dia 12, 22 e 32 após o início do experimento.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 11 – Valores de comprimento da musculatura esquelética (mm) dos vários tratamentos nos dia 12, 22 e 32 após o início do experimento.



Fonte: Do autor (2019).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a dieta constituída por artêmia liofilizada apresenta taxas de sobrevivência (~90%) superiores as taxas de sobrevivência observadas para larvas de zebrafish. Sendo assim, esta dieta é adequada a ser utilizada nos primeiros dias de desenvolvimento das larvas de zebrafish, promovendo resultados satisfatórios nos demais parâmetros de criação de larvas desta espécie.

Apesar dos benefícios observados com a utilização de alimentos vivos nas fases iniciais de desenvolvimento na larvicultura de peixes, o desempenho das larvas de zebrafish por sua vez, parece ser afetado pelo uso de náuplios de artêmia no início da sua alimentação exógena, ocasionando em valores reduzidos de sobrevivência e crescimento. Os demais alimentos inertes apresentaram resultados positivos quanto às variáveis de crescimento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados de sobrevivência sugerem que ocorre um período crítico no desenvolvimento da larva de zebrafish, entre 10 e 14 dpf, portanto um estudo investigando a alimentação e demais cuidados até este período descrito torna-se importante, de modo a conhecer as vulnerabilidades da espécie em cativeiro.

O aumento da demanda por essa espécie para fins científicos e econômicos fundamenta a importância da realização de pesquisas para o desenvolvimento de protocolos alimentares adequados à sua criação na larvicultura.

Desta forma, estudos posteriores, poderão avaliar um alimento vivo e/ou inerte complementar, de modo a aumentar o desempenho, a sobrevivência e, conseqüentemente, promover melhores resultados no cultivo de zebrafish.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIBOYE, O.O., YAKUBU, A.F., ADAMS, T.E., OLAJIL, E.D., NWOGU, N.A. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 21(2), 225-246. 2011.
- ARRNBERG, A.B., DRIEVER, W. Integrating anatomy and function for zebrafish circuit analysis. **Front Neural Circuits**. 2013. doi: 10.3389/fncir.2013.00074.
- AKBARNEZHAD, M., SHAMSAIE, M. M., KAMALI, A., JAVAHERI, BABOLI, M., Bioaccumulation of Fe+2 and its effects on growth and pigment content of spirulina (*Arthrospira platensis*). **AACL Bioflux** 9(2):227-238, 2016.
- ATENCIO-GARCÍA, V.; ZANIBONI-FILHO, E. El canibalismo em la larvicultura de peces. **Revista MVZ Córdoba**, v. 11, n. 1, p. 9-19, 2006.
- ATENCIO-GARCÍA, V.; ZANIBONI-FILHO, E. El canibalismo en la larvicultura de peces. **Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Córdoba, 11: 9-19. 2006.
- BABADZHAYOV, A.S., ABDUSAMATOVA, N., YUSUPOVA, F.M., FAIZULLAEVA, N., MEZHLYMYAN, L.G., MALIKOVA, M.K., - Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. **Chem. Nat. Compd.**, 40: 276-279, 2004.
- BADWY, T.M., IBRAHIM, E., ZEINHOM, M. Partial replacement of fish meal with dried microalga (*Chlorella* spp and *Scenedesmus* spp) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. From the pharaohs to the future: **Anais...** Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. pp. 801–810. Egypt Ministry of Agriculture, Cairo. 2008.
- BARROS, H.P.; VALENTI, W.C. Ingestion rates of *Artemia nauolii* for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.217, n.(1-4), p.223-233, 2003.
- BARRERA, N. G.; VERGARA, M. P. H.; ROSTRO, C. I. P. Efectos de la densidad de cultivo sobre la edad de reproducción y producción de quistes del camarón duende *Streptocephalus mackini*. **Veterinaria México**. V, 38, p. 467-475, 2007.
- BASILE-MARTINS, M. A.; CIPÓLLI, M. N. & GODINHO, H. M. Alimentação do mandi, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Pimelodidae), de trechos dos rios Jaguari e Piracicaba, São Paulo-Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca** 13(1):17-29. 1986.
- BECKER, W. **Microalgae in human and animal nutrition**. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science, p.312-351. 2004.
- BEUX, L.F.; CAMPAGNOLO, R.; HUERGO, G.M.; REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E. Efeito da salinidade na sobrevivência de larvas de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Agassiz, 1829) (Pisces: Pimelodidae). **Anais...** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA – CONBEP, 13., Porto Seguro, 21– 25/set./2003. Resumos... Porto Seguro. p.189. 2003.

BIEDENBACH, J. M., et al., Use of the nematodes *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. **Journal of the World Aquaculture Society**, 20 (2): 61-71, 1989.

BLAIR, T., CASTELL., et al. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). **Aquaculture**, 225, 451-461. 2003.

BLANCO, L.T.; TACON, A.G.J. **La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura**. PROGRAMA COOPERATIVO EXPERIMENTAL, FAO. 90p. 1989.

BOCKELMANN, P.K. **Estudo do efeito do naproxeno na regeneração da nadadeira caudal do peixe teleosteo *Cyprinus carpio* (carpa)**. 70f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/317615>>., 2003.

BOCKELMANN, P.K. Histological study of the dynamics in epidermis regeneration of the carp tail fin (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758). **Braz. J. Biol.**, vol. 70, no. 1, p. 217-223, 2010.

BOERSMA, M.; VIJEVERBERG, J. Food Effects on life history traits and Seasonal dynamics of *Ceriodaphnia pulchella*. **Freshwater Biology**. V. 35, p. 25-34, 1996.

BOYLE, D., AMLUND, H., LUNDEBYE, A.K., HOGSTRAND, C., BURY, N.R. Bioavailability of a natural lead-contaminated invertebrate diet to zebrafish. **Environ Toxicol Chem**. v.29(3), pag.708–714. 2010;. doi: 10.1002/ etc.61.

BOROWITZKA, M.A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae
M.A. Borowitzka, L.J. Borowitzka (Eds.), **Micro-algal Biotechnology**, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 153-196. 1988.

BRENDAN, C., DELBOS, M.S. **Role of Live Feeds in Zebrafish Culture**. Pag.1-5, 2011.

BRITO, D., BRITO, R.; PEREIRA, G. Valoración de las tasas de filtración e ingestión de *Dendrocephalus spartaenovae* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae). **Ciencia**. V. 17, p. 281 - 287, 2009.

BRITO, D., BRITO, R.; PEREIRA, G. Evaluación de las tasas de filtración e ingestión de *Dendrocephalus Spartaenovae* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae) con *Pseudokirchneriella subcapita* y *Chlorella vulgaris* en condiciones de laboratorio. **Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América**, V. 35, p. 126-130, 2010.

BRITO, D., BRITO, R.; PEREIRA, G. Supervivencia de *Dendrocephalus spartaenovae* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae) alimentado con un cultivo mixto de microalgas. **Zootecnia Tropical**., V. 29, p. 61-68, 2011.

BRUGGEMANN, J. Nematodes as live food in larvae culture: a review. **J. World Aquacult. Soc.** 43, 739–753. 2012.

CAÑAVATE, J.P., FERNÁNDEZ- DÍAZ, C. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. **Aquaculture**, 174, 255-263, 1999.

CARDEIRA, J., GAVAIA, J.P., FERNÁNDEZ, I., CENGIZ, F.I., SILVA, M.J., OLIVEIRA, M.J., REIS, L.R., CANCELA, L.M., LAIZÉ, V. Quantitative assessment of the regenerative and mineralogenic performances of the zebrafish caudal fin. **Scientific Reports**. 2016| 6:39191 | DOI: 10.1038/srep39191.

CARVALHO, A.P., ARAÚJO, L; SANTOS, M.M. Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. **Aquaculture Research**, 37, 1107-1111. 2006.

CENCIC, A., CHINGWARU, W. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. **Nutrients** 2 611 – 625. 2010.

CHAKRABORTY, I., HU, P.J., CUI, D. Examining the effects of cognitive style in individuals' technology use decision making. **Decision Support Systems**, 45 (2). pp. 228-241. 2007

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances** 25:294–306. 2007
doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.

CLARK, M. Genomics and mapping of teleostei. **Comparative and Functional Genomics**; v.4, p.182-193. 2003.

CINGI C., CONK- DALAY M., CAKLI H., BAL C. The effects of Spirulina on allergic rhinitis. **Eur Arch Otorhinolaryngol**. 265(10):1219-23. 2008.

COZZA, K.L., COSTA, J.A.V . Lipídeos em *Spirulina* . **Vetor**, 10, 69-80. 2000.

CURRIE, P. D.; INGHAN, P. W. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: Johnston IA, Muscle Development and Growth, Academic Press, p.1-17, 2001.

CURNOW, J., KING, J., BOSMANS, J., KOLKOVSKI , S. The effect of reduced *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (Bloch) larvae. **Aquaculture**, 257, 204-213, 2006.

DAHM R., GEISLER, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Mar Biotechnol**. (NY). v8(4). pag329–345. 2006.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.36, p.21-31, 2007.

DA SILVA, C.G.J.P. **O efeito da dieta na sobrevivência e no desenvolvimento esquelético e digestivo de larvas e juvenis de peixe-zebra *Danio rerio*** (Hamilton, 1822), UNIVERSIDADE DO ALGARVE, 2009.

DE PAUW, N., LAUREYS, P.; MORALE, J.. Mass cultivation of *Daphnia magna* strauss on rice bran, **Aquaculture**, 25: 141-152. 1981.

DHERT, P., ROMBAUT, G., SUANTIKA, G., SORGELOOS, P. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. **Aquaculture**, 200, 129–146. 2001

DUMONT, H. J.; ADRIAENS, E. Experimental hybridization of two African Streptocephalus species (Crustacea, Branchiopoda: Anostraca). **Current science**. V. 96, p. 88-89, 2009.

DUTTA S. Food and feeding habits of Danio rerio (Ham. Buch.) inhabiting gadigarh stream, Jammu. **J Freshw Biol.**; v 5, p 165–168. 1993.

EATON, R., FARLEY, R. **Spawning cycle and egg production of zebrafish**. Brachydanio rerio, in the laboratory. v 1:195–204. 1974;

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. **Manual de identificação de Cladóceros límnicos do Brasil**. Brasília: Universa, 156 p. 1997.

ENGESZER R. E. et al. **Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field**. ZEBRAFISH - Mary Ann Liebert, Inc. Volume 4, Number 1, 2007.

ESTEVEES, F. D. A. **Fundamentos da limnologia**. Interciência, Ed. 3, Rio de Janeiro, 826 p. 2011.

FALLAHI, M., AZARI TAKAMI, G., VOSSOUGH, G. H., MASHINCHIAN, A., MEHDIPOUR, N. Effects of *Daphnia magna* fed with B group vitamins-enriched *Chlorella* sp. and *Scenedesmus obliquus* on the growth rate of *Rutilus frisii kutum* fry. **International Journal of Environmental Research**. V. 5, p.763-768, 2011.

FAO, **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, 1998. Disponível em : www.fao.org/docrep/w9900e/w9900e00.htm .

FARIA, A. C. E. A.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M. Dinâmica da comunidade fitoplânctônica e variáveis físicas e químicas em tanques experimentais submetidos a diferentes adubações orgânicas. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 291-297, 2001.

FARIAS, M., CERTAL, C.A. Different Feeds and Feeding Regimens have an Impact on Zebrafish Larval Rearing and Breeding Performance, **SOJ Aquatic Research**, Lisbon, Portugal. 2016.

FERNANDES, E. B.; SENHORINI, J. A.; CARNEIRO, D. J. Crescimento e sobrevivência de larvas de surubim-pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Agassiz, 1829) criadas com alimento vivo. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 15, p. 1-7. 2002.

FERREIRA, P. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. **IPIMAR**. 2009

FDA - Food and Drug Administration. **Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127 CFSAN/Office of Food Additive Safety**. 2003. Disponível em

<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153944.htm>.

FIGUEROA, T. J., SORIANO, S. M. y LUNA FIGUEROA, J. El microgusano *Panagrellus redivivus* en la dieta de larvas de peces. **Hypatia**, 19 (5): 10 -11, 2006.

FLYNN, E.J., TRENT, C.M., RAWLS, J.F. Ontogeny and nutritional control Of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). **J. Lipid Res.**;50(8):1641– 1652. 2009. doi: 10.1194/jlr.M800590-JLR200.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M. WEINGARTNER, M.; FILHO, E. Z. Desempenho do jundia, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringa, v.26, n. 3, p.345-352, 2004.

FURUSHO K., HARA O, YOSHIO J. Mass production of the rotifer, *Brachyurous plicatilis*, by feeding *Chlorella* sp. And yeast using large- scale outdoor tanks. **The Aquiculture**, 24 (3):96-101, 1976;

FURUYA, V. R. B.; HAYASHI, C.; FURUYA, W. M.; SOARES, C. M. GALDIOLI, E. M.. Influência de plancton, dieta artificial e sua combinação, sobre o crescimento e sobrevivência das larvas de Curimbata (*Prochilodus lineatus*). **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, v. 21, n. 3, p. 699-703. 1999

GANDRA, A. L. **O mercado de pescado da região metropolitana de Manaus**. INFOPECA, p. 84, 2010.

GEFFROY, B. SIMON, O. Effects of a Spirulina platensis-based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. Spirulina and zebrafish reproductive performance. **Cybium** 37(1-2), 2013.

GISBERT, E.; CONKLIN, D. B; PIEDRAHITA, R. H. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.116-132, 2004.

GOUVEIA, L., BATISTA, A.P., I. SOUSA, A., RAYMUNDO, N.M. B. **Microalgae in novel food products** K. Papa-doupoulos (Ed.), Food Chemistry Research Developments, Nova Science Publishers, New York. pp. 75-112. 2008.

GRUNWALD D.J, EISEN J.S. **Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate**. 3(9):717-724. 2002.

GUERRERO-ALVARADO, C. E. 2003. **Treinamento alimentar de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): sobrevivencia, crescimento e aspectos econômicos**. Dissertacao (Mestrado em Aquicultura). Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 72p. 2003.

GUROY, B., SAHIN, I., MANTOGLU, S., KAYALI, S. Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. **Aquacult Int.** 20, 869-878, 2012.

GUZMAN, S., GATO, A., CALLEJA, J.M. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*, **Phytother Res.** 15.. 224–230. 2001

HARPER, C., LAWRENCE, C. **The laboratory zebrafish.** CRC Press. Mark A. Suckow Ed. pp 274. 2011.

HEMAISWARYA, S., RAJA, R., KUMAR, R.R., GANESAN, V., ANBAZHAGEN, C. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 27 1737–1746. 2011. doi:10.1007/s11274-010-0632-z.

HILL, A.J., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSONill, R.E., Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol. Sci.** 86, 6–19. 2005.

HOLT, G.J. **Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species.** In: Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation (Cato, J.C. & Brown, C.L. eds), pp 251–254. Iowa State Press, Ames, IA. 2003.

HORNICK, J. L.; VAN EENAEME, C.; GÉRARD, O.; DUFRASNE, I.; ISTASSE, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. **Domestic Animal Endocrinology**, v.19, p.121-132, 2000.

HOSHIBA, M. A. **Enriquecimento da alimentação das larvas de matrinxã (*Brycon amazonicus*) com aminoácidos. Influência no crescimento inicial e sobrevivência das larvas.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 103p. 2007.

HOWE, K., CLARK, M.D., TORROJA, C.F., et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature.** 496 (7446):498–503. 2013; doi: 10.1038/nature12111.

HUNG, S.S.O. et al. Growth and feed efficiency of White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub-yearlings at diferente feeding rates. **Aquaculture**, v.80, p.147-153, 1989.

JOMORI, R.K. **Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e uso dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval.** Tese (Doutorado em Aqüicultura de Águas Continentais) – UNESP, Jaboticabal. 121f. 2005.

JOMORI, R.K; CARNEIRO, D.J.; GERALDO-MARTINS, M.I.E. et al. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems, **Aquaculture**, v.243, p.175-183, 2005.

JONES, R. Let Sleeping Zebrafish Lie: A New Model for Sleep Studies. **PLoS Biology**, v 5, p 281. 2007;

JOHNSTON, I. A. **Specialization of fish muscle.** In: Development and specializations of muscle. GOLDSPINK, D. F. (Ed.) Cambridge: Cambridge University Press, p.123-148, 1980.

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2249-2264, 2006.

JOHNSTON, I.A.M., MACQUEEN, D.J., WATABE S. Molecular biotechnology of development and growth in fish muscle. **Anais...** Fisheries for Global Welfare and Environment, 5^o World Fisheries Congress, p. 241-262, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KAHAN, D., APPEL, Z. **The value of Panagrellus sp. (Nematoda) as food for fish**. The European Symposium on Marine Biology (Ostend, Belgium, September 17-23, 1975). 1; 243-253, 1975.

KALUEFF, A.V., STEWART A.M., GERLAI R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends Pharmacol. Sci.** v 35(2), p 63-75. 2014;

KANG, H.K., SALIM, H.M., AKTER, N., KIM, D.W. KIM, H.T. B., et al., Effect of various forms of dietary Chlorella supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens, J. **Appl. Poultry Res.** 22. 100–108. 2013

KAUSHIK, S., GEORGA, I., KOUMOUNDOUROS, G. Growth and body composition of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements. **Zebrafish.**; v.8(2):87–95. 2011. doi: 10.1089/zeb.2011.0696.

KEEFE, T.C.O. et al. Swimming behavior of *Daphnia*: its role in determining predation risk. **J. Plankton Res.**, Oxford, v.20, no.5, p. 973-984, 1998.

KERMEN, F., FRANCO, L.M., WYATT, C., YAKSI, E. Neural circuits mediating olfactory-driven behavior in fish. **Front Neural Circuits.**;7:62. 2013. doi: 10.3389/fncir.2013.00062.

KEPEKÇI, R.A, POLAT, S., ÇELIK, A, BAYAT, N., SAYGIDEGER, S.D.(2013) Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl₄. **Food Chem** 141:1972–1979.

KIM, K.W., BAI, S.C., KOO, J.W., WANG, X. Effects of dietary Chlorella ellipsoidea supplementation on growth, blood characteristics, and whole-body composition in juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society** 33, 425–431. 2002.

KHANI, M., SOLTANI, M., MEHRJAN, S., FOROUDI, F., GHAENI, M. The effects of Chlorella vulgaris supplementation on growth performance, blood characteristics, and digestive enzymes in Koi (*Cyprinus carpio*), **Iran. J. Fish. Sci.** 16 .832–843. 2017.

KOJIMA, J.T. et. at. **Ponto-de-não-retorno e períodos de restrição alimentar nos parâmetros zootécnicos e no desenvolvimento muscular de larvas de pacu**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, 2012.

KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W; TANDLER, A. 1997 The mode of action of Artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, 155: 193 – 205.

KONGM, Q., LI, L., MARTINEZ, B., CHEN, P. e RUAN, R. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 160:9–18. 2010. doi:10.1007/s12010-009-8670-4.

KUBITZA, F. Qualidade do alimento, qualidade da água e manejo alimentar na produção de peixes. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO E NUTRICAÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba, 63-100. 1997.

KUMLU, M., FLETCHER, D. J.; FISHER, C. M. Larval pigmentation, survival and growth of *Penaeus indicus* fed the nematode *Panagrellus redivivus* enriched with astaxanthin and various lipids. **Aquaculture Nutrition**, 4: 193-200, 1998.

LANDINES-PARRA, M. A. **Efeito da triiodotironina (T3) no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento de larvas de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e dourado (*Salminus maxillosus*)**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, 269(1 - 4), 1 –20. 2007. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

LAWRENCE C.; HARPER C. **The laboratory zebrafish**. 1st edition. Florida: CRC Press, 2010.

LAWRENCE, F.C., WESTERFIELD, M., ZON, L.I. **Infrastructure.**; 104: 430- 452. 2011

LAWRENCE, C., Best, J., James, A., & Maloney, K.. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, 368-369, 103–108. 2012. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012>.

LEE C.S., OSTROWSKI, A.C. Current status of marine finfish larviculture in the United States. **Aquaculture**, 200:89-109, 2001.

LEITÃO, N. J.; DAL PAI-SILVA, M.; ALVES, F. L. de A.; PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, p. 78-85, 2011.

LEITÃO, N. J. Dietas microencapsuladas: Produção e Avaliação para alimentação de larvas altriciais de peixes de água doce. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – **Unesp, Câmpus de Jaboticabal**, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia, 2013.

LEIS, J. M; TRNSKI, T. **The larvae of Indo-Pacific shorefishes**. Honolulu: University of Hawaii Press. The Australian Museum, 371p. 1989.

LÉGER, P., BENGSTON, D.A., SIMPSON, K.L, SOREGELOOS, K.L. The use and nutritional value of Artemia as a food source. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.** 24, 521–623. 1986.

LEUNG, L.C., WANG, G.X., MOURRAIN, P. Imaging zebrafish neural circuitry from whole brain to synapse. **Front. Neural Circuits.**;7:76. 2013 doi: 10.3389/fncir.2013.00076.

LI, J., MOOKERJEE, B., WAGNER, J., FLOMENBERG, N. In vitro methods for generating highly purified EBV associated tumor antigen-specific T cells by using solid phase T cell selection system for immunotherapy. **J. Immunological Methods**, 328:19–181. 2007.

LIU, Y., FENG, L., JIANG, J., LIU Y., ZHOU, X.Q. Effects of dietary protein levels on the growth performance, digestive capacity and amino acid metabolism of juvenile Jian carp (Cyprinus carp var. Jian). **Aquaculture Research**. 40, p. 1073-1082. ,2009.

LIU, L., SU, J., LIANG, X.F., LUO, Y. Growth Performance, Body Lipid, Brood Amount, and Rearing Environment Response to Supplemental Neutral Phytase in Zebrafish (Danio Rerio) Diet. **Zebrafish**, v.10; p.433-438. 2013;

LOPES, P. J., TENÓRIO, A. R., SILVA. N. L.A., SANTOS. G. J. A. Branchoneta uma notável contribuição a larvicultura e alevinagem de peixes carnívoros de água doce. Panorama da Aquicultura, **Revista Panorama da Aquicultura**. V. 8, p.31-34, 1998.

LOPES, J. P. **Dinâmica Reprodutiva de Branchoneta Dendrocephalus brasiliensis Pesta, 1921 Como Incremento na Produção de Alimento Vivo para Peixes Ornamentais**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. p. 112. 2007.

LOPES, J. P.; PONTES, C. S.; ARAÚJO, A.; SANTOS-NETO, M. A. Fatores Bióticos E abióticos que influenciam o desenvolvimento de branconeta (Crustacea: Anostraca). **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**. V. 3, p. 76 -90, 2008.

LOPES, A. **Comportamento alimentares de Brachionus sp.: microalgas vivas e liofilizadas e emulsões de produtos comerciais. -Taxa de crescimento e análise de conteúdos lipídicos**. Universidade de Lisboa. 2010.

LOURENÇO, S.O., BARBARINO, E., LAVIN, P.L., LANFER MARQUEZ, U.M., AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen- to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, 39,17-32. 2004.

LU, J., TAKEUCHI, T., SATOH, H. Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval tilapia Oreochromis niloticus. **Aquaculture** 238, 437-449. 2004.<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.002>.

LUZ, R.K.; PORTELLA, M.C.Diferentes densidades de estocagem na larvicultura do trairão Hoplias lacerdae **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1p. 95-101. 2005.

MAACK G., SEGNER H. Morphological development of the gonads in zebrafish. **Journal of Fish Biology.**; v 62, p 895-906. 2003

MAASWINKEL, H., LE, N., HE, L., ZHU, L., WENG, W. Dissociating the effects of habituation, black walls, buspirone and ethanol on anxiety-like behavioral responses in shoaling zebrafish. A 3D approach to social behavior. **Pharmacol Biochem Behav.**;108:16-27. 2013. doi:10.1016/j.pbb.2013.04.009.

MADDISON, L.A., CHEN, W. Nutrient Excess Stimulates Cell Neogenesis in Zebrafish. **Diabetes.**;61910):2517–2524. 2012.

MARLES, R.J., BARRETT, M. L., BARNES, J., CHAVEZ, M.L, SHARAF, M., GRIFFITHS, J. United States pharmacopeia safety evaluation of Spirulina. **Crit Rev Food Sci Nutr.**;51(7):593-604. 2011.

MARKOU, G et al . Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World J Microbiol Biotechnol.** 2012.doi:10.1007/ s11274-012-1076-4.

MARKOVICH, M.L., RIZZUTO, N.V., BROWN, P.B. Diet affects spawning in zebrafish. **Zebrafish.**;4(1):69–74. 2007

MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, J.; VILLASENÓRCÓRDOVA, R. Effect of culture density and volume on *Moina micrura* (Kurz, 1874) reproduction, and sex ratio in the progeny. **Hydrobiologia.** V. 594, p. 69-73, 2007.

MARTÍNEZ, M.H.O. **Pesquisa de um regime alimentar alternativo ao regime clássico para o cultivo larvar do peixe-zebra (*Danio rerio*) - avaliação dos efeitos na sobrevivência e no crescimento.** Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2012.

MARTÍNEZ, L.R., RAMIREZ, D.T., LÓPEZ, V.G., LAZO, J.P. Changes in digestive enzyme activities during larval development of leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). **Fish physiology and biochemistry**, 1-13. 2014.

MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 14:217–232. 2010. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.

MEHRAD, B., JAFARYAN, H., TAATI, M.M. Assessment the effects of dietary vitamin E on growth performance and reproduction of zebrafish, *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae). **J. Oceanogr Mar Sci.** 3(1):1–7. 2012; DOI: 10.5897/JOMS11.022.

MENOSSI, O. C.; TAKATA. R.; SANCHES-AMAYA, M. I.; FREITAS, T. M.; YÚFERA, M.; PORTELLA, M. C. Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2012.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A.G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M.C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MICHELIS, E.; MEESTER, L. The influence of food quality on the phototactic behavior of *Daphnia magna* Straus. **Hydrobiologia**. V. 379, p. 199–206, 1998.

MOHAN, N., RAO, P.H., KUMAR, R.R., SIVASANKARAN, S., SIVASUBRAMANIAN, V. Studies on mass cultivation of *Chlorella vulgaris* and effective harvesting of biomass by low-cost methods. **Journal of Algal Biomass Utilization** 01:29-39. 2009.

MOREIRA, R. L., COSTA, J.M, QUEIROZ, R.V., MOURA, P. S., FARIAS, W. R. L.. Utiliza o de *Spirulina platensis* como suplemento alimentar durante a reversão sexual de tilápia do nilo. **Rev Caat**. 23:134-141, 2010.

MOREIRA, R.L., MARTINS, R.R., WLADIMIR, R.L.F.. Utiliza o de *Spirulina plantensis* como suplemento alimentar durante a reversão sexual da tilápia-do-nilo (var. chitralada) em água salina. **Ci Anim Bras** ; 12:76-82, 2011.

MORIN, C., De SOUZA SILVA, M.A., MULLER, C.P., HARDIGAN., SPIELER, R.E. Active avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*) - the role of sensory modality and inter-stimulus interval. **Behav Brain Res.**;248:141- 143. 2013. doi:10.1016/j.bbr.2013.04.009.

MORRIS, J. S., OHMAN, A., DOLAN, R. J. A subcortical pathway to the right amygdala mediating “unseen” fear. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 96 1680–1685. 1999.10.1073/pnas.96.4.1680 .

MOYLE P.B, CECH JJ. Fishes: An introduction to ichthyology, New Jersey: **Prentice Hall**. v 4, p 612. 2000

MULLER B., GROSSNIKLAUS U. Model organisms - A historical perspective. **J. Proteomics**;73(11):2054–2063. . 2010 doi: 10.1016/j. jprot.2010.08.002.

NANDINI, S. et al. First record of the temperate species *Daphnia curvirostris* Eylmann, 1887 emend. Johnson, 1952 (Cladocera: Daphniidae) in Mexico and its demographic characteristics in relation to algal food density. **Limnology**. V. 10, p. 87-94, 2009.

NANDINI, S.; ORTIZ, A. R. N.; SARMA, S.S.S. *Elaphoidella grandidieri* (Harpacticoida: Copepoda): Demographic characteristics and possible use as live prey in aquaculture. **Journal of Environmental Biology**. V. 32, p. 505-511, 2011.

NELSON J.S. **Fishes of the world**. Wiley, New York, v3, p 245. 1994.

NEKOUBINI, H., RAKHSHANIPOUR, G., HATEFII, S., SUDAGARI, M., MONTAJAMII, S. Effects of Feeding Frequency on Growth Performance and Survival Rate of Zebra Fish (*Danio rerio*), **Journal of agricultural**, 2013.

NGO-MATIP, M.E, PIEME, C.A., AZABJI-KENFACK, M., BIAPA, PC, NKENFACK, G., HEIKE, E., et al. Effects of *Spirulina platensis* supplementation on lipid profile in HIV–infected antiretroviral naïve patients in Yaounde - Cameroon: a randomized trial study. **Lipid Health Dis**. 13:191. 2014; doi: 10.1186/1476-511X-13-191.

NEKOUBINI, H., RAKHSHANIPOUR, G., HATEFII, S., SUDAGARI, M., MONTAJAMII, S. Effects of Feeding Frequency on Growth Performance and Survival Rate of Zebra Fish (*Danio rerio*), **Journal of agricultural**, 2013

NORMAN, K. E. **The spatial occurrence of the Cladoceran *Moina macrocopa* (Straus) in a kraft pulp mill treatment lagoon.** University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA, 15p. 1977.

NÜSSLEIN-VOLHARD C.; **The zebrafish issue of Development**, Development, 139 (22):4099-4103. 2012;Doi:10.1242/dev.085217.

NÜSSLEIN-VOLHARD C., DAHM R. **Zebrafish: A practical approach.** New York: Oxford University Press, 2002.

OKUMURA, D.T. **Estudos ecotoxicológicos com as espécies *Argyrodiaptomus furcatus* e *Notodiptomus iheringi* (Copepoda, Calanoida).** Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 312f. 2011.

OLIVEIRA, A.C.L.D, MONTEIRO, M.P.C., ROBBS, P.G., et al. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquacul Int.**;7:261–275, 1999.

OLIVOTTO, I., NOZZI, V., COSSIGNANI, L. CARNEVALI, O. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture. **Aquaculture**, 308, 124–131. 2010.

OLMEDA L.J.F., SANCHEZ V.F.J. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). ELSEVIER Review. **Journal of Thermal Biology** 36. 91–104. 2011.

ÖNAL, U., LANGDON, C. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. **Aquaculture Nutrition**, 6, 159-170, 2000.

ORTEGA, A.G. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. In: CRUZ-SUÁREZ, L.E.; RICQUEMARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Ed.). Avances en Nutrición Acuícola. V. **Anais...** Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida: Ed. Yucatán. p.287–289, 2000.

PALMEGIANO, G.B., AGRADI, E., FORNERIS, G., GAI, F., RIGAMONTI, E., SICURO, B., ZOCCARATO, I. Spirulina as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). **Aquac Res** 36, 188- 195. 2005.<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01209.x>,

PAO, T.K., WATER, J.V., GERSHWIN, M.E. Effects of a Spirulina based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. **J Med Food**.;8(1):27–30. 2005.

PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSI, D.M. et al. **Nutrição de peixes.** In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D.M. et al. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva, São Paulo: Aquabil, p.75-172. 2004.

PICCINETTI, C.C., TULLI, F., TOKLE, N.E., CARDINALETTI, G., OLIVOTTO, I. The use of preserved copepods in sea bream small scale culture: biometric, biochemical and molecular implications. **Aquaculture Nutrition**, 20(1), 90-100. 2014.

PRIETO, M.; ATENCIO, V. Zooplankton en La Larvicultura de Peces Neotropicales. **Revista MVZ Córdoba**. V. 13, p. 1415-1425, 2008.

PORTELLA, M.C.; DABROWSKI, K. **Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae**. In: CYRINO, J. E. C.; BUREAU, D.; KAPOOR, B.G. (Orgs.). Feeding and digestive functions of fishes. Enfield: Science Publishers, p. 227-279, 2008.

PORTUGUES, R., FEIERSTEIN, C.E., ENGERT, F., ORGER, M.B. Whole-Brain Activity Maps Reveal Stereotyped, Distributed Networks for Visuomotor Behavior. **Neuron**;81(6):1328-1343. 2014doi: 10.1016/j. neuron.2014.01.019.

RADUNZ-NETO, J. Alimentacao natural versus racao balanceada na larvicultura de peixes. Workshop : Alimentacao de peixes: Relacao custo x beneficio. **Anais...** In: XXXVI REUNIAO ANUAL DA SBZ. 1999, Porto Alegre, RS, p.119-124. 1999.

RAVI M., De SL, AZHARUDDIN S., PAUL SFD. The beneficial effects of Spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. **Nutr and Diet Suppl.**;2:73–83. 2010

REED, B., JENNINGS, M. **Guidance on the housing and care of Zebrafish Daniorerio**. 2011; Available at: www.scilifelab.se/wpcontent/uploads/2013/10/Guidance-zebrafish.pdf.

REGUNATHAN, C., WESLEY, S.G. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using Spirulina as a carotenoid source. **Aquaculture Nutrition** 12(6): 425–432, 2006.

RICHARD, J., NJIWA, K., MULLER, P., KLEIN, R. Life Cycle Stages and Length of Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to DDT . **Introduction.**;50(3):220–225. 2004.

RICCI, M., FIC, A.O., RAGNI, A., SCHECHTRIEM, C., FOCKEN, U. Development of a low cost technology for mass production of the free-living nematode Panagrellus redivivus as an alternative live food for first feeding fish larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology** 60,556-559. 2003.

RICHMOND, A., **Handbook of Microalgal Mass Culture**, Boston: CRC Press, 1990.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 566 p. 2004.

ROTTMANN, R. W. **Microworm culture for aquarium fish producers**. University of Florida. 1-3, 2002.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. **Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species**. In: Muscle Development and Growth JOHNSTON, I. A. (Ed). Academic Press, 318 p., 2001.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D.; **Zoologia dos Invertebrados**: Uma abordagem funcional evolutiva. 7º Ed., Editora Guanabara Rocca, São Paulo – SP, 2005.

SALES, J.; JANSSENS, G.P.J. Nutrient requirements of ornamental fishes. **Aquatic Living Resources**, Cambridge, v.16, n.1, p.533 - 540, 2003.

SANCHO, R., GRUBER, R., GU, G, BEHRENS, A. Loss of Fbw7 reprograms adult pancreatic ductal cells into α - and β -cells. **Cell Stem Cell**. 2014

SANTANGELO, J.M. **Estrutura do banco de ovos de resistência em sistemas aquáticos continentais e influência da salinidade e da predação na diapausa**. In: PPGE/UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 120. 2009.

SANTIAGO, C. B., et al., Response of bighead carp *Aristichthys nobilis* and Asian catfish *Clarias macrocephalus* larvae to free-living nematode *Panagrellus redivivus* as alternative feed. **J. Appl. Ichthyol**, 19: 239-243, 2003.

SANTIAGO, C. B., RICCI, M. and REYES-LAMPA, A. Effect of nematode *Panagrellus redivivus* density on growth, survival, feed consumption and carcass composition of bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson) larvae. **J. Appl. Ichthyol**. 20: 22-27, 2004.

SAUTTER, J., et al., *Panagrellus redivivus* (Linné) as a live food organism in the early rearing of the catfish *Synodontis petricola* (Matthes). **Aquaculture Research**, 38: 653-659, 2007.

SCHLECHTRIEM, C., RICCI, M., FOCKEN, U., BECKER, K. The suitability of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as live food for first-feeding fish larvae. **Journal of Applied Ichthyology** 20: 161-168. 2004.

SCHLECHTRIEM, C., FOCKEN, U. and BECKER, K. Digestion and assimilation of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* fed to first feeding coregonid larvae: evidence from histological and isotopic studies. **Journal of the World Aquaculture Society**, 36 (1): 24-31, 2005.

SENHORINI, J. A.; MENDONÇA J. O. J. Larvicultura e alevinagem de espécies nativas. In: I WORKSHOP INTERNACIONAL DE AQUICULTURA, 1, 1997, São Paulo. **Anais...** Sao Paulo, SP., p. 67-71, 1997.

SERRANO, R. J. S . et al.. **The role of Hedgehog signaling during zebrafish larvae fin fold regeneration**. Dissertação (Mestrado) Genética Molecular e Biomedicina. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa., 2014.

SHI, X. et al. Effect of fish meal replacement by *Chlorella* meal with dietary cellulase addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic genes' expression for crucian carp *Carassius auratus*. **Aquaculture Research**., 48, 3244–3256, 2017.

SHWETA, J., SHIKHA, M, SAMUEL, G.S. Potentiality of *Petha* (*Benincasa hispida*) waste for the growth of *Spirulina platensis*. **Res J of Agric Sci**. 2(1):133-5. 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., IBARRA, L.C. FIORESI, T.B. *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyta) laboratory cultured in CHU12 and macrophyte with NPK media. **Boletim do Instituto de Pesca**, 35(1), 111-118. 2009. [http:// dx.doi.org/10.5007/1678-2305.2009v35n1p111](http://dx.doi.org/10.5007/1678-2305.2009v35n1p111).

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BACHION, M. A.; BRAGA F. M. S. Effects of food quality on growth and biochemical composition of a calanoid copepod, *Argyrodiaptomus furcatus*, and its importance as a natural food source for larvae of two tropical fishes. **Hydrobiologia**. V. 453/454, p. 393-401, 2001.

SICCARDI, A.J., GARRIS, H.W., JONES, W.T., MOSELEY, D.B., D'ABRAMO, L.R., WATTS, S.A. Growth and survival of zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. **Zebrafish**. 6(3):275–280. 2009; doi: 10.1089/zeb.2008.0553.

SILVA, E. C. S. Avanços no cultivo de espécies carnívoras. **PUBVET**, 2 (20),1-8. . 2008 Disponível em: http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=385.

SINGLEMAN C., HOLTZMAN N.G. Growth and maturation in the zebrafish *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. **Zebrafish**, v 11, p 1-11. 2014.

SIPAÚBA-TAVARES. S.L.H Análise da seletividade alimentar em larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tambacu (híbrido, pacu - *Piaractus mesopotamicus* e tambaqui - *Colossoma macropomum*) sobre organismos zooplânctônicos. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Buotucatu, v.6, no.1, p.114-132, 1993.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Paulo: Rima, 99 p. 2001.

SOARES, C.M. et al. Plâncton, *Artemia* sp, dieta artificial e suas combinações no desenvolvimento e sobrevivência de larvas do quinguio (*Carassius auratus*) durante a larvicultura. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.22, no.2, p. 383- 388, 2000.

SORGELOOS, P., LEVANS, P., LEGER, P., TACKAERT, W. The use of *Artemia* in marine fish larviculture. **TML Conf. Proceed.** 3, 73-86. 1993.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Biosci. Bioeng.**, 101 (2), pp. 87-96. 2006.

SRIPUTHORN, K.; SANOAMUANG L. Fairy Shrimp (*Streptocephalus sirindhornae*) as Live Feed Improve Growth and Carotenoid Contents of Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **International Journal of Zoological Research**. V. 7, p. 138-146, 2010.

SUALI, E.; SARBATLY, R. **Conversion of microalgae to biofuel**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.16, p.4316-4342, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112002304>>. doi: 10.1016/j.rser.2012.03.047.

SYAHRUL, S., Health Food Supplements (“Health Food”) Highly Nutritious From Chlorella And Oil Catfish (*Pangasius hypophthalmus*) **Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia**. 19(3):251-255. 2016;DOI 10.17844/jphpi.v19i3.14564.

TAKAHASHI, L., S., et al. Efeito do tipo de alimento no desempenho produtivo de juvenis de Acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 36(1), 1 – 8, 2010.

TAKEUCHI, T., LU, J., YOSHIZAKI, G, SATOH, S. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw *Spirulina*. **Fisher Sci** 68:34-40. 2002;

TONON, T., HARVEY, D., LARSON, T.R., GRAHAM, I.A. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae **Phytochemistry**, 61, pp. 15-24. 2002.

TSUCHIHASHI N, WATANABE T, TAKAI Y. Effect of *Spirulina platensis* on caecum content in rats. **Bull Chiba Hyg Coll**. 5(2):27-30. 1987.

UGWU, C.U, AOYAGI, H. Influence of shading inclined tubular photobioreactor surfaces on biomass productivity of *C. sorokiniana*. **Photosynthetica** 46:283–285. 2008.

ULLOA, P.E., ITURRA, P., NEIRA, R., ARANEDA, C. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Rev Fish Biol Fish**. 21:649–666. 2011;

ULLOA, P.E., PENA, A.A., LIZAMA, C.D., et al. Growth Response and Expression of Muscle Growth–Related Candidate Genes in Adult Zebrafish Fed Plant and Fishmeal Protein–Based Diets. **Zebrafish**. 10:99–109. 2013;doi: 10.1089/zeb.2012.0823.

ULLOA, P.E., MEDRANO, J.F., FEIJOO, C.J. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. **Front. Genet**. 5:313. 2014;doi: 10.3389/fgene.2014.00313.

VAN der MEEREN, T.. Analysis of biochemical components in copepods for evaluation of feed quality for juvenile production of marine fish. **Projektrapportnr Havforskningsinstituttet**, 39 pp. 2003.

VERISCHELE, D., LEGER, P., LAVENS, P., et al. The use of *Artemia*.. In: BARNABÉ, G. (ed.). **Aquaculture**. New York: Ellis Horwood, v.1. cap.7. p.246-263. 1990.

WATANABE, T., KITAJIMA, C. FUJITA, S. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. **Aquaculture**. v 34,p 115–145. 1983;

VOLTOLINA, D.; SAAVEDRA, M.P.S.; RODRÍGUEZ, L.M.T. Outdoor mass microalgae production in Bahia Kino, Sonora, NW Mexico. **Aquacultural Engineering, in press**. 2008

WANG, Y.; XIE, N.; WANG, W. Effects of algal concentration and initial density on the population growth of *Diaphanosoma celebensis* Stingelin (Crustacea, Cladocera). **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. V. 27, p. 480-486, 2009.

- WATANABE, T., KIRON, U. Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture**. 124:223-251. 1994.
- WATANABE K.; NAKAO R.; FUJISHIMA M. TACHIBANA M.; SHIMIZU T.; WATARAI M. Ciliate Paramecium is a natural reservoir of Legionella pneumophila. **Sci Rep** 6:24322. 2016.
- WATTS, S.A., POWELL, M., D'ABRAMO, L.R. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition. **ILAR J.** 53(2):144–160. 2012;doi: 10.1093/ilar.53.2.144.
- WESTERFIELD, M. **The zebrafish book**. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., University of Oregon Press, Eugene, 2000.
- WILSON, C. Aspects of larval rearing. **ILAR J.**;53(2):169–178. doi: 10.1093/ilar.53.2.169. 2012.
- YANONG, R.P.E. Nutrition of ornamental fish. **Husbandry and Nutrition**, Montreal, v.2, n.1, p.19-41, 1999.
- YOKOBORI, E., AZUMA, M., NISHIGUCHI, R. et al. Neuropeptide Y stimulates food intake in the Zebrafish, *Danio rerio*. **J. Neuroendocrinol.**;24(5):766–73. 2012. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02281.x.
- YOSSA, E., SARKER, P.K., KARANTH, S., EKKER, M., VANDERBERG, G.W. Effects of dietary biotin and avidin on growth, survival, feed conversion, biotin status and gene expression of zebrafish *Danio rerio*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.**;160(4):150–158. 2011.doi: 10.1016/j.cbpb.2011.07.005.
- ZAHARAN, E., RISHA, E. Modulatory role of dietary *Chlorella vulgaris* powder against arsenic-induced immunotoxicity and oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), **Fish Shellfish Immunol**. 41.654–662. 2014.
- 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.
- XU, W., GAO, Z., Qi Z.T., QIU, M., PENG, J.Q., SHAO, R. Effect of dietary chlorella on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 14, 53–57. 2014.
- XUWANG, Y.; SHASHA, Z.; JIAN, H.; PENGFEI L Effects of food quality and starvation on the optimal foraging behavior of *Daphnia magna* (Cladocera). **Acta Ecologica Sinica**. V. 31, p. 328-333, 2011.