

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Ricardo Augusto Custodio da Silva

**Cultivo de *Dendrocephalus brasiliensis*
(Pesta, 1921) visando à aplicação em aquicultura**

São Carlos

2016

Universidade Federal de São Carlos

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Ricardo Augusto Custodio da Silva

Cultivo de *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) visando à aplicação em aquicultura

Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Gama Melão

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências: Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos

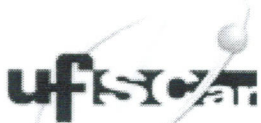
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586c Silva, Ricardo Augusto Custodio da
Cultivo de *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta,
1921) visando à aplicação em aquicultura / Ricardo
Augusto Custodio da Silva. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
141 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Larvicultura. 2. Eclosão de cistos. 3.
Desenvolvimento. 4. Taxa de crescimento. 5.
Composição bioquímica. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ricardo Augusto Custódio da Silva, realizada em 07/03/2016:

MG Melão

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
UFSCar

Odete Rocha

Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Ana Lombardi

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Renata Fracácio

Profa. Dra. Renata Fracácio
UNESP

Suzelei Rodgher

Profa. Dra. Suzelei Rodgher
UNESP

*Dedico este trabalho à minha mãe, Maria de Fátima
Moreira de Melo Silva, ao meu pai, Valdir Custódio da
Silva, à minha irmã, Thais Mirela da Silva e à minha avó,
Maria de Lourdes Nogueira de Melo, em memória.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Fátima e Valdir, a quem eu devo tudo o que sou. Serei eternamente grato pelo amor incondicional, a compreensão, o apoio e a luta destes meus heróis.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Gama Melão, por ter me acolhido e depositado sua confiança em mim. Pelos ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e por ter proporcionado todas as condições para realização deste trabalho.

À minha namorada Gabriela, pois sem sua ajuda, seu companheirismo, carinho e amor eu não teria terminado este trabalho.

À minha irmã Thais, por sempre estar ao meu lado me apoiando, assim como a tantos outros familiares que sempre estiverem na torcida por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do Projeto Temático Processo nº 2008/02078-9, no qual se insere esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN), bem como aos funcionários e conselhos vigentes.

Ao Departamento de Hidrobiologia (DHb) pela infraestrutura oferecida para a realização do trabalho.

Ao professor Dr. Hugo Sarmento, pela colaboração direta na realização desta tese e pela preciosa amizade.

Aos meus amigos Kevin, Camila e Laís, que me ajudaram grandemente durante vários momentos da realização deste estudo e pela amizade sincera.

Aos Técnicos Alcídio Culósio Filho, Claudinei Archanjo e Fábio Lourenço, pelas sugestões, auxílio em campo e em experimentos, conselhos e estimada amizade.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Plâncton, Rodrigo, Lays, Giseli, Vinicius, Daniela, Camila e Renan, sem os quais certamente este trabalho teria sido mais oneroso e menos prazeroso, especialmente ao Rodrigo e à Camila que muito me ajudaram.

Aos professores Drs. Hugo Sarmento, Evelise Nunes Fragoso de Moura e Gustavo Arbelaez pelas correções, sugestões e estímulo no exame de qualificação.

Aos meus grandes amigos, Leandro, Willian, Guilherme, Cinthia, Rafael, Daniel Favaro, Everton, Mansi, Tanajura, Guga, Borracha, Laís, Marcelo, Nathan, Marcos, Nelson, Cortella, Diego, Marília, João, Danilão, Danilo Elton, Juan, Mega, Falcão, Dani Fonseca, Vitinho, Bianca, Gordo, Gilson, Gabi, Lúcio, Vini, André, Denis, Guto e a tantos muitos outros grandes amigos que tive o prazer de conquistar nessa caminhada, por fazerem parte fundamental de minha vida e serem meus grandes companheiros durante tantos anos.

Aos meus alunos e colegas professores, que também fizeram parte dessa história e contribuíram muito para o meu crescimento.

A todos e todas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, ouvindo as queixas, dando conselhos, rindo ou chorando juntos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. RESUMO	14
2. ABSTRACT	16
3. INTRODUÇÃO	25
4. OBJETIVOS	31
5. CAPÍTULO 1	32
5.1. Introdução	36
5.2. Materiais e Métodos	40
5.3. Resultados	43
5.4. Discussão	49
5.5. Conclusões	53
5.6. Referências Bibliográficas	55
6. CAPÍTULO 2	60
6.1. Introdução	64
6.2. Materiais e Métodos	67
6.3. Resultados	69
6.4. Discussão	78
6.5. Conclusões	81
6.6. Referências Bibliográficas	82

7. CAPÍTULO 3	85
7.1. Introdução	90
7.2. Materiais e Métodos	95
7.3. Resultados	101
7.4. Discussão	112
7.5. Referências Bibliográficas	115
8. CONCLUSÕES GERAIS	121
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	123
10. ANEXOS	127

RESUMO

A larvicultura é hoje o principal entrave da aquicultura. O alimento vivo, em especial zooplanctônico, é essencial nas fases jovens de peixes. No entanto, há dificuldades em se obter biomassa suficiente. O Anostraca *Dendrocephalus brasiliensis*, conhecido como branconeta, tem grande potencial de utilização na aquicultura nacional. No presente estudo, foram realizados experimentos controlados a fim de se obter: I) melhores condições para eclosão dos cistos de resistência, avaliando a densidade de cistos no sedimento, temperatura e pH da água, e tempo de desidratação dos cistos; II) identificação dos estágios iniciais de vida, com enfoque no comprimento e tempo até a maturidade, além de investigarmos os principais fatores que influenciam o desenvolvimento das fases iniciais e; III) produção semi-intensiva, com cultivos realizados durante o inverno e o verão, com dois regimes alimentares distintos e posterior análise da composição bioquímica dos organismos cultivados nestas condições. A eclosão ocorre em baixas proporções e é influenciada principalmente pela densidade de cistos presente no sedimento, tendo certa tolerância a diferentes níveis de temperatura e pH. O tempo médio para se atingir a idade adulta foi de dez dias e durante as fases iniciais, observamos que alguns indivíduos apresentam eclosão tardia. Dentre as variáveis ambientais estudadas, temperatura e condutividade desempenham papel principal no crescimento durante esse período, juntamente com a alimentação, a qual deve ser fornecida a partir do terceiro dia. Em condições de cultivo semi-intensivo, constatamos que grandes quantidades de alimento promovem maior crescimento em comprimento, tanto no verão quanto no inverno, contudo, durante o inverno, baixas quantidades de alimento conferem maior sobrevivência. Na análise bioquímica, os indivíduos cultivados em regime com baixa quantidade de alimento apresentaram maior proporção de proteínas, valores estes maiores do que aqueles encontrados em *Artemia sp.* Também detectamos a presença

de ácidos graxos poliinsaturados, que são de grande interesse em organismos a serem utilizados como alimento vivo para peixes. De modo geral, *D. brasiliensis* pode ser considerada uma espécie propícia ao uso na aquicultura, devido à: facilidade no manejo de cistos, uma vez que cistos presentes no sedimento são suficientes para obtenção de grandes populações; alta taxa de crescimento e tolerância às variações ambientais, não exigindo grandes esforços na manutenção do meio de cultivo e; qualidade nutricional, com alta concentração de proteínas e presença de ácidos graxos poliinsaturados.

Palavras-chave: larvicultura; eclosão de cistos, desenvolvimento, taxa de crescimento, composição bioquímica, Thamnocephalidae.

ABSTRACT

The hatchery is now the main obstacle of aquaculture. Live food, especially zooplankton, is essential in the first life stages of fish. However, there are difficulties in obtaining sufficient biomass. The Anostraca *Dendrocephalus brasiliensis*, known as “branconeta”, has great potential for use in national aquaculture. In this study, experiments were conducted in controlled conditions in order to obtain: I) the best conditions for hatching of resistant cysts, evaluating the cyst density in the sediment, temperature and pH of the water, and cysts dehydration time; II) identification of the early stages of life, focusing on the length and time to maturity, and we also investigate the main factors that influence the development of the early stages and; III) semi-intensive production, the organisms were grown during winter and summer, with two different diets and subsequent analysis of the biochemical composition of organisms grown in these conditions. Hatching occurs in low proportions, and is mainly influenced by the density of cysts present in the sediment, and show some tolerance to different levels of temperature and pH. The average time to reach adulthood was ten days and during the early stages, we observed that some individuals have delayed hatching. Among the environmental variables, temperature and conductivity play a major role in the growth during this period, along with the food, which must be provided from the third day. In semi-intensive farming conditions, we found that large amounts of food promote greater growth in length, both in summer and winter, however, during the winter, low amounts of food provide greater survival. In biochemical analysis, individuals grown with a low amount of food had higher proportion of protein, values higher than those found in *Artemia* sp. We also detected the presence of polyunsaturated fatty acids, which are of great interest in organisms to be used as live food for fish. In general, *D. brasiliensis* can be regarded as a suitable species for use in aquaculture due to: ease handling of cysts, since cysts present in the sediment are

sufficient for obtaining large populations; growth rate and high tolerance to ambient changes, not requiring great efforts in keeping the culture medium and; nutritional quality, with high concentration of proteins and the presence of polyunsaturated fatty acids.

Keywords: hatchery; cysts hatching rate, development, growth rate, biochemical composition, *Thamnocephalidae*.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* em três temperaturas experimentais. (p.28)

Figura 2: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* em cinco valores experimentais de pH.(p.29)

Figura 3: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) para três densidades iniciais de cistos de resistência de *D. brasiliensis* utilizadas no primeiro ensaio. (p.30)

Figura 4: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* em cada combinação experimental de densidade inicial de cistos e volume, onde N = 1500 cistos e X = 300 mL de água. (p.31)

Figura 5: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* após três diferentes tempos de desidratação de cistos. (p.32)

Capítulo 2

Figura 1: Principais estágios de desenvolvimento de *D. brasiliensis* (aumento 50x) cultivados em temperatura média de 25°C.(p.54)

Figura 2: Comparação entre os tamanhos dos diferentes estágios de desenvolvimento de *D. brasiliensis* (aumento 10x) cultivados em temperatura média de 25°C.(p.56)

Figura 3: Observação de três fases distintas de *D. brasiliensis* observadas em amostra fixada no mesmo tempo pós-enchimento. Em vermelho, náuplio I; em verde, náuplio II e em azul, náuplio III.(p.57)

Figura 4: Gráfico de dispersão entre número de indivíduos e o tempo experimental para cada tratamento alimentar.(p.59)

Capítulo 3

Figura 1: Temperatura média e desvio-padrão para cada dia de coleta durante o verão (círculos cheios) e o inverno (círculos vazios).(p.82)

Figura 2: Diferenças entre os cultivos em ambiente AR e BR durante o verão. (a): curvas de crescimento médio em meio AR e em meio BR. (b): *boxplots* da variação de densidade em meio AR e em meio BR. (p.84)

Figura 3: Diferenças entre os cultivos em ambiente AR e BR durante o inverno. (a): curvas de crescimento médio em meio AR e em meio BR. (b): *boxplots* da variação de densidade em meio AR e em meio BR.(p.85)

Figura 4: Diferenças entre os cultivos em ambiente AR durante o verão e o inverno. (a): curvas de crescimento médio durante o verão e durante o inverno. (b): *boxplots* da variação de densidade durante o verão e durante o inverno.(p.87)

Figura 5: Diferenças entre os cultivos em ambiente oligotrófico durante o verão e o inverno. (a): curvas de crescimento médio durante o verão (LV) e durante o inverno (LI). (b): *boxplots* da variação de densidade durante o verão (1) e durante o inverno (2), onde n é o número de indivíduos. (p.88)

Figura 6: Porcentagens de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas em relação ao peso seco das amostras referentes ao cultivo em ambiente com alta quantidade de recursos alimentares. (p.89)

Figura 7: Porcentagens de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas em relação ao peso seco das amostras referentes ao cultivo em ambiente com baixa quantidade de recursos alimentares. (p. 90)

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Tempo aproximado de cada estágio de desenvolvimento de *D. brasiliensis* e os respectivos comprimentos médios registrados, onde: L. médio = comprimento médio e DP = desvio padrão. (p.54)

Tabela 2: Taxas de crescimento médio de cada cultivo e os respectivos valores das variáveis ambientais medidas, onde: Tx. Cresc. = taxa de crescimento médio expresso em mm dia⁻¹; Cond. = condutividade em $\mu\text{S cm}^{-2}$; medida em % e OD. = oxigênio dissolvido em mg L⁻¹. (p.57)

Tabela 3: Valores médios de horas-grau (expressos em horas °C) necessárias para se atingir a maturidade sexual nos indivíduos de *D. brasiliensis* em cada mês estudado. O tempo refere-se ao dia em que os indivíduos atingiram a maturidade sexual. (p.55)

Tabela 4: Médias diárias do número de indivíduos estimados a partir da contagem de subamostras no experimento de alimentação e respectivos desvios.

Capítulo 3

Tabela 1: Resumo dos resultados dos testes estatísticos comparando os comprimentos de indivíduos de *D. brasiliensis* ao final do experimento. **AR:** alto recurso, **BR:** baixo recurso, **v:** verão, **i:** inverno. (p.83)

Tabela 2: Aminoácidos encontrados nos dois tratamentos, em % do total de aminoácidos. (p.91)

Tabela 3: Ácidos graxos encontrados nos dois tratamentos, em % do total de ácidos graxos. (p.92)

Apresentação do trabalho

Este estudo teve como objetivo principal identificar as condições ótimas para o cultivo do Anostraca *Dendrocephalus brasiliensis*, espécie com grande potencial para utilização como alimento vivo na aquicultura nacional, a fim de gerar informações que possam subsidiar o estabelecimento de técnicas de cultivo da espécie para ampla aplicação na aquicultura.

Foram realizados experimentos controlados a fim de se obter: I) melhores condições para eclosão dos cistos de resistência, avaliando a densidade de cistos no sedimento, temperatura e pH da água, e tempo de desidratação dos cistos; II) identificação dos estágios iniciais de vida, com enfoque no comprimento e tempo até a maturidade, além de investigarmos os principais fatores que influenciam o desenvolvimento das fases iniciais e; III) produção semi-intensiva, com cultivos realizados durante o inverno e o verão, com dois regimes alimentares distintos e posterior análise da composição bioquímica dos organismos cultivados nestas condições.

A tese foi estruturada com uma introdução geral, seguida de três capítulos em forma de artigos científicos. No tópico *Conclusões*, buscamos integrar os resultados obtidos.

No capítulo 1, apresenta-se um estudo com a finalidade de identificar os principais fatores que influenciam as taxas de eclosão dos cistos de resistência de *D. brasiliensis*, a fim de determinarmos as melhores condições para obtenção de cistos viáveis para o cultivo dessa espécie em larga escala. Para isso, foram avaliadas as taxas de eclosão em diferentes condições (1) de temperatura, (2) de pH, (3) de densidade inicial de cistos no sedimento, e (4) de tempo de desidratação dos cistos após a seca e até a próxima eclosão.

O capítulo 2 trata de um estudo onde foram avaliados os fatores ambientais que influenciam a sobrevivência, o desenvolvimento e o crescimento dos estágios iniciais de vida da branconeta em cultivos controlados, sob as condições climáticas da região sudeste do Brasil.

No capítulo 3 foram realizados experimentos controlados objetivando (1) investigar o desempenho de *D. brasiliensis* sob condições de cultivo semi-intensivo,

através da avaliação de suas taxas de crescimento (individual e populacional) em dois períodos do ano (inverno e verão), com baixa e alta disponibilidade de recursos alimentares; e (2) avaliar o valor nutricional desses animais através da determinação de sua composição bioquímica. Com isso, buscou-se compreender a interação entre estes fatores no ciclo de vida da espécie, bem como averiguar se os diferentes regimes alimentares alteram a qualidade nutricional da espécie, com o intuito final de aprimorar as condições de cultivo em larga escala desses organismos.

INTRODUÇÃO

A aquicultura como atividade produtora de alimentos tem se ampliado significativamente em todo o mundo, frente à necessidade de aumentar a produção protéica para melhorar a qualidade alimentar da crescente população mundial (Crispim *et al.*, 1999). Assim, o aumento da demanda por peixes, crustáceos e outros organismos aquáticos, vem promovendo interesses e investimentos para o desenvolvimento dessa atividade, a qual cresce a uma taxa mais elevada do que qualquer outro setor da atividade primária (Igarashi *et al.*, 1999). A produção de pescados representa hoje 7,5% da produção mundial de alimentos (98 milhões de ton/ano), sendo a quinta maior fonte alimentar para a população humana, perdendo apenas para o arroz, produtos florestais, leite e trigo (Santiago *et al.*, 1999).

A aquicultura continental atual tem um enorme potencial para atender as necessidades protéicas humanas, atenuando também as pressões que a atividade pesqueira exerce sobre populações de pescado, cujos estoques não são suficientes para atender as demandas atuais. Estas deveriam ser utilizadas racionalmente como fonte de variedade genética para programas de produção e de reconstituição faunística.

Assim, além da importância alimentar, a aquicultura desempenha um importante papel na busca pelo eco-desenvolvimento. Dentro de um contexto sustentável e conservacionista, é desafio da aquicultura atual alcançar um crescimento harmônico com prudência ecológica, equidade social e viabilidade econômica (Quesada *et al.*, 1998).

No Brasil, devido à simplificação de ecossistemas marginais às grandes bacias hidrográficas, construção de barragens e aumento de efluxos poluentes, muitas espécies de peixes com grande potencial para a aquicultura estão atualmente em risco de extinção (Lins *et al.*, 1997).

Embora se dominem técnicas de reprodução induzida de peixes utilizados na piscicultura como na conservação de espécies em risco (Sato *et al.*, 2003), o mesmo não acontece na larvicultura, fase em que ainda ocorrem as maiores perdas durante o processo produtivo (Landines Parra, 2003).

Apesar das inúmeras características favoráveis ao cultivo atribuídas às espécies nativas, a produção em grande escala ainda depara com problemas relacionados ao alto índice de canibalismo, principalmente em espécies carnívoras, à dificuldade de alimentação e aos elevados custos para manutenção dessas espécies (Luz *et al.*, 2001). Um dos aspectos fundamentais a ser considerado no momento de estudar uma espécie com potencial aquícola, se relaciona à suas exigências nutricionais e à definição melhor manejo alimentar para o seu crescimento. Com esse conhecimento, o organismo poderá receber o alimento adequado, natural ou artificial, possibilitando a obtenção de resultados produtivos satisfatórios em cada fase de desenvolvimento (Zavala Camin, 1996; Pezzato, 1997).

Os peixes carnívoros, em condições de cultivo, não aceitam de maneira voluntária rações balanceadas. Este entrave costuma inviabilizar a criação desses peixes em regime intensivo, uma vez que são necessários grandes esforços no sentido de condicionar tais espécies em função de alimentos secos industrializados (Lopes *et al.*, 1996; Moura *et al.*, 2000), sem que se abra mão, no entanto, de algum alimento vivo, principalmente nos primeiros dias após a abertura bucal. Além de contribuir com enzimas digestórias, o alimento vivo pode estimular respostas endócrinas, as quais, por sua vez, estimulariam as secreções pancreáticas nas larvas predadoras (Zambonino & Cahu, 2001). Portanto, a disponibilidade de alimento vivo é essencial (Furuya *et al.*, 1999), uma vez que fornece todos os nutrientes essenciais para o desenvolvimento inicial das larvas (Herbert, 1978), mesmo para a condição inicial do trato digestório incompleto e não totalmente competente para síntese e secreção de enzimas digestórias nesses indivíduos (Dabrowski & Glogowski, 1977; Verreth *et al.*, 1992).

Assim, o sucesso da aquicultura como bioindústria, especialmente na produção de peixes, depende da produção contínua e estável de larvas e alevinos (Atencio-García *et al.*, 2003).

A larvicultura e a alevinagem (cultivo das pós-larvas) têm por objetivo incrementar as taxas de sobrevivência e de crescimento a partir do oferecimento de condições ambientais adequadas, entre elas a definição de uma estratégia alimentar que garanta a quantidade e a qualidade dos alevinos (Atencio-García *et al.*, *op cit.*). A alimentação das formas jovens dos organismos aquáticos é um fator primordial em aquicultura, podendo determinar seu sucesso ou acarretar sérios problemas. Segundo Igarashi *et al.* (1999), entre os problemas que podem se tornar entraves para a

implantação de atividades de aquicultura, está a pesquisa sobre o requerimento nutricional básico dos organismos aquáticos. Um dos fatores considerados mais importantes para o sucesso em aquicultura é a utilização de alimento vivo, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento dos organismos cultivados (Souza & Klein, 1999).

Os peixes cultivados em viveiros utilizam seres vivos como fonte alimentar mesmo quando são arraçoados. A presença de zooplâncton nos viveiros, por exemplo, aumenta taxas de crescimento em peso, elevando, desta forma, a produtividade e otimizando a piscicultura, sem aumentar os custos de arraçoamento (Crispim *et al.*, 1999).

O plâncton é o alimento básico de quase todos os organismos aquáticos, principalmente nos primeiros dias do seu ciclo de vida, quando se verifica o maior índice de mortalidade (Pessoa & Klein, 1999). De acordo com Marcelino *et al.* (2000), no cultivo de peixes, os primeiros alimentos de todas as formas jovens logo após a absorção do saco vitelino, independente da espécie ou hábito alimentar, são os organismos do plâncton. Sua disponibilidade no ambiente leva a um melhor desempenho em relação ao desenvolvimento (Feiden & Hayashi, 2005).

A alimentação natural representa uma apreciável porção de proteínas de origem animal com alto valor biológico, ácidos graxos insaturados, vitaminas, minerais e outros nutrientes necessários aos peixes, diminuindo, assim, os custos com a suplementação desses nutrientes (Milstein *et al.*, 1995).

O zooplâncton representa uma importante fonte alimentar para organismos cultivados, tanto os marinhos quanto os de águas continentais. Vários trabalhos têm demonstrado o papel dos organismos zooplanctônicos na composição alimentar de espécies de peixes (Watanabe *et al.*, 1983; Sipaúba-Tavares, 1988; Atencio-García *et al.*, 2003).

Segundo Lovshin (1997), as tilápias (*Oreochromis niloticus*) ingerem uma grande quantidade de organismos do alimento natural, incluindo o zooplâncton. Esses autores afirmam que as tilápias utilizam organismos do alimento natural tão eficientemente que estoques de peixes de 3000 Kg/ha podem ser mantidos sem alimentação suplementar em viveiros bem fertilizados. Feiden & Hayashi (2005) ressaltam a importância do zooplâncton entre os itens alimentares nas fases larval e juvenil da piracanjuba (*Brycon orbignyannus*).

Oliveira *et al.* (2004), analisando o conteúdo estomacal de pirambeba (*Serrasalmus brandtii*), observaram a presença de vinte e dois itens alimentares, sendo que cladóceros e copépodos, em todos os estágios de desenvolvimento, constituíam dos mais importantes itens alimentares na dieta dos indivíduos enquadrados nas duas menores classes de tamanho (15-25 mm e 25-35 mm).

Além dos microcrustáceos, vários organismos aquáticos, tais como larvas de insetos quironomídeos, rotíferos, protozoários e algas, têm sido utilizados na alimentação de pós-larvas de peixes, mas nenhum com tanta intensidade e êxito quanto o Anostraca *Artemia salina*, originário de lagoas salinas costeiras e lagos salgados interiores. Essa espécie tem sido utilizada com grande sucesso em larvicultura de camarões e peixes.

Embora o zooplâncton seja o principal recurso utilizado pelas larvas na natureza (Gerking, 1994), em ambientes controlados, seu cultivo se torna oneroso. Além disso, a coleta de plâncton silvestre é sazonal, podendo sofrer modificações qualitativas e quantitativas (Radünz, 1999 *In*: Feiden *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, as lucrativas empresas de processamento de cistos de *A. salina* vêm sofrendo reveses em função das variações climáticas, elevando o custo e, conseqüentemente, o preço de mercado desse organismo que tem sido amplamente utilizado em pisciculturas do mundo inteiro (Lavens & Sorgeloos, 2000). Assim, o alto custo de produção de cistos, aliado à sua escassez no mercado, limita o crescimento das carciniculturas e pisciculturas que utilizam esses organismos como fonte alimentar.

No Brasil, com a expressiva expansão da carcinicultura, especialmente no nordeste do país, estima-se que até o final desta década serão necessários 120 toneladas de *Artemia* sp. para abastecer o mercado interno (Lopes, 2002).

Nesse sentido, o Anostraca dulcícolas da espécie nativa *Dendrocephalus brasiliensis* pode ser a resposta para as dificuldades relacionadas ao uso da *Artemia*. Conhecida popularmente e no meio da aquariorfilia como “branconeta”, essa espécie é filogeneticamente próxima às artêmias.

D. brasiliensis pertence a uma das cinco famílias de anostráceos registradas para a região neotropical, Thamnocephalidae. O gênero *Dendrocephalus* (Daday, 1908) é composto por 11 espécies distribuídas nas Américas tropical e subtropical (Belk e Sissom, 1992; e Rabet e Thiéry, 1996). *D. brasiliensis* tem ocorrência registrada desde a Argentina até o Piauí (César, 1989). No entanto, só são

encontradas em lagoas temporárias, isentas de peixes e de larvas de insetos, tais como Odonata, as quais são seus principais predadores. Contribui para a difícil observação deste organismo endêmico da região neotropical, a curta duração de seu ciclo de vida (cerca de 90 dias) e a não convivência de diferentes gerações em um mesmo habitat, já que o recrutamento de uma nova geração depende da sazonalidade extrema, que culmina com a seca total do corpo d'água. Essa condição ambiental que parece ter moldado, durante o processo evolutivo, a história de vida deste organismo, do qual pouco se conhece em relação à totalidade de seus aspectos biológicos e ecológicos. No Brasil, Adolpho Lutz fez o primeiro registro de ocorrência de *Dendrocephalus* no município de Macaíba (RN), em 1929, denominando a espécie encontrada de *Dendrocephalus ornatus*. No entanto, em 1941, Linder verificou que a espécie descrita por Lutz era, na verdade, sinonímia de *D. brasiliensis* registrada por Pesta em 1921 para a Bahia e Piauí (Linder *apud* Belk e Brtek, 1995).

D. brasiliensis poderia ser utilizada com vantagem sobre a *A. salina* na produção de biomassa, uma vez que podem atingir cerca de 25mm de comprimento, enquanto que as espécies de *Artemia* chegam a 11mm (Lopes, 1998). Além disso, trata-se de um organismo dulcícola de fácil cultivo em tanques de piscicultura e imensa atratividade para larvas, juvenis e adultos de peixes (Lopes *et al*, 1998).

O desenvolvimento de tecnologias para o cultivo e a produção eficiente de cistos viáveis de *D. brasiliensis* representa um avanço importante para a aquicultura brasileira, especialmente de água doce, contribuindo para o atendimento da demanda por alimento vivo ou inerte (biomassa). Além disso, uma vez que esses anostracas têm como principal habitat lagoas e poças temporárias das regiões semi-áridas brasileiras, conhecer detalhadamente sua biologia e entender seus processos produtivos possibilitaria a produção de alimentos e a geração de empregos em uma das regiões mais carentes do país.

Assim, o presente estudo enfocou o cultivo da espécie de Anostraca *D. brasiliensis* em sistemas experimentais semi-intensivos no Estado de São Paulo, de modo a obter informações sobre suas taxas de crescimento, viabilidade e condições ótimas para a eclosão dos cistos de resistência, alimentação e valor nutricional, buscando a produção de cistos e de biomassa, os quais poderão ser aplicados por

aquicultores para fins de produção em larga escala visando à alimentação de larvas e de alevinos de peixes e de camarões cultivados.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi buscar as condições ótimas, ambientais e de alimentação, para o cultivo do Anostraca *D. brasiliensis* em sistemas experimentais semi-intensivos, visando à utilização em aquicultura. Para tanto, foram realizados os seguintes estudos específicos:

- 1) Identificação dos principais fatores que influenciam as taxas de eclosão dos cistos de resistência de *D. brasiliensis*, através da avaliação da eclosão em diferentes condições (1) de temperatura, (2) de pH, (3) de densidade inicial de cistos no sedimento, e (4) de tempo de desidratação dos cistos após a seca e até a próxima eclosão.
- 2) Avaliação dos fatores ambientais que influenciam a sobrevivência, o desenvolvimento e o crescimento dos estágios iniciais de vida desta espécie.
- 3) Avaliação do desempenho de *D. brasiliensis* sob condições de cultivo semi-intensivo, através da avaliação de suas taxas de crescimento (individual e populacional) em dois períodos do ano (inverno e verão), com baixa e alta disponibilidade de recursos alimentares.
- 4) Determinação do valor nutricional desses animais através da determinação de sua composição bioquímica sob diferentes regimes alimentares.

CAPÍTULO 1

Eclosão de cistos *Dendrocephalus brasiliensis*

No capítulo 1, apresenta-se um estudo com a finalidade de identificar os principais fatores que influenciam as taxas de eclosão dos cistos de resistência de *D. brasiliensis*, a fim de determinarmos as melhores condições para obtenção de cistos viáveis para o cultivo dessa espécie em larga escala. Para isso, foram avaliadas as taxas de eclosão em diferentes condições de (1) temperatura, (2) pH, (3) densidade inicial de cistos no sedimento, e (4) tempo de desidratação dos cistos após a seca e até a próxima eclosão.

Os resultados do estudo são apresentados na forma de artigo científico, no manuscrito intitulado: “Fatores que influenciam as taxas de eclosão de cistos de resistência de *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)”

Fatores que influenciam as taxas de eclosão de cistos de resistência de *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)

Silva, R.A.C.¹, Melão, M.G.G.¹.

¹Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil.

ricardocustodioeco@gmail.com, (16) 3351 – 8757

Abstract

Temporary ponds are widespread ecosystems on a global scale, housing significant portion of aquatic biodiversity. endemic species of ephemeral environments present particular life cycles, intermittence governed by these environments, and knowledge of key factors in the life cycle of these species can provide important support in preserving these habitats. The ability to produce cysts resistance is a common adaptation to these organisms. In this study, we investigated how certain factors can influence the outbreak of anostraca cysts *Dendrocephalus brasiliensis* (branconeta), typical sort of temporary ponds, commonly found in the Brazilian semi-arid region, and potential interest in aquaculture. Tests were carried out under laboratory conditions with different temperature, pH and dissolved oxygen in water, density and cysts retention time. The results showed that the aeration is required to hatch under the conditions used. The cysts have a higher hatch above 25 ° C. Values of pH have no effect on the hatching rate. The sediment containing more than 2000 cysts in 300 ml of water shows very reduced hatching rate. After nine months of retention cysts hatch showed no drop in efficiency, yet the second hatching rate was practically zero. We believe that the initial outbreak rate is influenced by genetic character, and that different individuals to hatch at different times, in order to perpetuate the population in the habitat and overcome eventful unfit for reproduction

Key-words: Crustacea, Branchiopoda, resting eggs, diapause eggs, hatching.

Resumo

Lagoas temporárias são ecossistemas amplamente difundidos em escala global, abrigando parcela significativa da biodiversidade aquática. Espécies endêmicas de ambientes efêmeros apresentam ciclos de vida particulares, regidos pela intermitência destes ambientes, e o conhecimento de fatores-chave no ciclo de vida destas espécies pode fornecer subsídios importantes na preservação destes habitats. A capacidade de produzir cistos de resistência é uma adaptação comum a estes organismos. Neste estudo, investigamos como alguns fatores podem influenciar a eclosão dos cistos do anostráceo *Dendrocephalus brasiliensis* (branconeta), espécie típica de lagoas temporárias, comumente encontrada na região semiárida brasileira e de potencial interesse na aquicultura. Foram realizados testes em laboratório com diferentes condições de temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água, densidade e tempo de desidratação e cistos. Os resultados mostraram que a aeração é necessária para eclosão nas condições experimentais utilizadas. Os cistos apresentam maior eclosão acima de 25°C. Os valores de pH não tiveram efeito na taxa de eclosão. O sedimento contendo mais de 2000 cistos em 300 mL de água apresenta taxa de eclosão muito reduzida. Após nove meses de desidratação, os cistos não apresentaram queda na eficiência de eclosão, contudo a taxa de re-eclosão foi praticamente nula. Acreditamos que a taxa de eclosão inicial é influenciada por caráter genético, e que diferentes indivíduos eclodam em tempos diferentes, visando perpetuar a população no habitat e superar eventos de cheia impróprios para reprodução

Palavras-chave: Crustacea, Branchiopoda, ovos de resistência, cistos de resistência, eclosão.

Introdução

Lagoas temporárias são ecossistemas amplamente difundidos pelo planeta, sendo encontradas em diferentes regiões e regidas por diferentes climas. O que as caracteriza é a intermitência marcada por período de seca, a qual ocorre durante o inverno na maioria das regiões tropicais, e durante o verão em zonas temperadas. Nestes ambientes de água-doce, pode-se encontrar uma enorme diversidade biológica. Diversos trabalhos destacam a importância deste habitat evidenciando a sua enorme riqueza, inclusive de inúmeras espécies raras endêmicas (Williams *et al*, 2003; Biggs *et al*, 2005).

Devido a grande variabilidade no hidroperíodo, à complexidade da estrutura e à composição de plantas aquáticas, bem como à ausência de predadores de topo da cadeia alimentar (Collinson *et al.*, 1995, Scheffer *et al.*, 2006), as lagoas temporárias tornam-se ambientes propícios para o surgimento de espécies raras ou endêmicas (De Meester *et al.*, 2005)

A importância atribuída às lagoas temporárias tem crescido nos últimos anos, sendo consideradas pontos-chave para a conservação. Isto se deve não apenas ao fato de abrigarem espécies raras e ameaçadas, mas também por sofrerem altas taxas de degradação ambiental e eliminação de espécies (Blaustein and Schwartz, 2001). Devido a seu ciclo peculiar, também têm sido de grande importância no estudo da dinâmica e da estrutura de comunidades de invertebrados aquáticos (Vanschoenwinkel *et al.*, 2009).

Organismos zooplanctônicos têm sua história de vida influenciada por inúmeros fatores abióticos e bióticos, os quais podem afetar positiva ou negativamente a sua sobrevivência, crescimento e reprodução. Quando exposto a condições desfavoráveis, o zooplâncton pode apresentar alterações no comportamento, na morfologia e no ciclo de vida, visando, em última instância, à manutenção do *pool* gênico e a persistência das populações. Dessa forma, a capacidade de desencadear um período de dormência dos organismos zooplanctônicos é um aspecto marcante do ciclo de vida, permitindo a superação de períodos que seriam inviáveis à sobrevivência das formas ativas (Santangelo 2009). A dormência é uma das características mais evidentes entre o zooplâncton. Condições ambientais adversas são consideradas como sinal para

desencadear a produção de fases latentes (Brendonck e De Meester, 2003; Araújo, et al. 2013)

A maioria dos grupos característicos do zooplâncton de ambientes de água doce perenes também está presente em ambientes efêmeros. Normalmente considerados como animais de vida curta, com altas taxas de crescimento populacional (Fenchel 1974, Allan e Goulden 1980, Banse e Mosher 1980), capacidade de responder rapidamente às mudanças ambientais (Peters, 1983), e uma alta sensibilidade à perturbação antrópica (Moore e Folt 1993; Locke e Sprules 1994), o zooplâncton reúne muitas das características pertinentes para organismos deste tipo de habitat. Dentre estas, uma característica crucial para se colonizar e habitar tais ambientes é a capacidade para produzir ovos de resistência ou diapausa (Hairston et al. 1995). Os ovos ou cistos de resistência depositados no sedimento de lagos representam, portanto, um "banco de ovos", análogo aos bancos de sementes de muitas plantas terrestres (Hairston e De Stasio 1988; De Stasio 1989; Marcus et al., 1994).

Muitos organismos zooplanctônicos, tais como crustáceos, insetos (Fryer, 1996; Rossi *et al.*, 1996) e rotíferos (King ; Snell, 1980; Gilbert, 1995), têm a capacidade de produzir estágios de diapausa, os quais lhes permitem sobreviver em ambientes que se tornem inóspitos em determinadas épocas. As causas que levam ao início da diapausa podem ser várias. Em *Daphnia sp.* (Cladocera), por exemplo, a presença de predadores pode ser o sinal ambiental para a formação dos efípios (Slusarczyk, 1995; Pijanowska ; Stolpe, 1996); em rotíferos, a produção de ovos de resistência está diretamente relacionada com a densidade populacional, ocorrendo reprodução sexuada quando os picos de densidade são mais elevados (King ; Snell, 1980); a diminuição de alimento também influencia a produção de um novo estágio de diapausa em rotíferos (Gilbert, 1995). Em copépodos calanoides, a temperatura e a disponibilidade de alimento podem ser os fatores responsáveis pela indução de diapausa (Jersabek ; Schabetsberger, 1995).

Em especial, podemos citar os organismos pertencentes à ordem Anostraca (Crustacea: Branchiopoda), habitantes comuns de lagoas temporárias, cosmopolitas e amplamente estudados. Os Anostraca são um elemento comum da fauna de ambientes aquáticos temporários de água doce (*fairy shrimps*) e/ou salina (*brine*

shrimps). Essa ordem inclui pelo menos 258 espécies que estão atribuídas a 21 gêneros e oito famílias (Belk, em Dodson e Frey, 1991; Belk e Brtek, 1995).

O Anostraca dulcícola *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921), popularmente conhecido como “branconeta”, tem ocorrência natural na região Neotropical, com uma distribuição geográfica que se estende da Argentina ao Estado do Piauí, no Brasil (Cesar, 1989). As branconetas são endêmicas de lagoas temporárias isentas de peixes e de larvas de insetos (tais como Odonata), os quais representam seus principais predadores.

Segundo Lopes (2007), a espécie apresenta inúmeras características interessantes para a aquicultura, como alto teor de proteínas e alta taxa de crescimento. O ciclo de vida curto (cerca de 90 dias) é caracterizado pela não convivência de diferentes gerações em um mesmo habitat, já que o recrutamento de uma nova geração depende da sazonalidade extrema, culminando com a seca total do corpo d’água, isto devido às branconetas se reproduzirem por meio de cistos de resistência. Desta forma, para se estabelecerem técnicas satisfatórias de cultivo desta espécie, é necessário um manejo adequado para a produção contínua de cistos (Lopes, 2007).

Além da sazonalidade das lagoas temporárias, a alta sensibilidade destes habitats a fatores ambientais externos, bem como interações biológicas na comunidade, também têm grande influência na dinâmica populacional de anostracas, como *D. brasiliensis*. Dentre estes fatores, a temperatura parece desempenhar papel crucial, sendo responsável até mesmo pela distribuição latitudinal de algumas espécies, influenciando as taxas de predação na comunidade (Ewald *et al*, 2013). Todos estes fatores determinantes na dinâmica de lagoas temporárias, podem influenciar a eficiência de eclosão dos cistos de resistência presentes no sedimento.

No presente estudo, objetivamos identificar os principais fatores que influenciam as taxas de eclosão dos cistos de resistência de *D. brasiliensis*, a fim de determinarmos as melhores condições para obtenção de cistos viáveis para o cultivo dessa espécie em larga escala, visando em última instância seu uso em aquicultura, bem como gerar informações que possam subsidiar possíveis medidas de manejo em lagoas temporárias, visando à preservação do banco de ovos de resistência do zooplâncton em geral. Para isso, foram avaliadas as taxas de eclosão em diferentes

condições (1) de temperatura, (2) de pH, (3) de densidade inicial de cistos no sedimento, e (4) de tempo de desidratação dos cistos após a seca e até a próxima eclosão.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Plâncton e na Estação Experimental de Aquicultura (EEA) do Departamento de Hidrobiologia (DHb) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os sedimentos contendo os cistos de resistência de *D. brasiliensis* foram provenientes de cultivos anteriores realizados na mesma EEA. Todo o sedimento utilizado foi homogeneizado para garantir que todas as possíveis linhagens distintas pudessem estar presentes em todas as réplicas. Após a completa secagem dos tanques, o sedimento foi recolhido para mais um período de secagem, em temperatura ambiente, por 10 dias, a fim de se simular o período de estiagem necessário a eclosão dos cistos.

O sedimento utilizado nos experimentos em laboratório foi triturado manualmente, para facilitar a contagem dos cistos e a pesagem do sedimento.

Separamos 20 amostras contendo 1 g de sedimento para contagem dos cistos. Foram feitos os cálculos de estatística descritiva para essas contagens, e o valor médio (cistos g⁻¹) foi utilizado para estimar a quantidade de sedimento a ser utilizada nos testes.

O método de eclosão utilizado foi baseado naquele descrito por Brendonck (1992), onde 1000 cistos eram eclodidos em 200 mL de água, acondicionados em béqueres de 2 L de volume. Adaptamos o volume de água para 300 mL, pois trabalhamos com sedimento contendo cistos e não com cistos puros, com o intuito de mantermos a mesma altura de coluna d'água no béquer. Desta forma, a condição padrão adotada foi de 1000 cistos, com 300 mL de água desclorada, em temperatura de 25 °C e pH 7. A coleta era feita 24 horas após o enchimento dos béqueres. A água contendo os náuplios eclodidos foi filtrada em rede de 100 µm de abertura de malha, sendo que os náuplios e cistos retidos na rede eram coletados, fixados em formol a 4% e guardados em frascos plásticos para posterior contagem em microscópio estereoscópico (Leica DMLS).

Para cada variável testada, foi utilizado um grupo controle como referência. Cada tratamento foi realizado com seis réplicas. Nestes ensaios testamos: temperatura, pH, aeração, tempo de desidratação (diapausa) inicial e de re-eclosão, assim como a densidade de cistos iniciais.

Na metodologia proposta por Brendonck (1992), a eclosão ocorria sob constante aeração, mantendo a água saturada de oxigênio. Contudo, em cultivos prévios de *D. brasiliensis* em laboratório, observamos um efeito negativo da constante aeração na sobrevivência de indivíduos jovens, por isso testamos o efeito da aeração para confirmar se este mesmo efeito indesejado ocorria na eclosão. Os resultados mostraram que a aeração é indispensável para a eclosão dos cistos (vide Resultados), e portanto foi utilizada nos demais ensaios.

No experimento para avaliar o efeito da densidade de cistos na eclosão, utilizamos inicialmente três quantidades: 750, 1125 (controle) e 2250 cistos. Neste ensaio, além de contarmos os náuplios eclodidos, também contamos os cistos que por ventura foram coletados para estimar os cistos restantes no sedimento. O sedimento restante destes testes foram guardados e utilizados em novos experimentos após três meses (cistos remanescentes dos testes com 750 cistos) e após 6 meses (cistos remanescentes dos testes com 1125 cistos).

A partir dos resultados obtidos neste primeiro teste de densidade, realizamos um novo experimento, desta vez combinando as diferentes densidades de cistos com dois diferentes volumes de água. Foi necessária uma nova contagem, novamente utilizando 20 amostras contendo 1 g de sedimento cada para obtermos nova média e estimarmos a quantidade de sedimento necessária, uma vez que o sedimento originalmente utilizado havia acabado e um novo lote de sedimento foi coletado para este novo experimento. Foram utilizados tratamentos com 1500 ou 3000 cistos, em 300 ou 600 mL, sendo considerado controle aquele com 1500 cistos em 300 mL. Considerando $N = 1500$ cistos, e $X = 300$ mL de água, tivemos as seguintes combinações: N/X , $N/2X$, $2N/X$ e $2N/2X$.

Para avaliarmos o efeito da temperatura na eclosão, realizamos testes em três temperaturas diferentes: 18, 25 e 30° C, sendo 25° C o valor de temperatura de referência. A coleta e a contagem dos náuplios foram realizadas como descrito acima.

Para testar o efeito do pH na eclosão, foram utilizados cinco diferentes valores de pH: 5, 6, 7, 8 e 9. Para se obter os valores de pH desejados, foi adicionada solução de 10% de ácido clorídrico ou solução de 10% de hidróxido de sódio para pH ácido ou alcalino, respectivamente.

O tempo de desidratação foi testado de duas maneiras: em um dos ensaios utilizamos cistos do lote original, como em todos os testes supra citados; em outro experimento, foram utilizados os cistos restantes da eclosão no primeiro teste de densidade. Com isso, esperávamos avaliar se os cistos que passaram por um processo de hidratação teriam menor taxa de eclosão após novo período de desidratação. Os tempos de desidratação foram de três, seis e nove meses após os primeiros testes de densidade. O sedimento desidratado foi mantido em bandejas, sob temperatura ambiente (entre 22 e 27^o C) e fotoperíodo 12/12 horas de claro/escuro.

Análises Estatísticas

Para análise dos resultados obtidos, foram realizados testes de análise de variância entre as porcentagens de náuplios eclodidos entre os diferentes tratamentos em cada variável estudada (*one way ANOVA*), método de Holm-Sidak *a posteriori* para resultados paramétricos e teste de Tukey ranqueado para resultados não-paramétricos. Sempre que possível, o nível de confiança dos testes foi de $\alpha = 0,05$. Os cálculos estatísticos e a elaboração dos gráficos foram realizados com auxílio do software *SigmaPlot 11.0*.

Resultados

Assim como na técnica proposta por Brendonck (1992), os cistos de *D. brasiliensis*, nas condições utilizadas, necessitam de aeração para a eclosão. A eclosão média sem aeração foi praticamente nula (0,64%). Com aeração constante, a taxa de eclosão média foi de 19,93%.

Segundo o resultado da análise de variância, foi observada diferença significativa entre os tratamentos com diferentes temperaturas. A taxa de eclosão média a 25°C foi de 27,36% e não diferiu significativamente ($p = 0,062$), segundo método de Holm-Sidak, da taxa de eclosão média a 30°C, a qual foi de 20,31%. Contudo, a taxa de eclosão média a 18°C, 16,66%, foi significativamente ($p = 0,011$ com $\alpha = 0,025$) menor que a taxa de eclosão do grupo controle (Figura 1).

Taxa de eclosão (Temperatura)

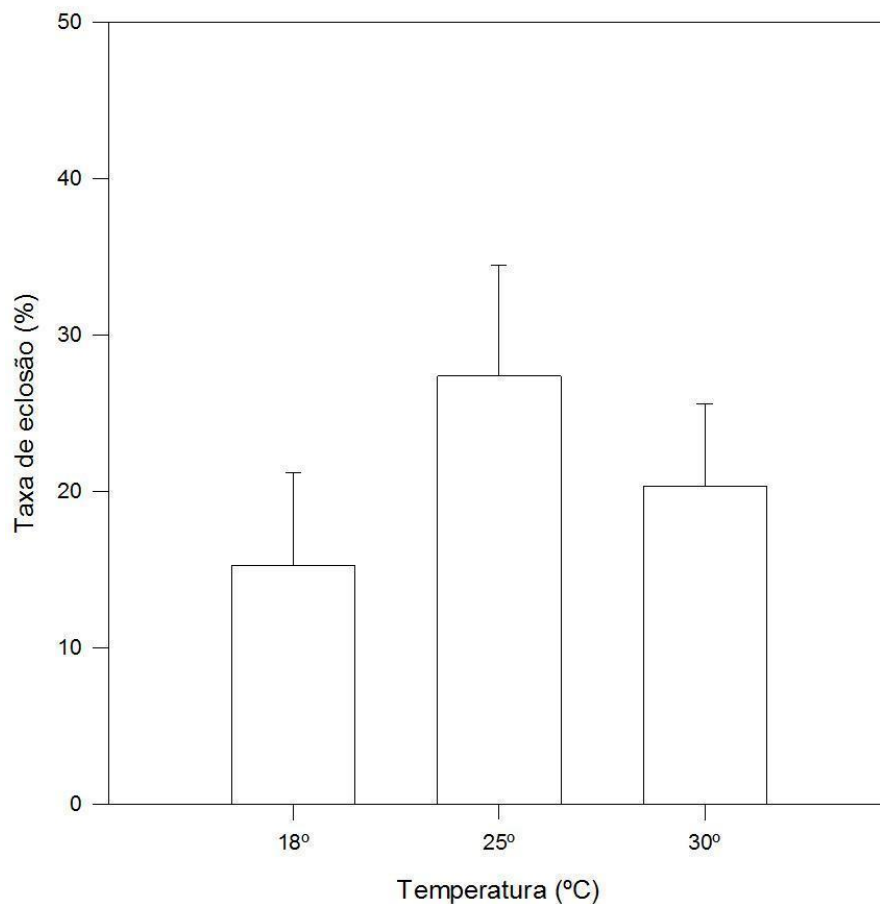


Figura 1: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* em três temperaturas experimentais.

Nos testes com diferentes valores de pH, houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,028$), contudo, na comparação múltipla utilizando método de Holm-Sidak, nenhum dos tratamentos diferiu significativamente do grupo controle. A taxa de eclosão média em pH 7 foi 25,93%, em pH 5 foi 17,4%, em pH 6 foi 28,91%, em pH 8 foi 18,05% e em pH 9 foi de 19,78%, como podemos observar na Figura 2.

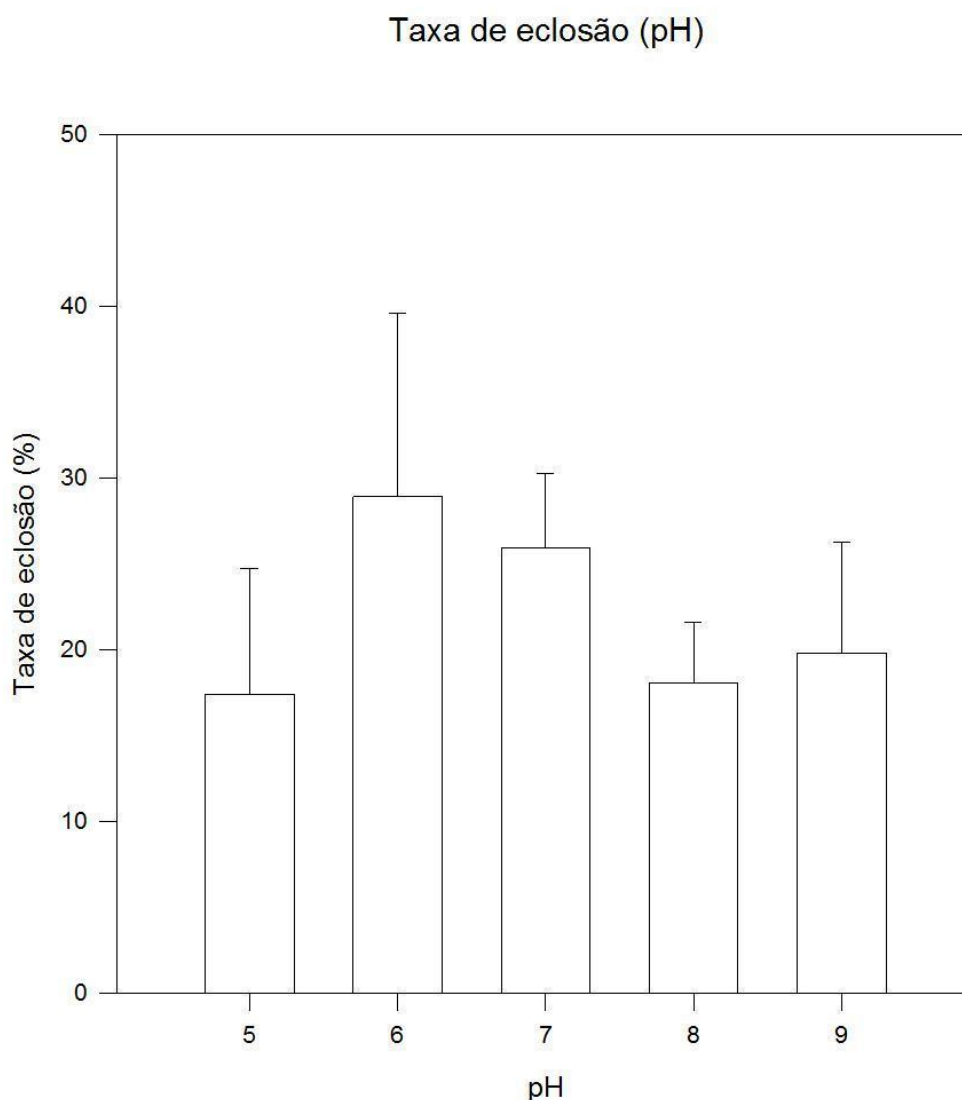


Figura 2: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* em cinco valores experimentais de pH.

No primeiro teste de densidade, a menor taxa de eclosão média, 9,09%, foi observada com 2250 cistos. A taxa de eclosão com 750 cistos, com média de 24,05%, também foi significativamente menor ($p = 0,024$) que a taxa de eclosão observada no grupo controle, contendo 1125 cistos, que foi de 30,71%. Estes resultados estão resumidos na Figura 3. O número aproximado de náuplios eclodidos em média foi: 180, 230 e 68 náuplios entre 750, 1125 e 2250 cistos, respectivamente.

Taxa de eclosão em diferentes densidades

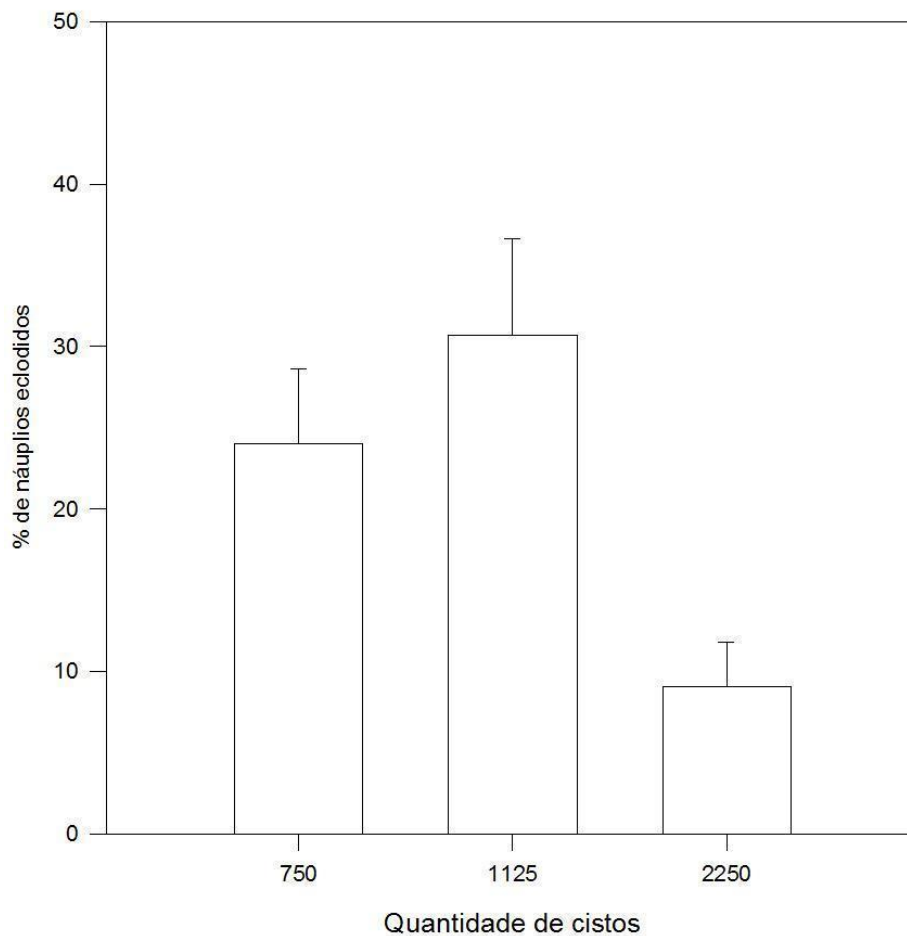


Figura 3: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) para três densidades iniciais de cistos de resistência de *D. brasiliensis* utilizadas no primeiro ensaio.

A análise de variância entre as diferentes densidades iniciais de cistos de resistência e volumes testados mostrou que os tratamentos utilizados no segundo ensaio de densidade de cistos diferiram significativamente, com $p = <0,001$. Contudo, o teste de equidade de variâncias falhou, então neste caso, foi realizada comparação pareada ranqueada com teste de Tukey.

Neste segundo teste de densidade de cistos, a menor taxa de eclosão média, 6,73%, foi observada quando utilizamos 3000 cistos em 300 mL (2N/X), a qual diferiu significativamente do grupo teste com 3000 cistos em 600 mL (2N/2X), onde a taxa de eclosão média foi de 57,8%, com $p < 0,05$. Dentre os demais tratamentos, o teste de Tukey aponta que não há diferença significativa. A taxa de eclosão média no grupo controle (N/X) foi de 31,5%. Na densidade com 1500 cistos em 600 mL (N/2X), a taxa de eclosão média foi de 36,33%. Na Figura 4, observamos um resumo das taxas de eclosão médias obtidas em cada tratamento, bem como os respectivos desvios padrão. A quantidade aproximada de indivíduos eclodidos em média a cada 300 mL foi: 461 (N/X), 243 (N/2X), 188 (2N/X) e 833 (2N/2X) náuplios.

Taxa de eclosão em diferentes densidades e volumes

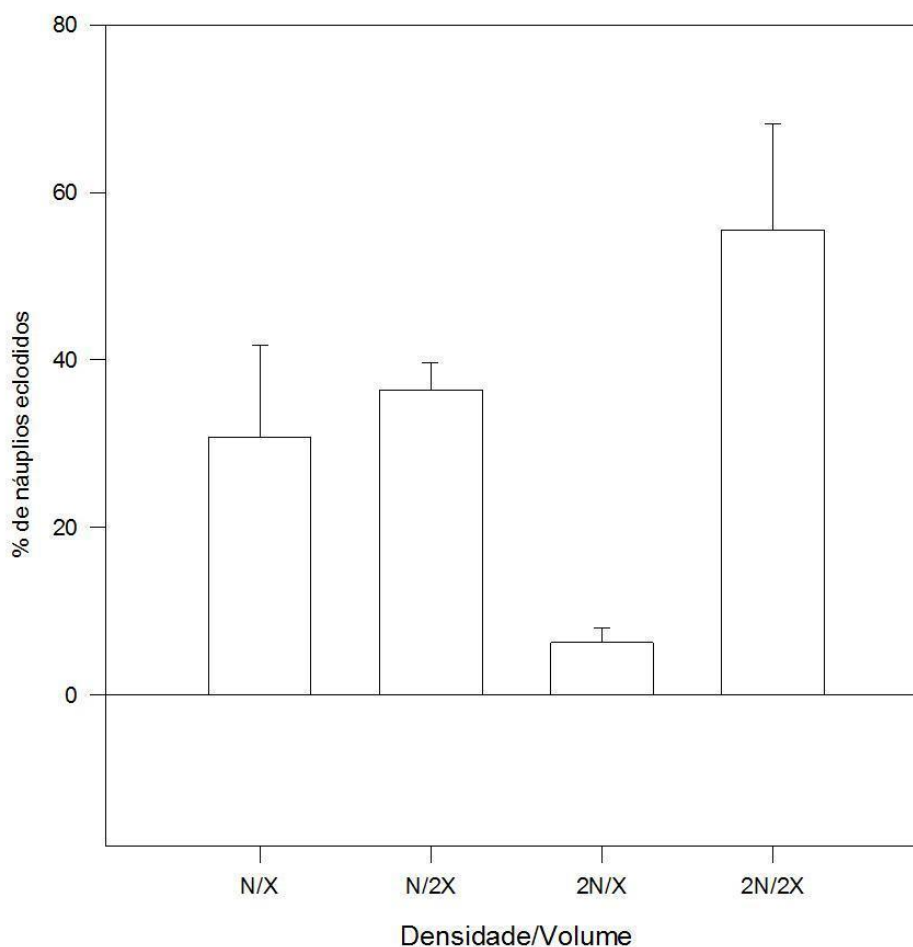


Figura 4: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* em cada combinação experimental de densidade inicial de cistos e volume, onde N = 1500 cistos e X = 300 mL de água.

Os resultados do teste de re-eclosão foram praticamente nulos. Apenas 0,92% e 0,81% dos cistos restantes no sedimento eclodiram 3 e 6 meses após a primeira eclosão, respectivamente. Nenhum cisto eclodiu 9 meses após a primeira eclosão.

Comparativamente, os resultados do teste de tempo de desidratação dos cistos mostraram que não existe diferença na taxa de eclosão dos cistos após diferentes períodos de desidratação. Entre os três períodos testados, não houve diferença

significativa ($p = 0,72$). A taxa de eclosão média foi de 19,45%, 17,4% e 16,45% após 3, 6 e 9 meses de desidratação, respectivamente (Figura 5).

Taxa de eclosão após período de desidratação

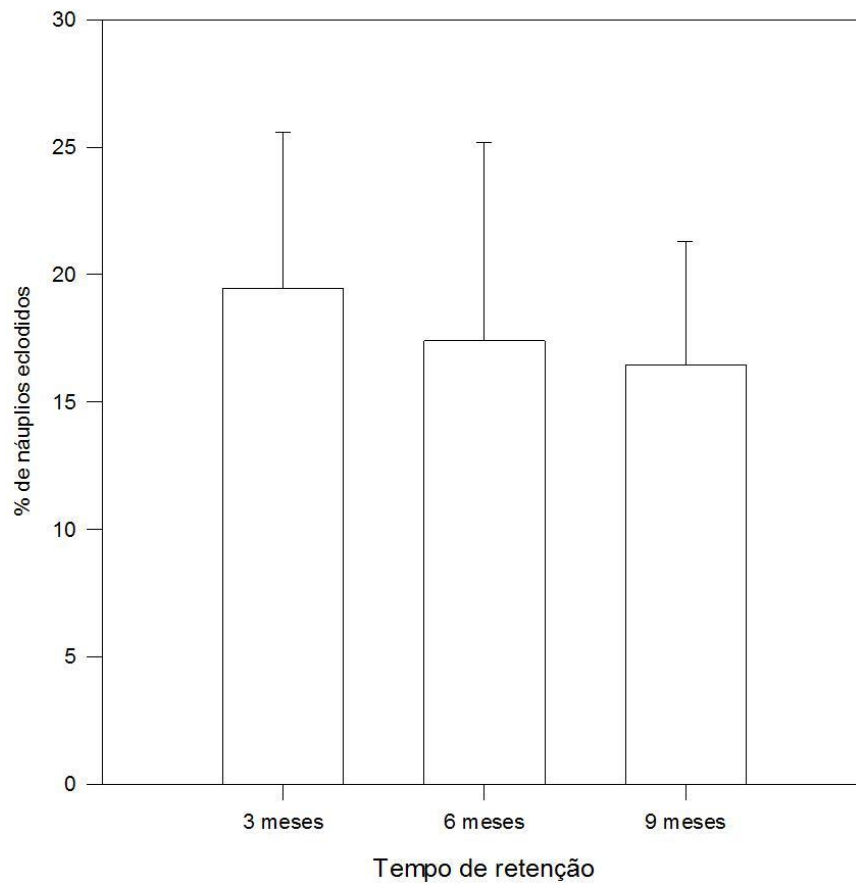


Figura 5: Representação gráfica dos valores médios de taxa de eclosão (e desvios) dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* após três diferentes tempos de desidratação de cistos.

Discussão

Os resultados mostraram que a aeração é indispensável para que ocorra eclosão dos cistos nas condições experimentais aqui adotadas. Contudo, acreditamos que o papel da aeração, neste caso, seja o de movimentar os cistos presentes no sedimento, e que não exista nenhuma relação com a saturação de oxigênio promovida pela aeração. Vasconcelos (2011) testou o efeito da aeração com cistos puros de *D. brasiliensis* e constatou que a aeração não era necessária para eclosão, reforçando a hipótese de que quando são utilizados cistos misturados ao sedimento, a aeração pode ajudar no desprendimento dos cistos do sedimento.

Grande parte dos trabalhos sobre eclosão de cistos de resistência aborda espécies de rotíferos ou cladóceros, sendo muito escassos os estudos com espécies consideradas mesozooplânctônicas - espécies com tamanhos entre 0,2 e 20 mm (Rossi, 1996). Além disso, também são poucos os trabalhos experimentais em condições controladas de laboratório, sendo a maioria dos estudos sobre sedimento coletado em campo, ou mesmo as análises dos bancos de ovos *in situ*. Com isso, nosso estudo vem agregar à literatura atual sobre o tema, com dados e aspectos pouco abordados (Brendonck, 2003).

Os anostracos de água doce que habitam corpos d'água efêmeros, periodicamente passam por período de estiagem e, portanto, de desidratação, e para resistir a essas condições, possuem algumas adaptações específicas: I) apresentam apenas um ciclo populacional por cheia; II) produzem cistos de resistência e; III) são resistentes a mudanças na qualidade da água. Entre os fatores abióticos, a temperatura desempenha um papel importante (Sarma et al., 2005). Por isso e devido as observações em cultivos prévios em nossa EEA, supomos que a temperatura inicial da água de eclosão pudesse desempenhar um papel determinante na eclosão dos cistos. Observamos que acima de 25°C temos maior eficiência de eclosão dos cistos de resistência. A taxa de eclosão média de 16,66% registrada sob a temperatura mais fria (18°C), apesar de significativamente menor que aquela observada no grupo controle, é uma taxa de eclosão próxima daquela obtida por Lopes (2007), onde foram utilizados cistos desencapsulados à temperatura de 25°C, resultando em um percentual de eclosão de 20,41%. Apesar dos registros de temperatura com melhores resultados no cultivo de *D. brasiliensis* serem acima dos 25°C (Lopes, 2007; Vasconcelos, 2011), acreditamos que esta amplitude seja menos restrita para a

temperatura da água no momento da eclosão, uma vez que no ambiente natural, as lagoas temporárias são preenchidas pela água da chuva, esta por sua vez, tem temperatura variável, apresentando também baixas temperaturas (Mirlean *et al.*, 2000).

Os resultados dos testes com diferentes valores experimentais de pH mostraram que na eclosão inicial, dentro da amplitude testada, não ocorreu diferença da taxa de eclosão dos cistos. Em Vasconcelos (2011) e Lopes (2007), os melhores percentuais de eclosão ocorreram em pH alcalino (\sim pH = 8). Entretanto, trabalhos citados, não foram testados diferentes tratamentos, apenas mediu-se os valores de pH, assim como de outras variáveis para controle da qualidade da água, logo qualquer variação de pH não foi fruto de manipulação experimental e pode ter sido considerada como nível ideal sem de fato ter influência na taxa de eclosão. Coelho (2015) anotou os valores de pH na represa de Furnas-MG, onde observou a presença de cistos de resistência de diversas espécies zooplanctônicas no sedimento coletado, desde rotíferos e cladóceros a copépodos calainodes. No referido estudo observou-se que a variação de pH ao longo do período amostrado não teve impacto na diversidade das espécies encontradas, sugerindo que esta variável não seja inibidora ou estimulante da eclosão de cistos de resistência. Porém, também encontramos na literatura trabalhos que relatem a possível influência de fatores abióticos, incluindo valores de pH, na seleção de algumas espécies. Arnot, *et al.* (2002) observaram que alguns lagos efêmeros, após longos períodos de seca e de acidificação, apresentaram um aumento na riqueza de espécies de crustáceos – de 10 para 18 espécies. Os autores acreditam que as flutuações nos valores de temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e pH da água possam estimular a eclosão de ovos de resistência de diferentes espécies.

Os resultados do primeiro teste de densidade de cistos nos levaram à hipótese de que exista algum mecanismo que evite a total eclosão dos cistos de branconetas.

Diferentemente de outras espécies zooplanctônicas, *D. brasiliensis* não recorre aos cistos de resistência apenas em condições adversas, mas em todos os ciclos de vida, pois esta condição já é intrínseca do modo de vida desta espécie (Lopes, 2002). Dessa forma, é plausível considerarmos que os baixos percentuais de eclosão de cistos da espécie sejam uma adaptação evolutiva, uma vez que previnem a perda total do banco de ovos em uma cheia que eventualmente não seja suficiente para

completar um ciclo reprodutivo da espécie, o que resultaria no desaparecimento da população naquele ambiente. O recrutamento parcial pode garantir que o banco de cistos seja explorado em diferentes eventos de cheia, aumentando as chances de sucesso reprodutivo em escalas maiores de tempo. Esta idéia também foi proposta por Arnot *et al.* (2002). Os autores registraram um aumento na diversidade de crustáceos em lagoas temporárias que sofreram com uma seca severa de até dois anos. Estes achados também concordam com nossos resultados nos testes de tempo de desidratação dos cistos de branconeta. Após nove meses, a taxa de eclosão não diferiu das taxas dos cistos recém coletados, dando indícios de que os cistos têm capacidade de suportar longos períodos de estiagem, mantendo os mesmos percentuais de eclosão (De Meester *et al.*, 1993, 2005). Em contrapartida, no experimento de re-eclosão, a eclosão fracassou e foi virtualmente nula. Uma observação ao microscópio óptico após a contagem deste ensaio revelou que os cistos não apresentavam indícios de degradação ou qualquer rompimento aparente.

Uma das hipóteses levantadas para explicar a baixa taxa de eclosão na maior densidade testada, foi de que os náuplios eclodidos pudessem inibir a eclosão de novos cistos, o que motivou a realização de novos testes de densidade, desta vez com mais cistos e incluindo um maior volume de água, visando com isso testar a possibilidade de alguma substância diluída estar envolvida no processo. Dentre as novas densidades testadas, 2X/N (3000 cistos em 300 mL de água) repetiu-se a baixa taxa de eclosão observada para 2250 cistos no primeiro teste. Contudo, quando utilizamos a mesma quantidade de cistos que o controle (1500), em maior volume de água (600 mL), a quantidade proporcional ao volume de náuplios eclodidos (243) foi menor que aquela observada no grupo controle (461), ou seja, se alguma substância liberada pelos náuplios pós-eclosão tivesse efeito inibidor, a quantidade total esperada de náuplios eclodidos em um mesmo volume seria aproximadamente a mesma. Portanto, nossos resultados não corroboram a hipótese de que exista algum inibidor da eclosão de novos cistos. A taxa de eclosão observada na última densidade, com 3000 cistos em 600 mL foi a maior encontrada neste estudo (~60%), com 833 náuplios eclodidos em 300 mL de água, reforçando a idéia de que não haja tal fator inibidor pós-eclosão. Acreditamos que a redução do percentual de eclosão quando utilizamos uma maior concentração de cistos se deva na verdade a maior quantidade de sedimento presente, o que acarreta em maior quantidade de matéria orgânica

dissolvida, esta por sua vez pode ocasionar algum efeito que reduza a taxa de eclosão.

A eclosão de um ovo de resistência depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos aos mesmos. Em primeiro lugar, todo ovo de resistência deve passar por um período refratário antes de estar apto para eclodir (Stross 1987), isto é, após a postura pela fêmea, o ovo precisa permanecer um período submerso antes de passar por desidratação. Este mesmo efeito foi testado e comprovado por Vasconcelos (2011). Em nosso estudo, este período também foi respeitado e não deve ter influenciado os percentuais de eclosão encontrados. Entre os fatores intrínsecos que influenciam a eclosão dos cistos estão a idade, o genótipo e a qualidade do ovo (De Meester ; De Jager 1993b; De Meester et al. 1998). A idade, neste caso, pode ser interpretada com o mesmo sentido que empregos no termo tempo de desidratação, embora tenhamos encontrado na literatura que a idade das fêmeas no momento de postura dos cistos possa interferir na qualidade dos cistos. Zarattini (2004) realizou estudo no lago Tilia (Itália) e observou que os cistos produzidos no início da fase reprodutiva das fêmeas de *Chirocephalus diaphanus* (Prévost, 1803) (Crustacea: Anostraca) apresentaram uma taxa de eclosão cumulativa maior (78,5%) do que aquelas já no final do ciclo de vida (36,5%). Este fator não foi considerado no presente estudo e, tratando-se de uma espécie de Anostraca, é possível que *D. brasiliensis* apresente esta mesma característica quanto à qualidade dos cistos, o que em nosso caso pode ter resultado em baixos percentuais de taxa de eclosão de modo geral. Este fato poderia ainda explicar a diferença entre as taxas de eclosão do primeiro ensaio de densidades (em torno de 25%) e do segundo ensaio (em torno de 40%).

Além da idade e da qualidade dos ovos, é necessário também considerar o genótipo das populações. É possível que a manutenção da baixa taxa de eclosão seja um caráter genético, com diferentes períodos de desidratação dentro da população. Desta forma, uma porção da população é destinada a eclodir na primeira cheia, enquanto outros indivíduos precisem de um maior tempo de estiagem ou mesmo de hidratação. Apesar de não termos dados quanto a variabilidade genética dos indivíduos aqui estudados, é seguro presumir que uma espécie endêmica de um ambiente tão suscetível, necessite manter um pool gênico que permita a adaptação frente as perturbações ambientais.

Entre os inúmeros fatores extrínsecos afetando a eclosão dos estágios dormentes do zooplâncton, temperatura e fotoperíodo foram também os que historicamente receberam a maior atenção (Stross 1966; Schwartz ; Hebert 1987; Vandekerkhove et al. 2005a). De forma geral, baixas temperaturas e exposições à luz por curtos intervalos de tempo ao longo do dia reduzem as taxas de eclosão. Tal fato indica que fatores abióticos são os mais importantes para a eclosão. Entretanto estes estudos envolveram espécies de zonas temperadas, onde o fotoperíodo tem grande variação e as baixas temperaturas são constantes. Em trabalhos prévios realizados em nosso laboratório, já foi testada a exposição dos cistos à luz, bem como uma hidratação prévia para ativação dos cistos, como proposto por Lopes (2007). Apenas a completa privação de luz diminuiu a taxa de eclosão dos cistos e, diferentemente do proposto, o cistos não precisam de hidratação prévia para ativação. Outros fatores abióticos que reduzem as taxas de eclosão são exposições a valores extremos de pH (Arnott ; Yan 2002; Brown 2008), seca (Brock et al. 2003; Chittapun et al. 2005), déficit de oxigênio (Clegg 1997) e elevadas salinidades para espécies de água doce (Bailey et al. 2004; Bailey et al. 2006). Estes fatores inibem a eclosão mas de forma geral não afetam a viabilidade dos ovos, uma vez que parte destes permanece apta a eclodir após o retorno de condições favoráveis. Apesar disso, não testamos valores extremos de pH. A amplitude dos níveis de pH e temperatura testados foram baseadas naquelas comuns de estações de aquicultura, onde existe um controle mínimo dos níveis de pH, e a temperatura imposta pelas estações climáticas já é um fator que rege a produção como um todo, uma vez que estes ensaios visam identificar possíveis fatores que influenciem a eclosão inicial de cistos, já que a sobrevivência dos náuplios pós eclosão é tema para outro capítulo.

Conclusões

A eclosão de cistos de resistência de *D. brasiliensis* contidos em sedimento em condições controladas de laboratório apresentou taxas de eclosão baixas, comparadas com a literatura.

Os resultados evidenciaram que a aeração é indispensável na eclosão dos cistos de resistência de *D. brasiliensis* nas condições experimentais, possivelmente por promover a movimentação do sedimento com consequente liberação dos cistos.

A taxa de eclosão foi maior acima de 25°C, condizendo com as altas temperaturas do habitat natural de *D. brasiliensis*. Contudo, a taxa de eclosão a 18°C foi pouco inferior, mostrando a alta capacidade adaptativa da espécie.

Os diferentes valores experimentais de pH não influenciaram as taxas de eclosão inicial dos cistos, reforçando a resistência dos mesmos a alterações da qualidade da água.

Densidades de cistos maiores que 2000 cistos por 300 mL de água apresentaram drástica redução na taxa de eclosão, o que pode ser causado pelo acúmulo de matéria orgânica dissolvida liberada do sedimento.

A espécie apresenta algum mecanismo que previna a total eclosão dos cistos presentes no sedimento, o qual acreditamos que seja fruto de variação genética dentro da população, permitindo o recrutamento diferenciado ao longo do tempo.

Os cistos são capaz de resistir pelo menos nove meses de estiagem sem que haja perda da eficiência na taxa de eclosão, fortalecendo a idéia de que diferentes indivíduos no banco de cistos possam eclodir em diferentes eventos de cheia.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do Projeto Temático do qual este estudo fazia parte (processo FAPESP 2008/02078-9). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor. Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais por todo o suporte fornecido.

Referências bibliográficas

- ALLAN, J. D., ; GOULDEN, C. E. (1980). Some aspects of reproductive variation among freshwater zooplankton. *Evolution and ecology of zooplankton communities*. University Press of New England, 388-410.
- ARAÚJO, L. R., LOPES, P. M., SANTANGELO, J. M., PETRY, A. C., ; BOZELLI, R. L. (2013). Zooplankton resting egg banks in permanent and temporary tropical aquatic systems. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 25(3), 235-245.
- ARNOTT, S.E. ; YAN, N.D. (2002) The influence of drought and re-acidification on zooplankton emergence from resting stages. *Ecological Applications*, 12, 138-153.
- BAILEY, S.A., DUGGAN, I.C., VAN OVERDIJK, C.D.A., JOHNGEN, T.H., REID D.F. ; MACISAAC, H.J. (2004) Salinity tolerance of diapausing eggs of freshwater zooplankton. *Freshwater Biology*, 49, 286-295.
- BAILEY, S.A., NANDAKUMAR, K. ; MACISAAC, H.J. (2006) Does saltwater flushing reduce viability of diapausing eggs in ship ballast sediment? *Diversity and Distributions*, 12, 328-335.
- BANSE, K., ; MOSHER, S. (1980). Adult body mass and annual production/biomass relationships of field populations. *Ecological monographs*, 50, 355-379.
- BELK, D., AND BRTEK, J. (1995). Checklist of the Anostraca. *Hydrobiologia* 298, 241–243.
- BIGGS, J., WILLIAMS, P., WHITFIELD, M., NICOLET, P. ; WEATHERBY, A. (2005). 15 years of pond assessment in Britain: results and lessons learned from the work of Pond Conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 693–714.
- BLAUSTEIN, L., SCHWARTZ, S. S. (2001). Why study ecology in temporary pools? *J Zool*, 47,(4),303–312.
- BRENDONCK, L., ; DE MEESTER, L. (2003). Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 491,(1-3), 65-84.
- BROCK, M.A., NIELSEN, D.L., SHIEL, R.J., GREEN, J.D. ; LANGLEY, J.D. (2003) Drought and aquatic community resilience: the role of eggs and seeds in sediments of temporary wetlands. *Freshwater Biology*, 48, 1207-1218.

BROWN, E. S. (1951). The relation between migration- rate and type of habitat in aquatic insects, with special reference to certain species of Corixidae. *Proceedings of the Zoological Society of London* (Vol. 121, No. 3, pp. 539-545). Blackwell Publishing Ltd.

BROWN, M. E. (2008). Nature and nurture in dormancy: Dissolved oxygen, pH, and maternal investment impact *Bythotrephes longimanus* resting egg emergence and neonate condition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(8), 1692-1704.

CHITTAPUN, S., PHOLPUNTHIN, P. ; SEGERS, H. (2005). Restoration of tropical peat swamp rotifer communities after perturbation: an experimental study of recovery of rotifers from the resting egg bank. *Hydrobiologia*, 546, 281-289.

CLEGG J.S. (1997) Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia: The case for complete metabolic rate depression. *Journal of Experimental Biology*, 200, 467-475.

COELHO, P. N., WISNIEWSKI, M. J. S (2015). Comparação da diversidade da comunidade zooplânctônica ativa e dos ovos de resistência presentes no sedimento do reservatório da UHE de Furnas-MG. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental), Alfenas-MG.

COLLINSON, N. H., BIGGS, J., CORFIELD, A. H. M. J., HODSON, M. J., WALKER, D., WHITFIELD, M., ; WILLIAMS, P. J. (1995). Temporary and permanent ponds: an assessment of the effects of drying out on the conservation value of aquatic macroinvertebrate communities. *Biological Conservation*, 74(2), 125-133.

CRISPIM, M. C.; WATANABE, T. (2000). Ovos de resistência de rotíferos presentes em sedimentos secos de um açude semi-árido paraibano. *Acta Limnológica Brasiliensis*, v. 12, n. 1, p. 89-94.

DE MEESTER, L. ; DE JAGER, H. (1993) Hatching of *Daphnia* sexual eggs. II. The effect of age and a second stimulus. *Freshwater Biology*, 30, 227-233

DE MEESTER, L., DECLERCK, S., STOKS, R., LOUETTE, G., VAN DE MEUTTER, F., DE BIE, T., ; BRENDONCK, L. (2005). Ponds and pools as model systems in conservation biology, ecology and evolutionary biology. *Aquatic conservation: Marine and freshwater ecosystems*, 15(6), 715-725.

- DE STASIO, B. T. (1989). The seed bank of a freshwater crustacean: copepodology for the plant ecologist. *Ecology*, 1377-1389.
- DODSON, S. I., ; FREY, D. G. (1991). Cladocera and other Branchiopoda. *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*, 723, 786.:
- EWALD, N.C., HARTLEY, S. E. ; STEWART, A.J. A. 2013 Climate change and trophic interactions in model temporary pond systems: the effects of high temperature on predation rate depend on prey size and density. *Freshwater Biology*, 58, 2481–2493.
- FENCHEL, T. (1974). Intrinsic rate of natural increase: the relationship with body size. *Oecologia*, 14(4), 317-326.
- FRYER, G. (1996).Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans.*Hydrobiologia*, 320(1-3), 1-14.
- GILBERT, J. J. (1995). Structure, development and induction of a new diapause stage in rotifers.*Freshwater Biology*, 34(2), 263-270.
- HAIRSTON JR, N. G., ; DE STASIO JR, B. T. (1988). Rate of evolution slowed by a dormant propagule pool. *Nature* (336), 234-242.
- HAIRSTON JR, N. G., VAN BRUNT, R. A., KEARNS, C. M., ; ENGSTROM, D. R. (1995). Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology*, 1706-1711.
- JEFFRIES, M. J. (2011).The temporal dynamics of temporary pond macroinvertebrate communities over a 10-year period.*Hydrobiologia*, 661(1), 391-405.
- JERSABEK, C. D., ; SCHABETSBERGER, R. (1995). Resting egg production and oviducal cycling in two sympatric species of alpine diaptomids (Copepoda: Calanoida) in relation to temperature and food availability.*Journal of plankton research*, 17(11), 2049-2078.
- KING, C. E., ; SNELL, T. W. (1980). Density-dependent sexual reproduction in natural populations of the rotifer *Asplanchna girodi*.In *Rotatoria* (pp. 149-152). Springer Netherlands.
- LOCKE, A., ; SPRULES, W. G. (1994). Effects of lake acidification and recovery on the stability of zooplankton food webs.*Ecology*, 498-506.

MARCUS, N. M., LUTZ, R., BURNETT, W., AND CABLE, P. (1994). Age, viability, and vertical distribution of zooplankton resting eggs from an anoxic basin: evidence of an egg bank. *Limnology and Oceanography* (39), 154-158.

MOORE, M.; FOLT, C. (1993). Zooplankton body size and community structure: effects of thermal and toxicant stress. *Trends in ecology ; evolution*, 8(5), 178-183.

PETERS, R. H. (1986). *The ecological implications of body size* (Vol. 2). Cambridge University Press.

PIJANOWSKA, J., ; STOLPE, G. (1996). Summer diapause in *Daphnia* as a reaction to the presence of fish. *Journal of Plankton Research*, 18(8), 1407-1412.

ROSSI, V., GANDOLFI, A., ; MENOZZI, P. (1996). Egg diapause and clonal structure in parthenogenetic populations of *Heterocypris incongruens* (Ostracoda). *Hydrobiologia*, 320(1-3), 45-54.

SANTANGELO, J.M. 2009. Estrutura do Banco de Ovos de Resistência do Zoo plâncton em Sistemas Aquáticos Continentais e Influência da Salinidade e da Predação na Diapausa. *Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro.

SARMA, S. S. S., BELADJAL, L., NANDINI, S., CERÓN-MARTÍNEZ, G.,; TAVERA-BRISEÑO, K. (2005). Effect of salinity stress on the life history variables of *Branchipus schaefferi* Fisher, 1834 (Crustacea: Anostraca). *Saline Systems*, 1 (1) 1-7.

SCHWARTZ S.S. ; HEBERT P.D.N. (1987) Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, 17, 373-379.

ŚLUSARCZYK, M. (1995). Predator-induced diapause in *Daphnia*. *Ecology*, 76(3), 1008-1013.

STROSS, R. G. (1987). Photoperiodism and phased growth in *Daphnia* populations: coactions in perspective. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 45, 413-437.

VANDEKERKHOVE, J., DECLERCK, S., BRENDONCK, L. CONDEPORCUNA, J. M., JEPPESEN, E., JOHANSSON, L. S., ; DE MEESTER, L. (2005). Uncovering hidden species: hatching diapausing eggs for the analysis of cladoceran species richness. *Limnology and Oceanography: Methods*, 3(9), 399-407.

VANSCHOENWINKEL B, HULSMANS A, DE ROECK E, DE VRIES C, SEAMAN M, BRENDONCK L (2009) Community structure in temporary freshwater pools: disentangling the effects of habitat size and hydroregime. *Freshw Biol* 54(7):1487–1500.

WILLIAMS, P., BIGGS, J., FOX, G., NICOLET, P., ; WHITFIELD, M. (2001). History, origins and importance of temporary ponds. Special topics, European Temporary Ponds: A threatened Habitat. *Freshwater Forum* 17: 7–15.

WILLIAMS, D. D.(2006). *The Biology of Temporary Waters. Oxford University Press, Oxford.*

ZARATTINI, P. (2004). Intraspecific differences in hatching phenology of the fairy shrimp *Chirocephalus diaphanus* Prévost, 1803 (Crustacea, Anostraca) in relation to habitat duration. *Journal of Limnology*, 63(1s), 85-89.

CAPÍTULO 2

Fases iniciais do desenvolvimento de *Dendrocephalus brasiliensis* em cultivos semi-intensivos

O capítulo 2 trata de um estudo onde foram avaliados os fatores ambientais que influenciam a sobrevivência, o desenvolvimento e o crescimento dos estágios iniciais de vida da branconeta em cultivos controlados, sob as condições climáticas da região sudeste do Brasil.

Os resultados do estudo são apresentados em um manuscrito intitulado “Fatores que influenciam o crescimento das fases iniciais do desenvolvimento de *Dendrocephalus brasiliensis*”

Fatores que influenciam o crescimento das fases iniciais do desenvolvimento de *Dendrocephalus brasiliensis*

Silva, R.A.C.¹, Melão, M.G.G.¹

¹Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil.

ricardocustodioeco@gmail.com, (16) 3351 – 8757

Abstract

We investigated some of the factors that may influence the efficiency of the Branchyopoda *Dendrocephalus brasiliensis* cultivation, carried out in semi-intensive system, focusing on the early life stages of this crustacean. The cultivation took place in all seasons in order to evaluate the effect of changing ambient conditions throughout the year. Assays were terminated when the individuals reached sexual maturity, when we registered the duration of this period. Over cultivation were taken measurements of environmental variables like water temperature, pH, salinity, conductivity and dissolved oxygen. In each test, three replicates were used in tanks of 1000 L each inoculated with sediment containing cysts. In addition, a test was performed to determine when the food should be given to nauplii. Random samples were taken from all cultures to record lengths and to determine the respective stages of life of the taken individuals, as well as the estimated population density. The results showed that there is a positive correlation between growth rate and temperature ($R^2 = 0.898$) and conductivity ($R^2 = 0.65$). This ratio seems to be true for the temperature, which plays an important role in the development of these fairy shrimp. The diet from the third day of culture showed better survival rates (39.25%) than the other treatments, especially when food is provided on the first day, where we observed a lower survival rate (4.74%), which may have been caused by an excess of large particles or cells too big for the filtration capacity of *D. brasiliensis* nauplii.

Key-words: Anostraca, environmental factors, eating habits, early stages, aquaculture juveniles..

Resumo

Neste estudo, investigamos alguns dos fatores que possam influenciar a eficiência do cultivo do Anostraca *Dendrocephalus brasiliensis*, realizados em regime semi-intensivo, com enfoque nos estágios iniciais de vida deste crustáceo. Os cultivos se deram em todas as estações a fim de se avaliar o efeito da variação das condições ambientais ao longo do ano. Os ensaios foram terminados quando os organismos atingiram a maturação sexual, quando foram anotadas a duração deste período. Ao longo do cultivo foram tomadas as medidas das variáveis ambientais da água: temperatura, pH, salinidade, condutividade e concentração de oxigênio dissolvido. Em cada ensaio, foram utilizados três réplicas, em tanques de 1000 L cada, inoculados com sedimento contendo cistos. Além disso, foi realizado um teste para averiguar quando o alimento deve ser ministrado aos náuplios. Foram retiradas amostras aleatórias de todas as culturas para registro dos comprimentos e para determinação dos respectivos estágios de vida dos organismos, bem como da densidade populacional estimada. Os resultados mostraram que existe correlação positiva entre a taxa de crescimento e temperatura ($R^2 = 0,898$) e condutividade ($R^2 = 0,65$). Esta relação parece ser verdadeira para a temperatura, a qual desempenha papel importante no desenvolvimento destes crustáceos. O regime alimentar a partir do terceiro dia de cultivo apresentou melhores taxas de sobrevivência (39,25%) que os demais tratamentos, sobretudo quando o alimento é fornecido no primeiro dia, onde observamos a menor taxa de sobrevivência (4,74%), o que pode ter sido causado pelo excesso de partículas ou células grandes demais para a capacidade de filtração dos náuplios de *D. brasiliensis*.

Palavras-chave: Anostraca, variáveis ambientais, hábitos alimentares, estágios iniciais, aquicultura, juvenis.

Introdução

O constante crescimento mundial da aquicultura, especialmente da piscicultura marinha e dulcícola, trouxe a necessidade do desenvolvimento de técnicas eficientes relacionadas à alimentação e sobrevivência de grandes quantidades de pós-larvas de peixes em condições de cultivo.

A larvicultura é considerada a fase mais crítica na piscicultura e o grande entrave para o crescimento da aquicultura mundial. Nesta fase do desenvolvimento, os jovens peixes já consumiram as reservas nutricionais do saco vitelínico e necessitam de alimentação exógena. A inadequação dos alimentos disponíveis, principalmente de rações secas industrializadas, tem promovido frequentemente grandes taxas de mortalidade desses animais cultivados (Lavens ; Sorgeloos, 2000).

Os melhores resultados na produção de pós-larvas de peixes tem sido obtidos a partir da utilização de organismos vivos para a alimentação (Zavala-Camim, 1996). Diversos organismos aquáticos têm sido utilizados como alimento vivo para peixes, tais como cladóceros e outros microcrustáceos, larvas de insetos, rotíferos, protozoários, etc. (Gerking, 1994), mas nenhum com tanta intensidade e eficiência quanto os Anostraca do gênero *Artemia* (Lavens ; Sorgeloos, 2000). Contudo, o cultivo de *Artemia* é oneroso, dentre outras razões, principalmente devido à necessidade de salinização da água.

Neste contexto, o Anostraca dulcícola *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921), popularmente conhecido como branconeta, de ocorrência natural de regiões semiáridas do Brasil (Cesar, 1989), tem grande potencial para substituir a *Artemia* como fonte de alimento vivo para espécies de água doce cultivadas. Sob condições de cultivo intensivo, essa espécie tem apresentado elevadas taxas de eclosão e baixas taxas de mortalidade quando comparada à *Artemia*, além de menor custo operacional (Grombone et al., dados não publicados).

Para se explorar o potencial de cultivo da espécie, é preciso que se estabeleçam técnicas para obtenção de cistos viáveis em grande quantidade, bem como para o manejo das condições de cultivo que resultem em maior eficiência do processo produtivo (Lopes, 2007).

Dendrocephalus brasiliensis parece ser uma espécie bastante rústica e resistente à variação das condições ambientais em ecossistemas naturais (Passos, 2013). Essa rusticidade provavelmente foi moldada ao longo da evolução dessa espécie em ambientes aquáticos temporários, cujas características físicas e químicas podem variar muito rapidamente e com muita frequência em virtude de extensas flutuações do nível de água, culminando com o completo dessecação do corpo d'água. Apesar disso, os estágios iniciais de desenvolvimento desse Anostraca têm demonstrado grande sensibilidade sob condições de cultivo, com altas taxas de mortalidade.

Para que o uso da branconeta como alimento vivo em aquicultura seja bem sucedido, é preciso que se domine o conhecimento das condições ambientais e alimentares ótimas que minimizem a mortalidade das fases iniciais de desenvolvimento desses animais. Só assim será possível o cultivo dessa espécie em larga escala.

Dentre as variáveis ambientais que afetam o crescimento da branconeta, como de qualquer ser vivo, destacamos como as mais importantes (1) o oxigênio dissolvido e (2) a temperatura da água, tanto por influência direta, como por sua relação com o teor de gases dissolvidos.

A condutividade elétrica, da água, resultante da concentração de sais, ácidos e bases nos corpos d'água, também é de grande importância pois expressa um grande número de fenômenos complexos como a liberação de nutrientes resultantes da decomposição da matéria orgânica, os quais são utilizados nos processos de produção primária do ambiente, fonte de alimento para esses animais filtradores. Além desses, o pH é outro fator importante para a biota aquática de modo geral.

Originalmente habitantes de ambientes efêmeros rasos, sujeitos à grandes variações diárias de temperatura e com alto teor de matéria orgânica (cuja decomposição mobiliza rapidamente o oxigênio e altera a condutividade e pH), espera-se que *D. brasiliensis* seja uma espécie com ampla faixa de tolerância à variação desses fatores ambientais. No entanto, é importante que se estabeleçam experimentalmente as faixas ótimas de crescimento da espécie, a fim de tornar mais eficiente o cultivo em larga escala para o uso em aquicultura.

Assim, em face do exposto e tendo em vista a escassez de conhecimentos acerca da dinâmica populacional de *D. brasiliensis* e dos fatores ambientais que influenciam a sobrevivência, o desenvolvimento e o crescimento dos estágios iniciais de vida desta espécie, este trabalho objetivou caracterizar o ciclo de vida da branconeta e identificar os principais fatores de influência em cultivos controlados, sob as condições climáticas da região sudeste do Brasil, a fim de gerar informações que possam subsidiar o estabelecimento de técnicas de cultivo da espécie para ampla aplicação na aquicultura.

Materiais e Métodos

Caracterização dos estágios iniciais de desenvolvimento e das taxas de crescimento de *Dendrocephalus brasiliensis*

Os cultivos experimentais de *D. brasiliensis* foram realizados em tanques de 1000L de volume situados sob estufa plástica (tipo casa de vegetação), na Estação Experimental de Aquicultura do Departamento de Hidrobiologia da UFSCar (EEA-DHb). Foram utilizados três tanques circulares, sendo acompanhadas três réplicas para cada cultivo. Os ensaios foram realizados nos meses de julho e outubro de 2012, e em maio, julho, setembro, novembro e dezembro de 2013.

Os sedimentos contendo cistos de *D. brasiliensis* foram provenientes de cultivos anteriores realizados na mesma EEA. Todo o sedimento utilizado foi homogeneizado para garantir que todas as linhagens distintas pudessem estar presentes em diferentes réplicas. Os tanques foram secos e limpos para receberem o inóculo. Aproximadamente 1000 g de sedimento contendo cistos foram distribuídos em cada réplica e os tanques foram preenchidos com água desclorada sob temperatura ambiente.

Nos cultivos para identificação dos estágios de desenvolvimento, as coletas foram realizadas diariamente a partir de 24 horas após o enchimento dos tanques até o 10º dia, sob temperatura aproximada de 25°C. Em cada coleta foram retirados 10 indivíduos, que foram fixados em formol 4% para posterior identificação dos estágios de desenvolvimento através da observação em microscópio óptico (Leica DMLS). As medidas de comprimentos destes indivíduos, da porção anterior do até a base do telson, foram feitas com auxílio de microscópio estereoscópico (Leica MZ5) com ocular micrometrada. Foram realizados registros fotográficos em ambas as situações. Nos cultivos para avaliação das taxas de crescimento frente às variáveis abióticas da água, foram realizadas coletas até o 10º dia ou até o aparecimento de indivíduos adultos, isto é, fêmeas com ovário contendo cistos. Ao final do período experimental, foi anotado o comprimento de 10 indivíduos adultos e a taxa de crescimento foi calculada pela razão entre o comprimento e a duração do experimento em dias.

A alimentação dos náuplios se iniciou três dias após a eclosão. A concentração de algas fornecidas às branconetas nos tanques foi de aproximadamente 10^5 células L^{-1} em dias alternados durante todo o período experimental. As branconetas foram

alimentadas com “água verde” proveniente de um tanque destinado a este fim. O tanque foi inicialmente adubado com fertilizante NPK (10/10/10) com concentração de $0,04 \text{ gL}^{-1}$ para que se estabelecesse uma comunidade planctônica inicial, principalmente fitoplanctônica. O inóculo algal utilizado foi de *Pseudokirchneriella subcapitata* cultivada em laboratório. Em seguida, foram soltos nos tanques alguns espécimes de *Brycon cephalus* (matrinxã), *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu), desta forma manteve-se alta ciclagem de nutrientes nos tanques, o que permitiu a manutenção da água verde altamente concentrada durante todos os períodos experimentais.

Durante o período experimental, foram tomadas medidas de temperatura, pH, condutividade e concentração de oxigênio dissolvido na água, com o auxílio de sonda multissensor YSI 6600® em todas as réplicas em dias alternados.

O experimento realizado para avaliar o início da alimentação dos náuplios foi realizado em cubas de vidro de volume de 6 L, contendo 3 L de água de torneira desclorada e aproximadamente 20 g de sedimento contendo cerca de 3000 cistos foram inoculados em cada réplica (cada tratamento foi realizado em triplicata). Foram utilizados três tratamentos: alimentação apenas no início (24 horas após o enchimento), sem alimentação e alimentação em dias alternados após o 3º dia. O ensaio teve duração de 10 dias. Para as contagens iniciais, até o 4º dia, quando os náuplios ainda apresentam tamanho muito reduzido, foram retiradas amostras de 30 mL, em triplicata, de cada réplica, as quais foram fixadas em formol 4% para contagem dos náuplios e posterior estimativa da densidade total. A contagem das subamostras foi realizada em placas de acrílico quadriculadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico (Leica MZ5). Para as amostragens a partir do 5º dia, foram tomadas subamostras de 200 mL e a contagem dos juvenis foi realizada a olho nu.

Para avaliar possíveis relações entre a taxa de crescimento e as variáveis ambientais medidas, foram realizadas regressões lineares simples par a par.

Resultados

Os estágios de desenvolvimento de *D. brasiliensis* cultivados em temperatura média de 25°C, desde a primeira fase naupliar, observada 24 horas pós-enchimento (p.e), até os indivíduos adultos, foram fotografados sob microscopia e estão apresentados na Figura 1.



Náuplio I : 12 horas p.e.



Náuplio II: 12 - 24 horas p.e.



Náuplio III : 24 - 36 horas p.e.



Náuplio IV – 36 horas p.e.



Náuplio V – 48 horas p.e.



Náuplio VI – 60 horas p.e.



Juvenil I: 72 horas



Juvenil II: 4 dias p.e.



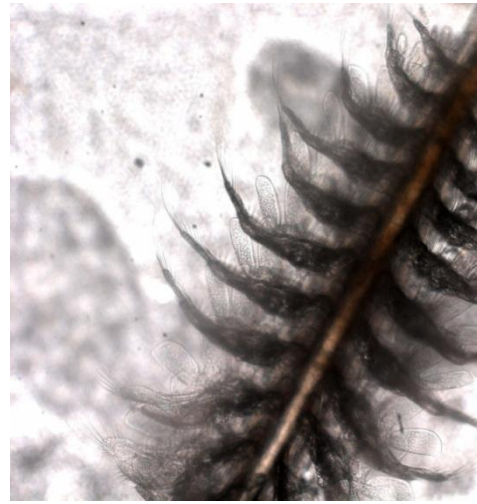
Juvenil III: 5 dias p.e.



Juvenil IV: 6 dias p.e.



Juvenil IV: detalhe do Télson



Juvenil IV: detalhe dos apêndices locomotores/filtradores

Figura 1: Principais estágios de desenvolvimento de *D. brasiliensis* (aumento 50x) cultivados em temperatura média de 25°C.

Os comprimentos e os tempos médios de cada estágio de desenvolvimento identificado de *D. brasiliensis*, cultivados em temperatura média de 25°C estão expressos na Tabela 1:

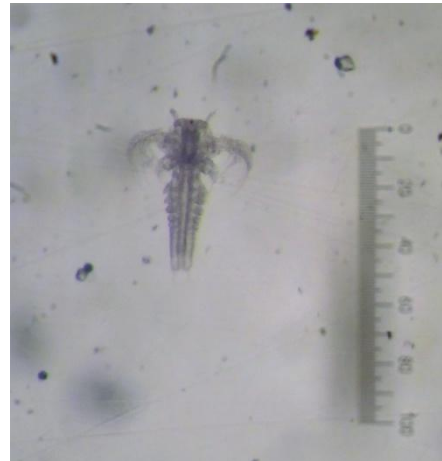
Tabela 1: Tempo aproximado de cada estágio de desenvolvimento de *D. brasiliensis* e os respectivos comprimentos médios registrados, onde: L. médio = comprimento médio e DP = desvio padrão.

Tempo	Fase	L. médio	DP ±
12 hs	Náuplio I	286,64	4,61
24 hs	Náuplio II	529,39	2,79
36 hs	Náuplio III	1101,50	3,65
48 hs	Náuplio IV	1908,95	3,10
60 hs	Náuplio V	4605,00	265,17
3 dias	Juvenil I	6336,50	324,21
4 dias	Juvenil II	7273,00	434,68
5 dias	Juvenil III	8719,00	236,88
6 dias	Juvenil IV	9724,00	284,26
7 dias	Adulto	10238,00	362,75

Na figura 2 podemos observar as diferentes fases de *D. brasiliensis* sob um aumento menor (10x), com régua milimetrada como referência de tamanho em cada estágio de desenvolvimento.



Náuplio I



Náuplio II



Náuplio III



Náuplio IV



Juvenil I



Juvenil II



Juvenil IV – fase de transição



Adultos

Figura 2: Comparação entre os tamanhos dos diferentes estágios de desenvolvimento de *D. brasiliensis* (aumento 10x) cultivados em temperatura média de 25°C.

Durante a observação das diferentes fases do desenvolvimento das branconetas, pudemos observar uma sobreposição de diferentes estágios de desenvolvimento em determinado tempo. Em algumas amostras coletadas e fixadas

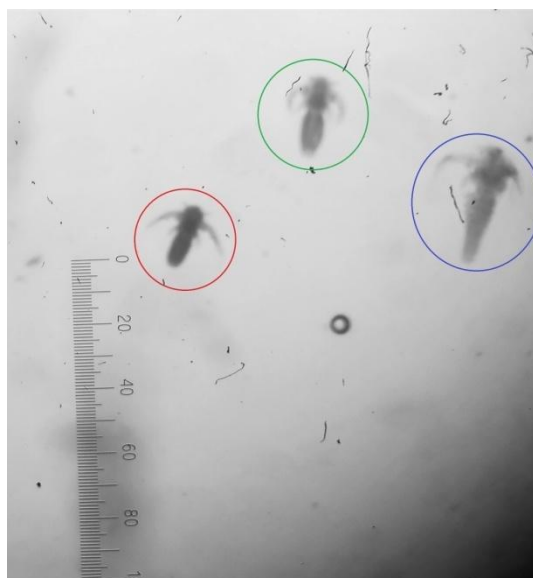


Figura 3: Observação de três fases distintas de *D. brasiliensis* observadas em amostra fixada no mesmo tempo pós-enchimento. Em vermelho, náuplio I; em verde, náuplio II e em azul, náuplio III.

Os resultados dos experimentos para determinar as taxas de crescimento e flutuações nas variáveis abióticas estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Taxas de crescimento médio de cada cultivo e os respectivos valores das variáveis ambientais medidas, onde: Tx. Cresc. = taxa de crescimento médio expresso em mm dia⁻¹; Cond. = condutividade em $\mu\text{S cm}^{-2}$; medida em % e OD. = oxigênio dissolvido em mg L⁻¹.

Data	Tx. Cresc.	Temperatura	pH	Cond.	OD.
jul/12	0,675 ± 1,03	22,56 ± 0,89	6,78 ± 0,2	81,88 ± 9,33	6,96 ± 0,21
out/12	1,385 ± 0,67	28,46 ± 0,88	5,94 ± 0,16	544,66 ± 18,91	7,34 ± 0,14
mai/13	1,100 ± 0,88	24,6 ± 0,7	7,63 ± 0,06	79,52 ± 3,62	5,56 ± 0,11
jul/13	0,664 ± 0,95	23,8 ± 0,40	7,98 ± 0,08	87,68 ± 7,12	6,78 ± 0,35
set/13	1,287 ± 0,95	27,42 ± 0,30	6,98 ± 0,16	580,33 ± 30,89	7,99 ± 0,16
nov/13	1,566 ± 0,97	31,6 ± 0,81	7,40 ± 0,07	442 ± 13,57	7,84 ± 0,35
dez/13	1,683 ± 0,88	32,76 ± 1,41	6,17 ± 0,04	561,33 ± 19,21	7,03 ± 0,09

Calculamos o valor de horas-grau, que expressa a relação entre temperatura e tempo necessários para que o organismos em questão atinja a maturidade. Os valores estimados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores médios de horas-grau (expressos em horas °C) necessárias para se atingir a maturidade sexual nos indivíduos de *D. brasiliensis* em cada mês estudado. O tempo refere-se ao dia em que os indivíduos atingiram a maturidade sexual.

Data	Tempo	Horas-grau
jul/12	14	7580,16
out/12	9	6148,8
mai/13	11	6494,4
jul/13	13	7425,6
set/13	9	5923,44
nov/13	8	6067,2
dez/13	7	5503,68
Média	10	6449

Foi realizada uma regressão linear simples em pares, entre a taxa de crescimento e cada uma das variáveis abióticas. A análise da regressão mostra que existe alto índice de correlação entre a taxa de crescimento média e temperatura (R^2 ajustado = 0,898), assim como entre taxa de crescimento e condutividade (R^2 ajustado = 0,65). Não foi observada correlação entre a taxa de crescimento e valores de pH (R^2 ajustado = 0,107), e oxigênio dissolvido ($R^2 = 0$).

No teste de alimentação, observamos que os melhores resultados de sobrevivência se deram com alimentação alternada a partir do 3º dia, onde, em média, 39,25% dos indivíduos observados no primeiro dia (24 horas p.e.) sobreviveram. A taxa de sobrevivência média no tratamento sem adição de alimento por 10 dias foi de 11,21%, e quando foi fornecido alimento logo e apenas no primeiro dia, a sobrevivência média ao final de 10 dias foi de apenas 4,74%. Na Tabela 4, são apresentadas as médias do número estimado de indivíduos a cada dia de experimento nas três réplicas de cada tratamento.

Tabela 4: Médias diárias do número de indivíduos estimados a partir da contagem de subamostras no experimento de alimentação e respectivos desvios.

Dias	Alimento ao início		Sem alimento		Alimentação alternada	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1	1353	81,45	1390	122,88	1393	37,86
2	337	148,05	1120	76,98	1124	54,10
3	207	105,21	949	88,26	941	69,15
4	156	74,83	790	68,70	765	31,56
5	131	66,13	557	79,55	683	6,43
6	117	57,43	371	48,10	649	14,26
7	98	41,29	262	21,62	619	11,83
8	78	34,10	204	22,37	598	5,51
9	69	30,76	169	13,04	564	20,74
10	64	29,76	156	18,09	547	16,43

A densidade populacional média de cada tratamento ao longo do período experimental pode ser observada na Figura 4.

Densidade x alimentação

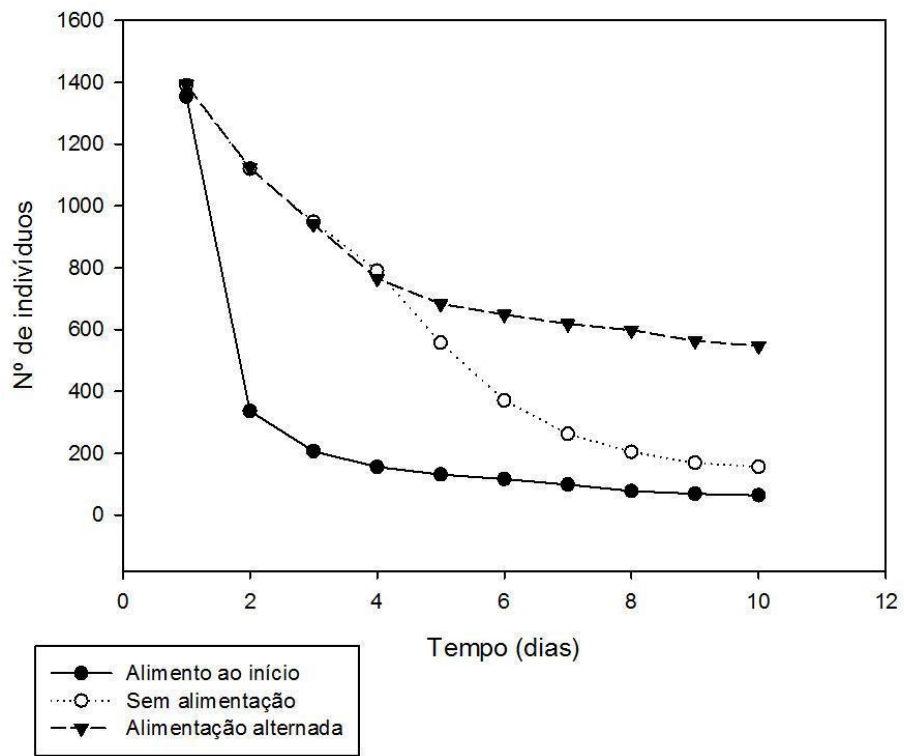


Figura 4: Gráfico de dispersão entre número de indivíduos e o tempo experimental para cada tratamento alimentar.

Discussão

Observamos que nas condições de cultivo adotadas no presente estudo, o desenvolvimento pós-embrionário de *D. brasiliensis* tem duração média de 10 dias. Os mesmos resultados foram observados por Lopes (2007). Vasconcellos (2011) realizou cultivos durante o inverno, e o tempo para atingir-se a maturidade sexual de *D. brasiliensis* foi muito maior, cerca de 30 dias após o enchimento dos tanques de cultivo. Embora neste estudo também tenhamos realizado cultivos em temperaturas abaixo de 25°C, o tempo até a maturidade não foi tão alto, sendo 14 dias o tempo máximo necessário.

O conceito de horas-grau, comumente utilizado para descrever o período larval de peixes, expressa a relação entre temperatura e tempo no desenvolvimento destes organismos, através do produto entre o tempo e a temperatura média ao longo do período. Teoricamente, o valor de horas-grau para se atingir a maturidade em determinada espécie é uma constante, ou seja, quanto menor a temperatura, maior o tempo necessário e vice-versa (Meijide *et al.* , 2000). Nossos resultados mostraram uma diferença de horas-grau necessárias nos cultivos em baixas temperaturas (aproximadamente 7500) e nos cultivos em altas temperaturas (5500 a 6000). Embora os resultados sugiram que exista a relação entre tempo e temperatura no desenvolvimento das branconetas, estes mesmos resultados nos sugerem que a relação entre temperatura e o tempo necessário para se atingir a fase adulta em *D. brasiliensis* seja uma relação mais complexa do que a relação linear entre estas variáveis para o desenvolvimento de peixes.

A observação das fases de desenvolvimento de *D. brasiliensis*, bem como os tempos e os tamanhos registrados para cada fase mostram que os estágios de desenvolvimento são bem definidos, podendo ser identificadas até pelo tamanho médio de cada fase. Isso nos permite com segurança notar três diferentes fases naupliares ocorrendo concomitantemente, como observamos na figura 3. Como as gerações de *D. brasiliensis* são discretas, oriundas de um único evento reprodutivo a cada cheia das lagoas naturais, presume-se que todos os indivíduos tenham a mesma idade, contudo isso não é verdadeiro por completo, pois, como observamos em nosso estudo, diferentes fases naupliares podem coexistir numa mesma população. Esta observação pode ser um indício da ocorrência de eclosão tardia na espécie, ou seja, parte dos cistos eclodem algum tempo depois, possivelmente como mecanismo

preventivo da espécie contra um enchimento insuficiente da lagoa, o que dificultaria o sucesso de um novo ciclo reprodutivo e conseqüente risco à perpetuação da espécie. Em nossos ensaios, cerca de dois dias após o aparecimento de adultos, já não conseguíamos observar juvenis, sugerindo que a eclosão tardia, neste caso, possa ocorrer até 48 horas após o enchimento.

A partir dos resultados deste estudo, pudemos observar que valores mais altos de temperatura e condutividade promovem uma maior taxa de crescimento. No entanto, vemos na literatura que altas condutividades geralmente causam um efeito inverso ao aqui encontrado, principalmente em relação à eclosão de cistos de resistência das mais diversas espécies (Brendonck, 2003; Rossi, 2004). Nestes trabalhos, os autores associam a condutividade à ativação dos cistos de resistência, funcionando como iniciador do processo de eclosão.

Em estudos com organismos ativos, como é o caso do presente trabalho, a condutividade é usualmente tratada como um indicador da salinidade, mesmo em estudos de ambientes de água doce. Embora não ocorra aumento da quantidade de sais dissolvidos na água, o aumento da condutividade pode ocorrer por inúmeros fatores.

Um aumento na temperatura de uma solução irá provocar uma diminuição da sua viscosidade e um aumento da mobilidade e do número dos íons em solução,, devido à dissociação das moléculas. À medida que a condutividade de uma solução é dependente destes fatores, o aumento da temperatura da solução acarretará um aumento da sua condutividade.

Segundo Hayashi (2004), além da quantidade e composição de espécies iônicas, a condutividade elétrica é fortemente dependente da temperatura. Portanto, a condutividade elétrica de amostras de água medida a várias temperaturas precisa ser "corrigida" para valores correspondentes a uma temperatura padrão para a interpretação de dados com significado. Isso ocorre porque a relação condutividade-temperatura das soluções de eletrólitos é controlada principalmente pela relação viscosidade-temperatura da água pura. Logo, uma equação com base em viscosidade oferece uma maior precisão do que a equação linear, particularmente quando a temperatura da água for superior a 30°C.

Além disso, é possível ainda que exista uma relação entre a baixa condutividade e a quantidade de matéria orgânica nos cultivos com temperaturas mais baixas. Uma grande quantidade de matéria orgânica dissolvida tende a diminuir a condutividade, uma vez que as espécies iônicas disponíveis podem se combinar a essas moléculas (Atkins; Paula, 2012). Em baixas temperaturas, *D. brasiliensis* consome menos alimento, o que resulta em maior acúmulo de matéria orgânica dissolvida. Portanto, pode ser que a menor condutividade elétrica registrada nos cultivos que registraram temperaturas mais baixas seja indiretamente causada pelos próprios organismos.

Nos ensaios com diferentes períodos de fornecimento de alimento, foram registradas altas taxas de mortalidade no início de cultivo (Tabela 4) em todos os regimes, período relacionado às fases de metamorfose registradas fotograficamente (Figura 1) produzindo uma curva exponencial decrescente ao longo do tempo (Figura 3). Em *Branchinecta ferox*, Freyer (1983) registrou cerca de 20 estágios pré-adultos distintos. As altas taxas de mortalidade deste período de mudas podem estar relacionadas à seleção natural em função de fatores epigenéticos (Balon, 1990).

Na alimentação do zooplâncton, a combinação de diversas microalgas com diferentes constituições de nutrientes, formas e tamanhos, podem melhorar a percepção do animal, contribuindo para o aumento da capacidade de filtração e o consumo de alimentos. Sobre isso, D'Abramo (1979) descobriu que a mistura de algas clorofíceas fornecidas a uma espécie de Thamnocephalidae (mesma família que *D. brasiliensis*) resultam em maiores valores de produção, taxas de ingestão, assimilação, sobrevivência e reprodução dos mesmos.

Gonçalves (2001) testou a remoção de algas em efluente pela alimentação de *D. brasiliensis*. Em apenas 24 horas cerca de 90% das algas presentes no efluente foram removidas, mostrando a eficiência de filtração de algas pela espécie. Nos cultivos realizados na EEA com adultos é perceptível a alta velocidade de filtração das branconetas, porém, isso não ocorre nos primeiros dias de cultivo. Comumente, a adição de algas nos primeiros dias resultava em insucesso completo, sem nenhum indivíduo observado. Os resultados aqui encontrados confirmam que o fornecimento de algas nos primeiros dias, coincidente com as fases naupliares, causa alta mortalidade. Acreditamos que os náuplios apresentem alguma limitação no consumo de algas neste período, seja ela morfológica ou fisiológica. Em ambientes temporários,

a floração da comunidade fitoplanctônica pode ocorrer em diferentes períodos (Gliwicks, 1990), dessa forma, imaginamos que os estágios iniciais de *D. brasiliensis* devam ser adaptados a uma fonte alimentar diferente, possivelmente mais abundante e de menores tamanhos, como bactérias.

Conclusões

As fases iniciais do desenvolvimento de *D. brasiliensis* são bastante conspícuas e com tamanhos médios bem definidos.

A observação de fases naupliares distintas concomitantes nos sugere que ocorra eclosão tardia de uma parte dos cistos presentes no banco de ovos do sedimento.

Temperatura e condutividade são os parâmetros físicos e químicos da água que mais influenciam o crescimento em comprimento de *D. brasiliensis*, embora o efeito da condutividade seja incerto.

A temperatura tem relação positiva com o crescimento e o desenvolvimento das branconetas, embora a relação entre aumento da temperatura e o tempo para completar o desenvolvimento não seja uma relação linear simples.

O fornecimento de algas para alimentação de *D. brasiliensis* é adequado, exceto durante os primeiros dias de cultivo, onde ocorre alta mortalidade causada pela adição de algas no meio de cultivo.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do Projeto Temático do qual este estudo fazia parte (processo FAPESP 2008/02078-9). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor. Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais por todo o suporte fornecido.

Referências Bibliográficas

- ATKINS, P.W. ; Paula, J. Físico-Química - Atkins - v1 - 9ª ed. Português, 2012.
- BADY, P. (2005). Use of invertebrate traits for the biomonitoring of European large rivers: the effects of sampling effort on genus richness and functional diversity. *Freshwater Biology*, 50: 159-173.
- BALON, E. K.(1990). Epigenesis and an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyology Reviews*, n. 1: 1-48.
- BRENDONCK, L., ; DE MEESTER, L. (2003). Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 491, 65-84.
- D'ABRAMO R. L. 1979, Dietary fatty acid and temperature effects on the productivity of the cladoceran *Moina macrocopa*. *Biol Bull.*, 157: 234– 248.
- ESTEVES, F. de A. (1998). *Fundamentos de Limnologia*. Ed. 2. Interciência, Rio de Janeiro, Brasil.
- FREITAS, P. D. (2002). Fazenda experimental de artêmia aponta potencias das salinas brasileiras. *Univerciência*, 1: 35-39.
- FREYER, G.(1983). Functional Ontogenetic Changes in *Branchinecta Ferox* (Milne-Edwards) (Crustacea: Anostraca). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 303, 229-343.
- GERKING, S.D. (1994). Larval feeding. In: Gerking, S.D. (Ed.) *Feeding ecology of fish*. London: Academic Press, p.139-170.
- GLIWICZ, Z. M., 1990. Why do cladocerans fail to control algal blooms? *Hydrobiologia* 200/201: 83–97.
- GOLÇALVEZ, J. L. Remoção de algas via alimentação pelo microcrustáceo *Dendrocephalus brasiliensis* (Crustacea: Anostraca). *Dissertação de pós-graduação em Tecnologias Ambientais*. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2001.

GROMBONE-VASCONCELLOS, M. Características populacionais, desenvolvimento e produção da “branchoneta” (*Dendrocephalus brasiliensis* pesta 1921), sob as condições climáticas da região sudeste do país. (Revista Brasileira de Zoociências, no prelo 2011).

HAYASHI, M. 2004. Temperature-electrical conductivity relation of water for environmental monitoring and geophysical data inversion. *Environmental Monitoring and Assessment* 96: 119–128.

LAVENS, P. ; SORGELOOS, P.(2000). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181: 397-403.

LOPES, J. P., GURGEL, H. C. B., GÁLVEZ, A. O. ; PONTES C. S.(2007). Produção de cistos de “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Crustacea: Anostraca). *Biotemas*, 20 : 33-39.

MEIJIDE, F.J. ; G.A. GUERREIRO. 2000. Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions *Journal of Zoology, London*, 252: 481-493.

OLIVEIRA, A (1998). Avaliação dos valores nutricionais das microalgas *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano e *tetraselmis tetrathele* (Kyllin) Butch e do microcrustáceo *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) utilizado como alimento inicial de *Penaeus paulensis* (Pérez Fardant, 1967). Tese (Doutorado em Aquicultura). Jaboticabal.

ROSSI V., BARTOLI M., BELIAVERE C., GANDOLFI A., SALVADOR E. ; MENOZZI P. (2004) *Heterocypris* (Crustacea: Ostracoda) from the Isole Pelagie (Sicily, Italy): hatching phenology of resting eggs. *Italian Journal of Zoology*, 71, 223–231.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. São Carlos: Rima, 2003.

TOWNSEND, C. R., M. BEGON E J. L. HARPER 2006. *Fundamentos em Ecologia*. 2ªed. Artmed, Porto Alegre.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (2008) *Limnologia*. São Paulo: Oficina de Textos.

VANDEWALLE, M. et al. (2010). Functional traits as indicators of biodiversity response to land use changes across ecosystems and organisms. *Biodiversity and Conservation*, 19: 2921-2947.

ZAVALA-CAMIM, L.A. 1996. Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes. Maringá: Eduem. 129p.

ZHANG, L. ; KING, C. E.(1993) Life history divergence of sympatric diploid and polyploid populations of brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Oecologia*, 93: 177-183.

CAPÍTULO 3

Taxas de crescimento e composição bioquímica de Dendrocephalus brasiliensis em cultivos semi-intensivos

A aquicultura é hoje uma das mais importantes atividades mundiais para a produção de alimentos. No entanto, dificuldades na larvicultura representam o principal impedimento para uma produção constante e eficiente. Peixes e crustáceos necessitam de alimento vivo ao menos nas fases iniciais de seu desenvolvimento. A disponibilidade de alimento vivo tem impacto direto nas taxas de crescimento e reprodução desses animais cultivados. *Artemia* sp. vem sendo utilizada há anos como alimento vivo em aquicultura. No entanto, seu custo de produção é elevado, especialmente em sistemas de cultivo de espécies de água doce, já que esse animal naturalmente habita águas salobras. Na busca por uma espécie alternativa, o Anostraca dulcícola *Dendrocephalus brasiliensis* (branconeta), de ocorrência comum em lagoas temporárias do nordeste brasileiro, tem grande potencial para utilização na aquicultura nacional. Embora protocolos de cultivo de *D. brasiliensis* já tenham sido desenvolvidos com elevada eficiência de produção, e várias espécies de peixes tropicais tenham alta aceitação desse alimento (Projeto Temático FAPESP 2008/02078-9), ainda existem poucas informações disponíveis sobre suas taxas de crescimento em diferentes condições alimentares e seu impacto na composição bioquímica e valores nutricionais da espécie.

No capítulo anterior, a variação de temperatura, associada à disponibilidade de alimento foram apontadas como fatores determinantes no cultivo de *D. brasiliensis*. No estudo apresentado neste capítulo, avaliamos as taxas de crescimento individuais (comprimento) e populacionais (densidade populacional) desta espécie em cultivos artificiais semi-intensivos, durante dois períodos do ano (inverno e verão), em tanques com baixa e alta quantidade de recursos alimentares. Além disso, investigamos o impacto dessas diferentes condições alimentares na composição bioquímica das branconetas cultivadas.

Os resultados do estudo são apresentados no manuscrito intitulado: “Impacto da disponibilidade de recursos alimentares sobre o desempenho produtivo e o valor nutricional de *Dendrocephalus brasiliensis* em cultivos semi-intensivos”

Impacto da disponibilidade de recursos alimentares sobre o desempenho produtivo e o valor nutricional de *Dendrocephalus brasiliensis* em cultivos semi-intensivos.

Silva, R.A.C.^{1,2}, Melão, M.G.G¹.

¹Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luís, km 235, São Carlos – SP, Brasil. CEP 13565-905

²Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, UFSCar

ricardocustodioeco@gmail.com, +55 16 33518757

Abstract:

The production of fish post-larvae depends on the supply of live food during the first exogenous feeds these organisms. Thus, the developing of sustainable and efficient technics for rearing organism that may have potential to be used as live food becomes increasingly important. The Anostraca *Dendrocephalus brasiliensis*, common species of semi-arid regions of Brazil, meets the desired requirements of an organism to be used as live food for fish. For this, this study investigated how to improve the cultivation of the species under different conditions. The organisms were grown in two dietary treatments: low amount of food resources and high quantity during the winter and summer, a total of four treatments, which evaluated the growth in length, density and subsequent analysis of the biochemical composition of the cultivated organisms. We observed that the best growth results in length were obtained with high amount of food during the summer. However, during the winter, we note that the low amount of food resources results in greater survival and the biochemical analyzes, the group cultivated in low amount of food also had higher amounts of proteins (64.06%). We have also seen that *D. brasiliensis* has branched-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in

amounts recommended for freshwater fish species. So generally *D. brasiliensis* is recommended as live food for neotropical fish species.

Key-words: Crustacea, Anostraca, Aquaculture, food availability, growth rates, biochemical composition

Resumo

A produção de pós-larvas de peixes depende do fornecimento de alimento vivo durante as primeiras alimentações exógenas destes organismos. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas sustentáveis e eficientes de organismos que possuem potencial para serem usados como alimento vivo torna-se cada vez mais importante. O Anostraca dulcícola *Dendrocephalus brasiliensis*, espécie comum de regiões semi-áridas do Brasil, preenche os requisitos desejados em um organismo para ser utilizado como alimento vivo para peixes. Para isso, investigamos neste estudo como aperfeiçoar o cultivo desta espécie em diferentes condições. Os organismos foram cultivados em dois tratamentos alimentares: baixa quantidade de recursos alimentares e alta quantidade, durante o inverno e o verão, totalizando quatro tratamentos, onde avaliamos o crescimento em comprimento, densidade e posterior análise da composição bioquímica dos organismos cultivados. Observamos que os melhores resultados de crescimento em comprimento foram obtidos com alta quantidade de alimentos durante o verão. Entretanto, durante o inverno, notamos que a baixa quantidade de recursos alimentares resulta em maior sobrevivência, e que nas análises bioquímicas, o grupo cultivado em baixa quantidade de alimento também apresentou maiores quantidades de proteínas (64,06%). Vimos ainda que *D. brasiliensis* apresenta ácidos graxos poliinsaturados de cadeia ramificada em quantidades recomendadas para peixes de água doce, sendo a espécie, de modo geral, recomendável para utilização na larvicultura de peixes neotropicais.

Palavras-chave: Crustacea, Anostraca, aquicultura, alimento disponível, taxas de crescimento, composição bioquímica

Introdução

A aquicultura tem se firmado, dentre as atividades de produção de alimentos, como uma das mais proeminentes em termos de expansão nos últimos anos (FAO, 2014). Este crescimento resulta do aumento da demanda por peixes, crustáceos e outros organismos aquáticos pelas populações humanas, o que também se traduz em maior interesse no desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas.

A aquicultura continental atual tem um enorme potencial para atender as necessidades protéicas humanas, atenuando também as pressões que a atividade pesqueira exerce sobre populações naturais de pescado, cujos estoques não são suficientes para atender as demandas atuais.

Embora os avanços nos cultivos em larga escala de diversas espécies de peixes sejam uma realidade, é nos estágios iniciais de vida que a piscicultura encontra o maior obstáculo para uma produção contínua e efetiva. Para se ter sucesso na piscicultura, é preciso ter sucesso na larvicultura, e o sucesso na larvicultura depende principalmente da disponibilidade de dietas adequadas que possam ser facilmente consumidas e digeridas pelos peixes jovens, bem como fornecerem os nutrientes necessários para promover um bom crescimento e a saúde das larvas (Mukhopadhyay ; Ayyappan *et al* , 2002).

Muito embora tenha ocorrido avanço no desenvolvimento de tecnologia na larvicultura no tocante ao desenvolvimento de dietas inertes, ainda a maior parte dela está baseada na utilização de alimento vivo como estratégia de alimentação, especialmente das espécies altriciais que apresentam pouca reserva vitelínica e um trato gastrointestinal indiferenciado (Portella *et al.*, 2002). O fornecimento de presas vivas na primeira alimentação exógena das pós-larvas é fundamental visto que, graças a seus movimentos na coluna da água e à liberação de substâncias químicas como aminoácidos livres, estimulam, nas pós-larvas, um padrão alimentar de aprendizagem, mediado por um sistema quimiorreceptor muito bem desenvolvido que lhes permite identificar a localização dos organismos vivos (Cestarolli, 2005; Tesser ; Portella, 2006). Além disso, as presas vivas, por serem capazes de nadar na coluna da água, estão constantemente disponíveis para as pós-larvas, enquanto que as dietas inertes tendem a agregar-se na superfície da água ou se precipitam ao fundo, estando disponíveis para as pós-larvas por pouco tempo (Conceição *et al.*, 2010). Esses

autores também mencionam que as presas (e.g. zooplâncton), por terem um exoesqueleto fino e alto conteúdo de água na sua composição bioquímica (>80%), embora com menor concentração de nutrientes, podem ser mais palatáveis para as pós-larvas do que dietas inertes que são duras e secas.

Sabe-se que, ao final da reabsorção do saco vitelínico, as larvas de peixes devem estar aptas a procurar e assimilar os alimentos (Chakrabarti et al., 2006). Embora nas primeiras alimentações o trato digestório da maioria das espécies de peixes ainda não seja completamente funcional, o mesmo já contém enzimas relacionadas ao metabolismo (digestão, absorção e assimilação) de nutrientes como proteínas e lipídios. No entanto, a atividade enzimática é relativamente baixa em comparação com peixes adultos (Kolkovski, 2001). Alguns autores afirmam que esta baixa atividade enzimática pode ser compensada através de alimentos vivos consumidos pelas larvas (Dabrowski, 1984; Kolkovski, 2001), nos quais os animais ingeridos auxiliam sua digestão “doando” suas próprias enzimas digestivas. Outros autores, no entanto, afirmam que as enzimas provenientes do alimento vivo não são representativas no processo digestório das larvas de peixes, tendo pequena contribuição à atividade enzimática em algumas espécies de peixes (Mello 2010; Cahu ; Zambonino-Infante, 1995, 2001).

No entanto, na maioria das espécies de peixes utilizadas na piscicultura, os melhores resultados são obtidos com alimentos vivos ou com uma alimentação combinada (Policar et al., 2007). Estudos mostram vantagens da alimentação conjunta ou co-alimentação, podendo-se tirar proveito da alta atratividade das presas vivas e da alta densidade em nutrientes de dietas formuladas (Tesser et al., 2005). Carneiro et al. (2003) afirmam que a alimentação das larvas de peixes com organismos vivos durante curto tempo, antes de oferecer dietas formuladas, melhora a habilidade das larvas a digerirem as dietas formuladas.

Diversos grupos do zooplâncton natural (rotíferos, microcrustáceos, etc.) têm sido amplamente utilizados como alimento vivo na larvicultura. Muitas vezes esses organismos são principalmente utilizados em uma escala menor ou em locais onde a coleta de populações naturais (ou induzidas) é possível, mas ainda assim, seu uso como alimento vivo tem gerado excelentes resultados em termos de desempenho (crescimento e sobrevivência) e de valores nutricionais das larvas (Van der Meeren ; Naas 1997). Apesar do progresso no desenvolvimento de novas técnicas de cultivo

desses organismos (Payne ; Rippingale 2001; Lee et al., 2005), estabelecer protocolos que apresentem uma relação de custo-benefício satisfatória para produção em massa ainda é um desafio..

Nos últimos anos, tem crescido a utilização de crustáceos da ordem Anostraca na aquicultura. Esse grupo, predominantemente dulcícola, possui características únicas que lhe permite sobreviver sob condições ambientais extremas. A maioria das espécies vive em corpos d'água intermitentes (lagoas temporárias), caracterizados por condições abióticas instáveis e reconhecidamente considerados como habitats estressantes (Belk ; Cole, 1975; Vernberg e Vernberg, 1983). Os organismos deste grupo possuem altos índices de mortalidade, especialmente nos primeiros estágios de vida. O desenvolvimento rápido e a reprodução precoce também são características intrínsecas e vitais para os organismos que vivem neste tipo de ambiente (Williams, 1985). Outra característica peculiar e de interesse em uma espécie a ser utilizada na aquicultura é a capacidade inerente de produzir cistos de resistência em grandes quantidades e com longo prazo de viabilidade. Por possuírem características favoráveis para a aquicultura, os anostráceos são potenciais candidatos para utilização como alimento vivo em larvicultura (Namin *et al* , 2007).

Dentre os inúmeros Anostraca com potencial aquícola, *Artemia sp.* já é consagrada como alimento vivo na aquicultura. Habitantes de águas salobras, as artemias apresentam diversas características favoráveis para a aquicultura, com destaque ao fácil isolamento dos cistos de resistência, os quais podem ser facilmente encontrados em lojas de aquarismo. No entanto, a atual produção de cistos de *Artemia* não atende à crescente demanda e vem se tornando cada vez mais onerosa, o que tem gerado a busca por uma espécie alternativa.

O Anostraca dulcícola *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921), popularmente conhecido como branconeta, de ocorrência natural de regiões semiáridas do Brasil (Cesar, 1989), tem grande potencial para substituir a *Artemia* como fonte de alimento vivo para espécies de água doce cultivadas. Sob condições de cultivo intensivo, essa espécie tem apresentado elevadas taxas de eclosão e baixas taxas de mortalidade quando comparada à *Artemia*, além de menor custo operacional (Grombone et al., dados não publicados).

Contudo, além das características favoráveis ao cultivo, é preciso que o organismo utilizado como alimento vivo atenda as necessidades nutricionais dos peixes quanto às proporções de proteínas, lipídios, em especial ácidos graxos, e carboidratos.

As proteínas representam grande parte do custo das dietas formuladas. Por isso, a metabolização das proteínas pelos peixes deve ser voltada para a síntese proteica estrutural destes organismos, e não para a obtenção de energia (Shiau, 1997). Essa metabolização proteica ideal pode ser alcançada aumentando-se a concentração de energia na dieta, através da inclusão de fontes energéticas não proteicas, tais como lipídios e carboidratos (Watanabe et al. 2001). Nas proporções adequadas, estes nutrientes podem melhorar a utilização das proteínas pelos peixes, reduzindo assim a excreção de compostos nitrogenados, o que tem impacto inclusive na qualidade da descarga de efluentes da piscicultura (Kaushik ; Me'dale 1994).

Lipídios são importantes componentes da dieta, fornecendo energia e ácidos graxos essenciais (Watanabe, 1982). São eficientemente metabolizados pela maioria das espécies de peixes (Sargent et al., 1989). O aumento da quantidade de lipídios na dieta reflete uma melhora no desempenho das larvas, principalmente no que concerne à utilização das proteínas pelos peixes.

Dentre as diferentes classes lipídicas encontradas nos peixes, os ácidos graxos essenciais (EFAs) merecem atenção especial. Os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) são indispensáveis na dieta das larvas de peixes, principalmente o ácido docosa-hexaenóico (DHA, C 22: 6n3), o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20: 5n3) e ácido araquidónico (ARA, C 20: 4n6) (Glencross 2009).

Embora os peixes não tenham nenhuma exigência dietética específica para carboidratos, a ausência deste nutriente na dieta pode deprimir o crescimento (Wilson, 1994), enquanto o excesso de carboidratos pode afetar negativamente parâmetros fisiológicos e morfológicos, constantemente causando altos níveis de glicose no sangue, ou ainda insuficiência hepática devido ao aumento da deposição de glicogênio (Hemre et al., 2002).

Dendrocephalus brasiliensis atende as características desejáveis em organismos a serem utilizados como alimento vivo, tendo grande potencial para utilização na aquicultura nacional em virtude de seu tamanho (25mm), facilidade de

cultivo e grande atratividade para os peixes. Entretanto, são escassos os estudos que investiguem condições de cultivo voltadas para produção em larga escala, bem como a qualidade nutricional da espécie, principalmente no que se refere a aminoácidos livres e os ácidos graxos.

Em face do exposto, este estudo teve como principais objetivos (1) investigar o desempenho de *D. brasiliensis* sob condições de cultivo semi-intensivo, através da avaliação de suas taxas de crescimento (individual e populacional) em dois períodos do ano (inverno e verão), com baixa e alta disponibilidade de recursos alimentares; e (2) avaliar o valor nutricional desses animais através da determinação de sua composição bioquímica. Com isso, buscou-se compreender a interação entre estes fatores no ciclo de vida da espécie, bem como averiguar se os diferentes regimes alimentares alteram a qualidade nutricional da espécie, com o intuito final de aprimorar as condições de cultivo em larga escala desses organismos.

Materiais e Métodos

Cultivo de *Dendrocephalus brasiliensis* e experimentos de taxa de crescimento

Os cultivos de *D. brasiliensis* foram realizados em tanques de 500L de volume situados sob estufa plástica (tipo casa de vegetação), na Estação Experimental de Aquicultura do Departamento de Hidrobiologia da UFSCar (EEA-DHb). Foram utilizados seis tanques, sendo três réplicas para cada tratamento: baixa quantidade de recursos alimentados (BR), sendo este considerado o grupo controle do experimento, e alta quantidade de recursos alimentares (AR), bem como em duas estações: inverno e verão. Os ensaios realizados durante o inverno se deram nos meses de julho e agosto de 2014, os de verão durante dezembro de 2014. A distribuição dos tanques disponíveis foi aleatória para cada ensaio.

Os sedimentos contendo cistos de *D. brasiliensis* são provenientes de cultivos anteriores realizados na mesma EA. Todo o sedimento utilizado foi homogeneizado para se evitar que linhagens distintas pudessem estar presentes em diferentes réplicas. Os tanques foram secos e limpos para receberem o inóculo. Aproximadamente 500g de sedimento contendo cistos foram distribuídos em cada réplica e os tanques foram preenchidos com água decolorada sob temperatura ambiente.

Cerca de 24 horas após o enchimento dos tanques podemos observar os primeiros náuplios eclodidos, porém neste estudo as coletas se iniciaram três dias após o enchimento, pois só então os náuplios podem ser identificados a olho nu, facilitando o manuseio dos mesmos. As coletas seguintes foram realizadas diariamente até o sexto dia, depois uma nova coleta no 10^o, 15^o e 20^o dia.

A alimentação dos náuplios também se iniciou três dias após a eclosão. As branconetas foram alimentadas com “água verde” proveniente de um tanque destinado a este fim. O tanque foi inicialmente adubado com fertilizante NPK (10/10/10) com concentração de 0,04 gL⁻¹ para que se estabelecesse uma comunidade planctônica inicial, principalmente fitoplanctônica. O inóculo algal utilizado foi de *Pseudokirchneriella subcapitata* cultivada em laboratório. Em seguida, foram soltos nos tanques alguns espécimes de *Brycon cephalus* (matrinxã), *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu), desta forma manteve-se alta ciclagem de

nutrientes nos tanques, o que permitiu a manutenção da água verde altamente concentrada durante todos os períodos experimentais.

A concentração de algas fornecidas às branconetas nos tanques foi menor durante os seis primeiros dias. Para estimar a quantidade de células fornecida por volume, foi feita contagem de células de amostra da “água verde” em microscópio óptico. Nos tanques do grupo controle foram fornecidas aproximadamente 5×10^3 células L^{-1} . Nos tanques do grupo experimental, a concentração aproximada foi de 10^4 células L^{-1} . Após o sexto dia, o grupo controle passou a ser alimentado com aproximadamente 10^4 células L^{-1} , já o grupo experimental, com aproximadamente 5×10^4 células L^{-1} . Os indivíduos de *D. brasiliensis* foram alimentados em dias alternados durante todo o período experimental.

Em cada coleta, recolhemos dez indivíduos por réplica, que tiveram seus comprimentos medidos, da porção anterior do encéfalo até a base do télson. Nos primeiros dois dias de coleta, com os indivíduos apresentando tamanho inferior a aproximadamente dois milímetros, os espécimes foram fixados com formol 4% e medidos com auxílio de microscópio estereoscópico (Leica). Nas coletas subsequentes, utilizou-se lupa manual ou olho nu, utilizando régua e papel milimetrado impermeabilizado.

Para se medir a densidade, foi utilizada uma rede pequena, de área retangular de 25 cm^2 e abertura de 500 μm , até o sexto dia. A partir do décimo dia foi utilizada rede circular com área de aproximadamente 113 cm^2 e abertura de 2 mm. Em cada coleta, a rede era passada no aglomerado de indivíduos de *D. brasiliensis* por três vezes seguidas, os indivíduos retidos eram então contados e devolvidos ao tanque. A densidade considerada era a média das três contagens em cada tanque.

Durante o período experimental, foram tomadas medidas de temperatura diariamente. Medidas de pH e níveis de oxigênio da água foram tomadas a cada três dias para controle de qualidade da água. Também acompanhamos o desenvolvimento dos espécimes, anotando o dia em que era possível observar a maioria dos indivíduos coletados em fase adulta – fêmeas com órgão ovipositor evidente.

Ao final dos experimentos, foram coletados 50 indivíduos de cada tratamento, a fim de obtermos um valor médio de massa por indivíduo.

Análises Bioquímicas

As condições de cultivo utilizadas para este teste foram às mesmas do experimento de taxa de crescimento, contudo este foi realizado apenas durante o verão. Ao final, todos os indivíduos de cada réplica foram coletados, e uma alíquota de mesma massa de cada tratamento foi destinada às análises.

Proteínas totais

No método Dumas, a amostra sofre uma digestão oxidativa com oxigênio a aproximadamente 900-1200°C; então o gás é arrastado com auxílio de hélio, purificado (incluindo a remoção de água) e os óxidos de nitrogênio formados são reduzidos a nitrogênio elementar pelo contato com metal quente (tungstênio ou cobre), o qual é determinado quantitativamente por detector de condutividade térmica. O conteúdo de nitrogênio é multiplicado pelos fatores de conversão específicos para proteína. Considerando este método, cerca de 150 a 300 mg de amostra, em folha de estanho, foram pesadas e levadas para uma pré-secagem em estufa, a uma temperatura de 105°C durante 30 min, visando remover o excesso de umidade, de acordo com a necessidade. A folha de estanho foi então fechada, de maneira adequada, retirando todo o ar da embalagem. Foram introduzidas as amostras no instrumento de proteína por combustão e os dados de identificação, juntamente com os de massa, foram colocados no sistema. Iniciaram-se as análises e as leituras acerca do teor de Nitrogênio foram efetuadas diretamente no equipamento de leitura de proteínas por combustão.

Aminoácidos

O sistema HPLC utilizado resultou da adaptação feita de um analisador de aminoácidos SPC1000 (Figura B), originalmente fabricado para troca iônica e derivatização pós-coluna com ninidrina, para um sistema de derivatização pré-coluna, com fenilisotiocianato (PITC) e coluna de sílica para fase reversa. O novo conjunto é constituído de degassificador, módulo de bomba quaternária, válvula de injeção Rheodyne, módulo de forno e módulo de detecção UV, equipado com coluna LUNA C18 100 Å 5u, 250x4,6mm 00G-4252-EQ.

Dada a descrição do equipamento, calculou-se a massa a ser hidrolisada em função do teor de %PB na amostra seguindo a Tabela A, e em seguida pesou-se a

massa em um tubo de hidrólise (Figura C, fabricação nacional), adicionou-se 9mL de HCl 6N com 3% m/v de fenol, fez-se vácuo no tubo, lacrou-se e acondicionou-se o mesmo em bloco de reação térmica (Figura D), deixando-o por 24h a 110°C. Em seguida, acrescentou-se uma alíquota do padrão interno AAAB e diluiu-se a volume tabelado. Filtrou-se uma alíquota, seguindo a tabela de diluição, secou-se a 70miliTorr em sistema *trapp* com nitrogênio criogênico. Neutralizou-se com uma solução 4:4:2 de acetato de sódio trihidratado 0,2N, metanol grau HPLC e trietilamina a 99-100%, secou-se novamente como já descrito. Nesta etapa, adicionou-se o PITC para derivatizar os aminoácidos liberados pela hidrólise, formando-se o PTC aminoácido. Ao tubo contendo os cristais de aminoácidos derivatizados, adicionou-se 500uL de diluente. A detecção foi a 254nm após a cromatografia em fase reversa (loop de injeção de 30uL, pH 6,40, em gradiente linear binário com fluxo de 1mL/min e temperatura da coluna 58°C), sendo o eluente A um tampão de acetado de sódio 0,14N, acetonitrila (240mL/2000mL de acetado de sódio 0,14N) e trietilamina (1mL/2000mL de acetado de sódio 0,14N). O eluente B, uma solução 6:4 de acetonitrila (grau HPLC) e água milli-Q. A quantificação foi feita por inclusão do ácido a-aminobutírico AAAB como padrão interno.

Ácidos graxos

Gorduras e ácidos graxos podem ser extraídos dos alimentos através de métodos de hidrólise (hidrólise ácida para a maioria dos produtos, hidrólise alcalina para produtos lácteos). Durante a análise é adicionado ácido pirogálico com o intuito de minimizar a degradação oxidativa dos ácidos graxos. O triglicéride undecanóico (C11:0) é adicionado como padrão interno. A gordura é extraída com a utilização de éter e metilada em ésteres metílicos de ácidos graxos (fatty acid methyl esters - FAMES) através da reação com trifluoreto de boro (BF₃) em metanol. FAMES são medidos quantitativamente por cromatografia gasosa capilar mediante a utilização de padrão interno C11:0. A gordura total é calculada como a soma de todos os ácidos graxos e expressa como triglicéride equivalente. Gorduras saturadas e monoinsaturadas são calculadas com a soma de seus respectivos ácidos graxos. Gorduras monoinsaturadas incluem somente a forma *cis*.

Logo, foi pesada precisamente uma porção homogeneizada da amostra (contendo aproximadamente 100-200mg de gordura) no frasco de mojonier; o material foi forçado o máximo possível para dentro do frasco. Adicionou-se aproximadamente 100mg de ácido pirogálico e 2,0mL de solução de padrão interno triglicéride, juntamente com algumas pérolas de vidro. Posteriormente, foi adicionado 2,0mL de álcool etílico e a porção foi misturada até que tudo estivesse em solução. Tendo feito isso, adicionou-se 10mL de HCL 8,3M e misturou-se bem, colocando posteriormente o frasco em banho-maria com agitação a 70°C-80°C, e manteu-se a velocidade de agitação moderada por 40min; a cada 10 min misturou-se o conteúdo do frasco em agitador vortex visando a incorporação na solução de partículas que estivessem aderidas às paredes do frasco. Após digestão, foi removido o frasco do banho-maria e este foi resfriado a temperatura ambiente (20°C-25°C), adicionou-se álcool etílico suficiente para preencher o reservatório do frasco e o conteúdo foi misturado cuidadosamente.

Na metilação, foi dissolvida a gordura extraída em 2-3mL de clorofórmio e 2-3mL de éter etílico, transferindo posteriormente a mistura para vial, evaporando em banho-maria a 40°C e completando a evaporação em fluxo de nitrogênio. Posteriormente adicionou-se 2,0mL de reagente BF₃ e 1mL de tolueno, sendo a tampa do vial vedada com septo de teflon/silicone e então aquecendo o recipiente por 45min a 100°C, este sendo agitado gentilmente por 10 min e então aguardando que o mesmo chegasse a temperatura ambiente (20°C-25°C), após o processo. Adicionou-se 5,0mL de água, 1,0mL de hexano e aproximadamente 1,0g de sulfato de sódio, o vial foi então tampado e agitado por 1min. Foi aguardada a separação das fases e a fase superior foi cuidadosamente separada para outro vial contendo 1,0g de sulfato de sódio. Os FAMES foram, então, injetados na coluna do cromatógrafo a gás, ou caso mais conveniente, foi transferido a um vial de amostrador automático para análise da cromatografia a gás.

Na determinação, o tempo de retenção relativo e o fator de resposta de cada éster metílico de ácido graxo foi obtido através da análise por cromatografia a gás da solução padrão de cada éster, e da solução padrão da mistura dos ésteres. Injetou-se aproximadamente 2µL da solução padrão individual de cada éster e 2µL da solução padrão da mistura dos ésteres. Foi utilizada a solução padrão da mistura de ésteres para ajustar a resposta cromatográfica antes de injetar algumas soluções teste. Depois

que as condições cromatográficas estavam ajustadas, injetou-se as soluções testes das amostras.

Carboidratos

Na cromatografia de íons, a separação é obtida quando os componentes da amostra são carregados pela fase móvel (ou eluente), migram e interagem com a fase estacionária. A velocidade de migração de um dado componente é em função do equilíbrio de distribuição da amostra entre as fases móvel e estacionária. Os componentes que tiverem maior afinidade com a fase estacionária migrarão lentamente comparados aos de maior afinidade com a fase móvel. Portanto, a separação resulta de diferentes velocidades de migração como uma consequência do equilíbrio de distribuição. Tendo isso em mente, os seguintes procedimentos foram tomados visando a estabilização da amostra.

Primeiramente, foram pesadas duas amostras de 20 à 500 mg, tendo sido ambas previamente homogeneizadas, e ambas foram transferidas para o frasco de hidrólise. Em seguida, foi adicionado ao frasco 0,8ml de uma solução de ácido sulfúrico 72%, sendo então o recipiente tampado e agitado no vórtex por 10s. Após um repouso de 1 hora, foram adicionados 5 ml de água ultrapura e o frasco foi submetido ao vácuo ultrassom por um período de 5 min. Tendo o recipiente tampado, o mesmo foi aquecido até 90°C por 4 horas no bloco digestor, posteriormente sendo esfriado e, todo seu conteúdo, juntamente com a água ultrapura, foi transferido para um Becker de 100ml, com auxílio de uma pisseta. O pH foi então ajustado a um valor entre 7 e 11,5, com o auxílio de uma fita de pH. Por fim, a substância foi transferida para um balão volumétrico de acordo com a concentração, sendo assim completado o volume com água ultrapura, diluições foram feitas de acordo com a necessidade.

A Energia Bruta (EB) foi medida das em Bomba Calorimétrica (IKA modelo 5000).

Estatísticas

Para análise dos resultados obtidos, foram realizados testes de análise de variância entre os comprimentos no último dia de cultivo (*one way ANOVA*), e teste de Tukey *a posteriori* para resultados paramétricos e Kruskal-Wallis para resultados não-paramétricos. Os cálculos estatísticos e a elaboração dos gráficos foram realizados com auxílio do software SigmaPlot 11.0.

Resultados

As temperaturas anotadas nos diferentes tanques experimentais (réplica um e dois de cada ambiente testado) não foram significativamente diferentes entre si (ANOVA), portanto, para efeito comparativo entre o inverno e o verão, foram adotadas as médias de todos os tanques, que podem ser observadas na Figura 1, bem como os desvios-padrão para cada dia anotado.

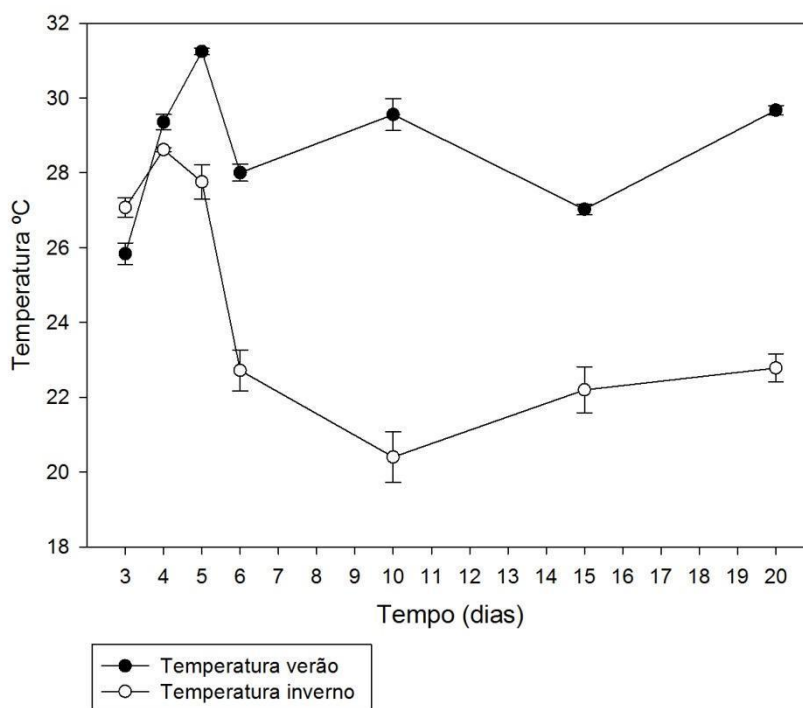


Figura 1: Temperatura média e desvio-padrão para cada dia de coleta durante o verão (círculos cheios) e o inverno (círculos vazios).

A diferença entre as temperaturas registradas nas duas estações foi estatisticamente significativa, com p -valor = 0,012 e o tempo para se atingir a idade adulta foi de 7 a 8 dias durante o verão e de 16 a 20 dias durante o inverno. Os resultados dos testes estatísticos comparando crescimento em comprimento entre os diferentes tratamentos estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo dos resultados dos testes estatísticos comparando os comprimentos de indivíduos de *D. brasiliensis* ao final do experimento. **AR:** alto recurso, **BR:** baixo recurso, **v:** verão, **i:** inverno.

	ANOVA	Normalidad e	Variânci a	Tukey	Kruskal- Wallis
ARv x BRv	<0.001	0.686p	1.000p	<0.001	
ARi x BRi		0.171p	<0.050f		0.013
ARv x Ari	<0.001	0.847p	0.451p	<0.001	
BRv x BRi		< 0.050f			<0.001

p: passou no teste, f: falhou no teste.

Durante o verão, a taxa de crescimento médio no grupo controle (BR) foi de 0,77 mm ind⁻¹ dia⁻¹, no grupo experimental (AR) o crescimento foi de 1 mm ind⁻¹ dia⁻¹. Já durante o inverno, o grupo controle apresentou taxa de crescimento de 0,62 mm ind⁻¹ dia⁻¹, e o grupo experimental 0,69 mm ind⁻¹ dia⁻¹.

Abaixo, observamos uma comparação entre as curvas obtidas de crescimento médio e densidade dos dois tipos de ambiente (tratamento) durante o verão (Figura 2) e durante o inverno (Figura3).

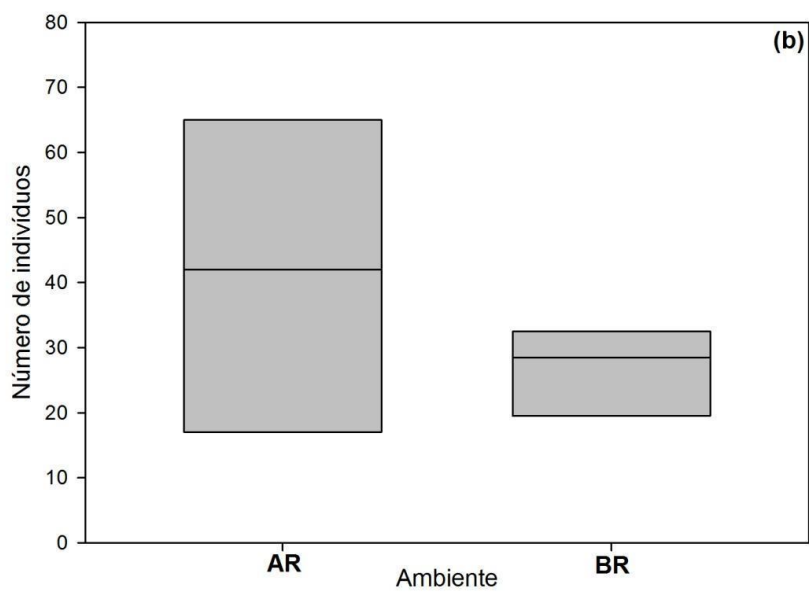
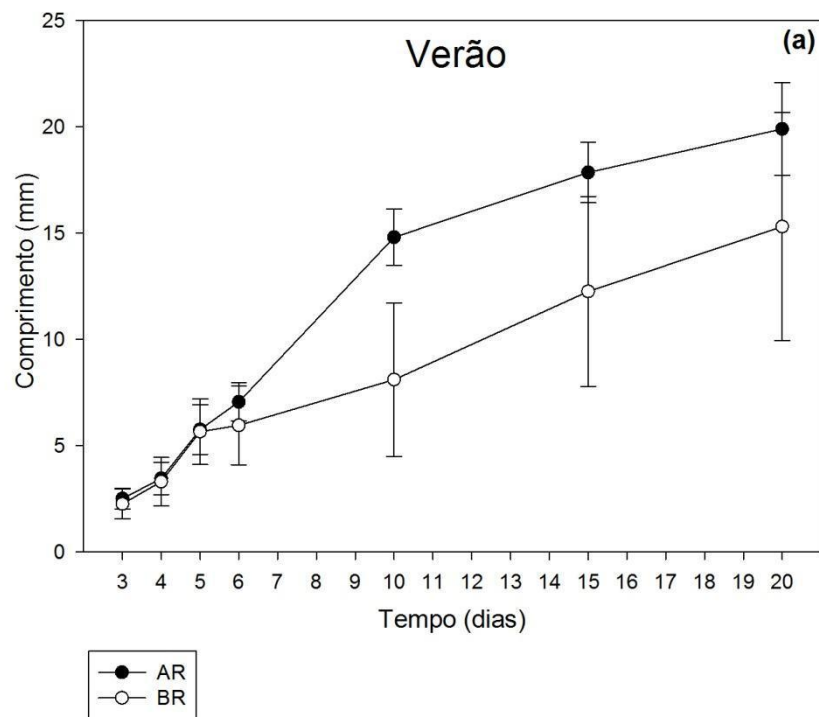


Figura 2: Diferenças entre os cultivos em ambiente AR e BR durante o verão. (a): curvas de crescimento médio em meio AR e em meio BR. (b): *boxplots* da variação de densidade em meio AR e em meio BR.

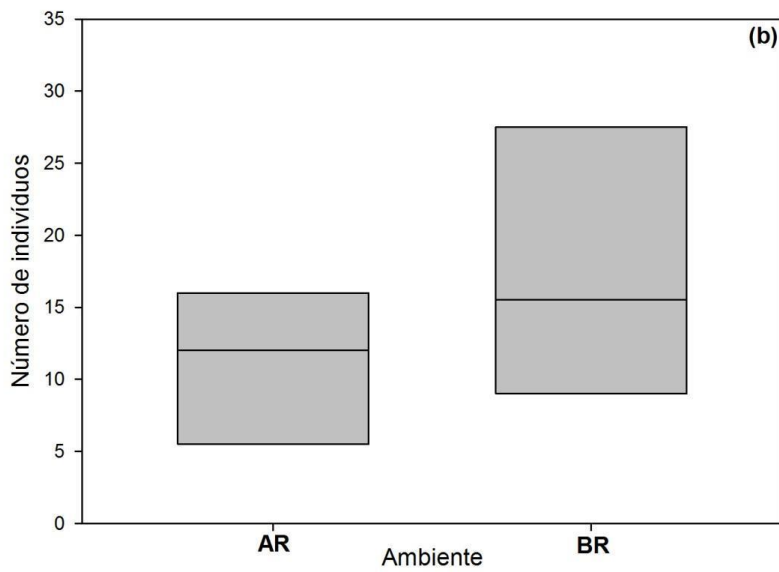
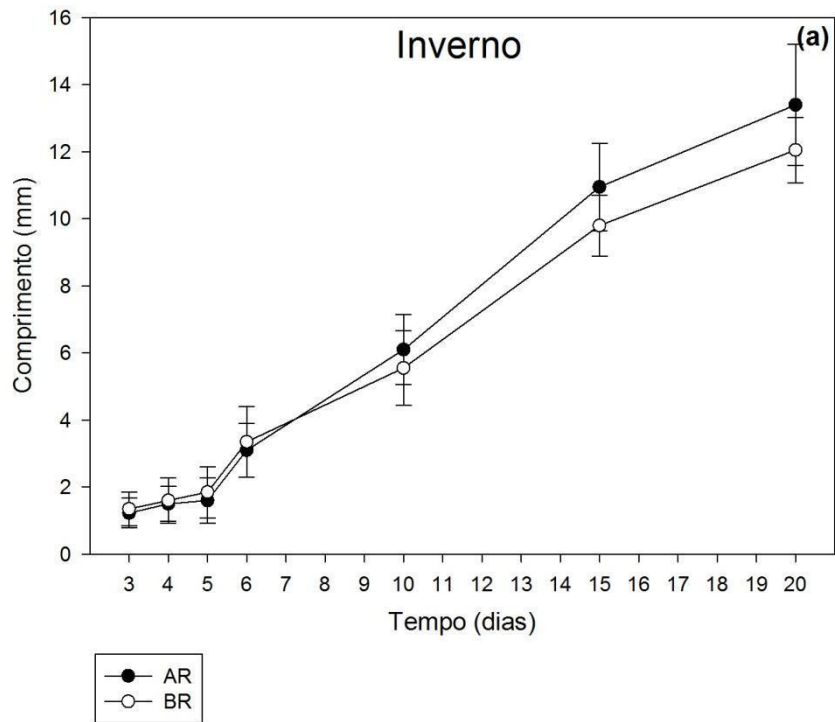
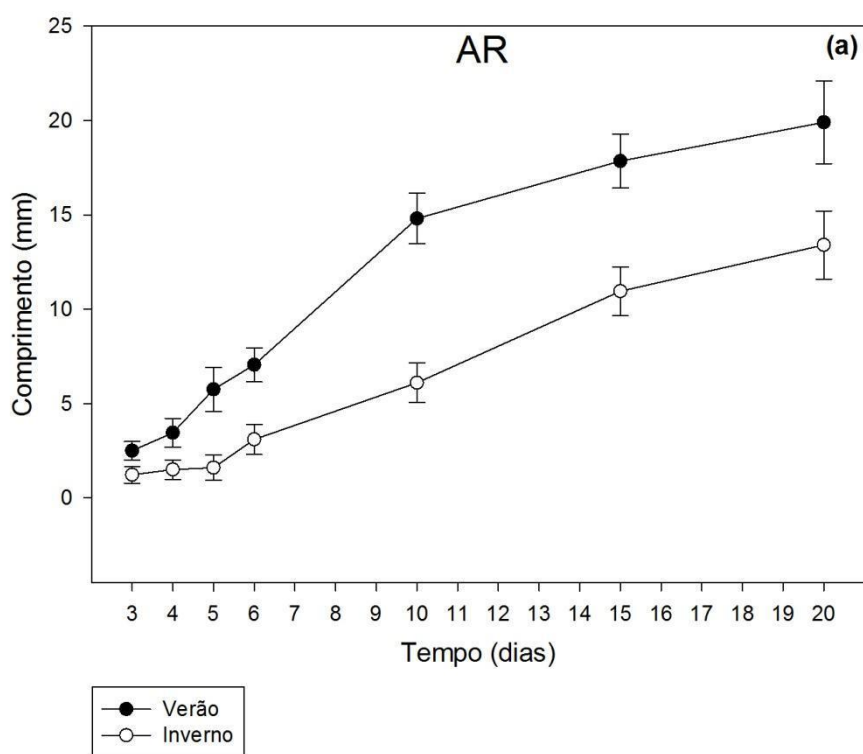


Figura 3: Diferenças entre os cultivos em ambiente AR e BR durante o inverno. (a): curvas de crescimento médio em meio AR e em meio BR. (b): *boxplots* da variação de densidade em meio AR e em meio BR.

Em seguida, observamos um comparativo de crescimento e densidade, sob a mesma condição ambiental (tratamento), porém em diferentes estações. Nas Figuras 4 e 5 temos a comparação entre estas variáveis em ambientes com alto recurso e baixo recurso (controle), respectivamente.



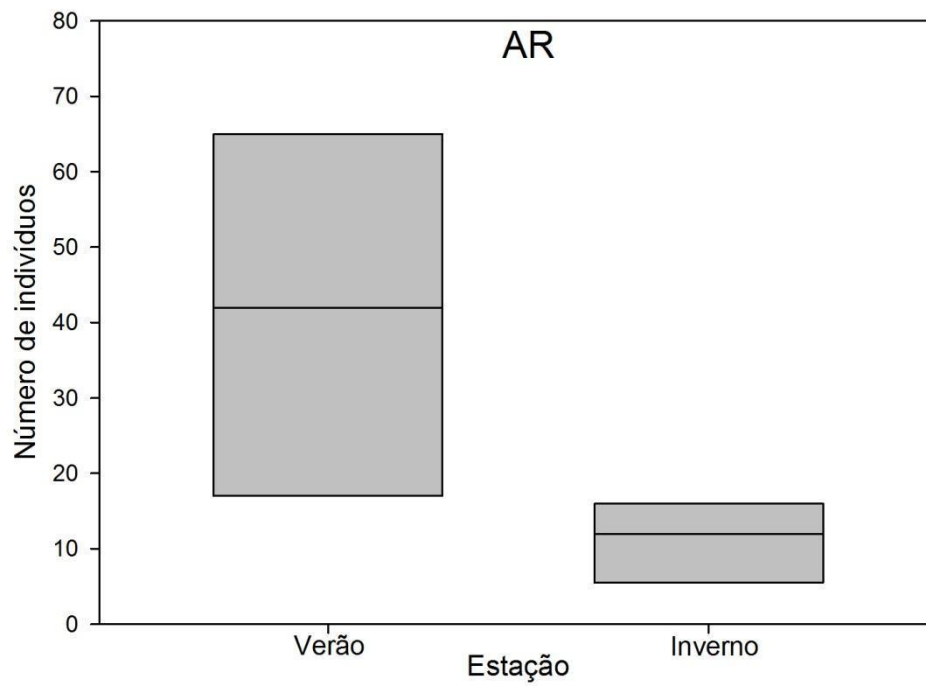


Figura 4: Diferenças entre os cultivos em ambiente AR durante o verão e o inverno. (a): curvas de crescimento médio durante o verão e durante o inverno. (b): *boxplots* da variação de densidade durante o verão e durante o inverno.

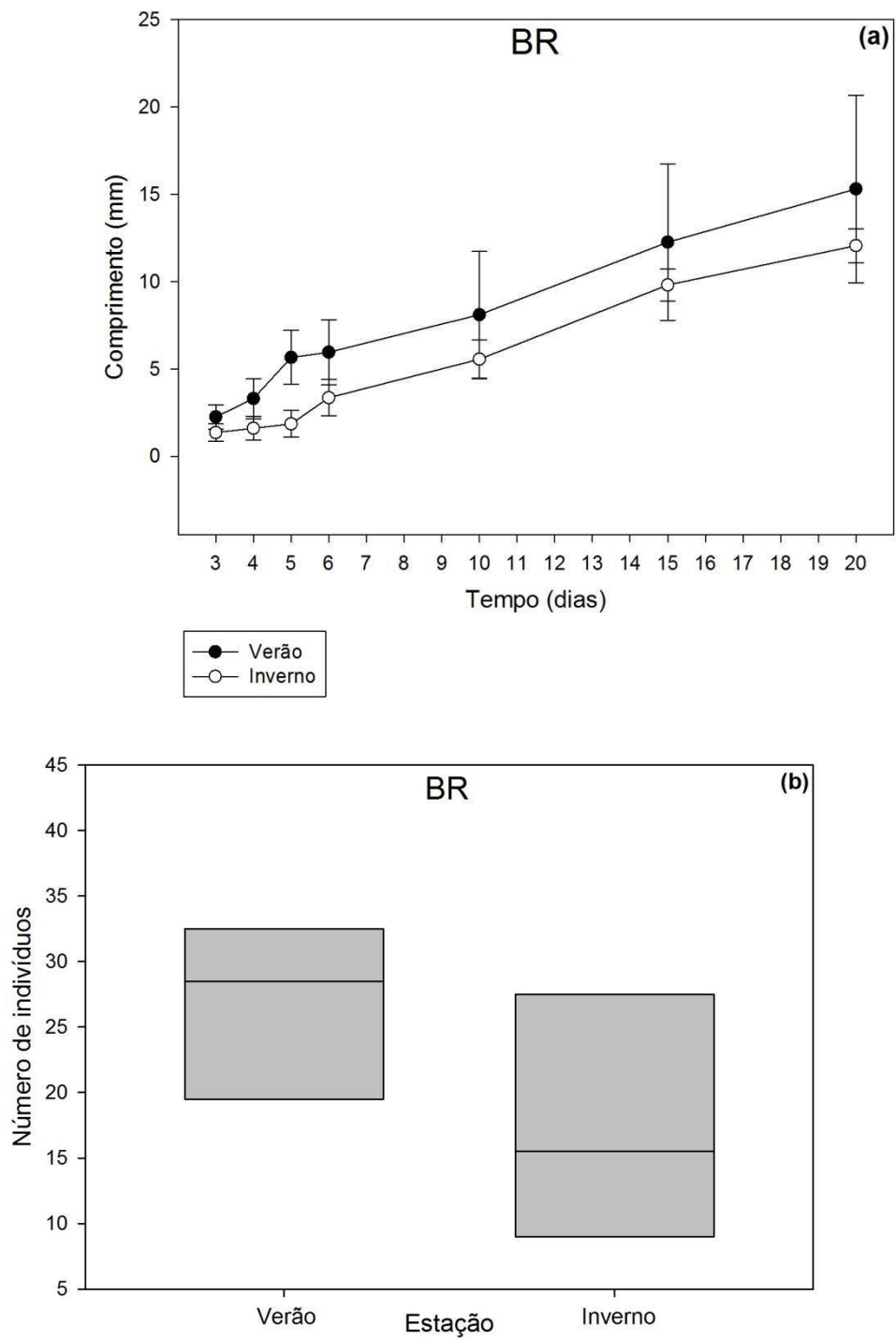


Figura 5: Diferenças entre os cultivos em ambiente oligotrófico durante o verão e o inverno. (a): curvas de crescimento médio durante o verão (LV) e durante o inverno (LI). (b): *boxplots* da variação de densidade durante o verão (1) e durante o inverno (2), onde n é o número de indivíduos.

Parte dos resultados das análises bioquímicas estão resumidos nas figuras 6 e 7, onde estão expressas as porcentagens de cada biomolécula em relação ao peso-seco das amostras.

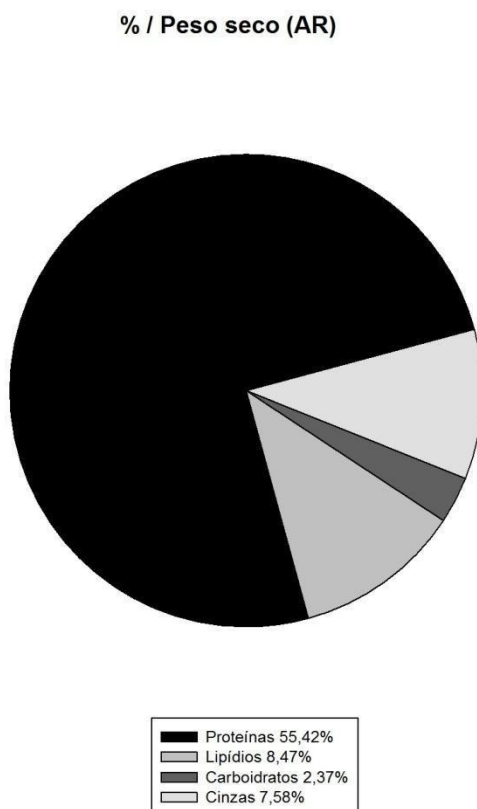


Figura 6: Porcentagens de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas em relação ao peso seco das amostras referentes ao cultivo em ambiente com alta quantidade de recursos alimentares.

%/ Peso Seco (BR)

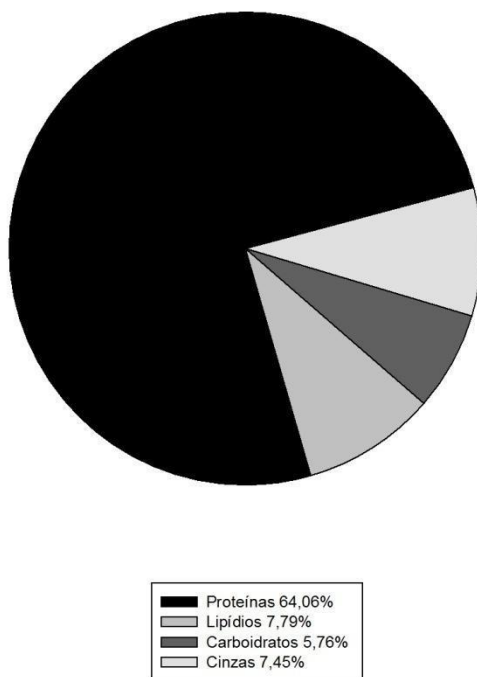


Figura 7: Porcentagens de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas em relação ao peso seco das amostras referentes ao cultivo em ambiente com baixa quantidade de recursos alimentares.

Nas Tabelas 2 e 3, observamos um comparativo dentre os aminoácidos e os ácidos graxos de cada tratamento.

Tabela 2: Aminoácidos encontrados nos dois tratamentos, em % do total de aminoácidos.

Alto Recurso		Baixo Recurso	
Molécula	fr(%)	Molécula	fr(%)
Ácido Glutâmico	16,82	Ácido Glutâmico	20,37
Leucina	12,54	Leucina	12,17
Alanina	10,70	Alanina	9,79
Glicina	8,26	Glicina	9,26
Prolina	6,73	Prolina	7,41
Fenilalanina	6,73	Valina	6,35
Isoleucina	5,81	Fenilalanina	6,08
Ácido Aspartico	4,89	Isoleucina	5,82
Tirosina	4,89	Ácido Aspartico	3,97
Histidina	4,28	Histidina	3,44
Lisina	3,98	Metionina	2,65
Arginina	3,06	Tirosina	2,38
Treonina	2,75	Lisina	2,38
Serina	2,45	Serina	1,85
Valina	1,83	Arginina	1,59
Triptofano	1,53	Treonina	1,59
Cistina	1,22	Triptofano	1,32
Taurina	0,92	Taurina	0,79
Metionina	0,61	Cistina	0,79

Tabela 3: Ácidos graxos encontrados nos dois tratamentos, em % do total de ácidos graxos.

Alto Recurso		Baixo Recurso	
Molécula	fr(%)	Molécula	fr(%)
Ácido Palmítico	38,00	Ácido Palmítico	2,17
Ácido Esteárico	16,00	Ácido Esteárico	2,17
Ácido Oleico	16,00	Ácido Oleico	2,17
Ácido Linoleico	6,00	Ácido Linoleico	36,96
Ácido Alfa Linolenico LNA*	4,00	Ácido Alfa Linolenico LNA*	2,17
Ácido Mirístico	2,00	Ácido Mirístico	2,17
Ácido Miristoleico	2,00	Ácido Miristoleico	15,22
Ácido Palmitoleico	2,00	Ácido Pentadecanóico	10,87
Ácido Margárico	2,00	Ácido Palmitoleico	2,17
Ácido Behenico	2,00	Ácido Margárico	6,52
Ácido Lignocérico	2,00	Ácido Linolelaídico	6,52
Ácido Pentadecanóico	1,00	Ácido Araquídico	2,17
Ácido Elaidico	1,00	Ácido Araquidônico AA*	2,17
Ácido Linolelaídico	1,00	Ácido Behenico	2,17
Ácido Araquídico	1,00	Ácido 5,8,11,14,17- EPA	2,17
Ácido Cis-11-Eicosenóico	1,00	Ácido Lignocérico	2,17
Ácido Araquidônico AA**	1,00		
Ácido 11,14,17-Eicosatrienóico	1,00		
Ácido 5,8,11,14,17- EPA *	1,00		

A biomassa total média foi de 26,647 g \pm 10,74 para o grupo com baixa quantidade de alimento (BR). Já o grupo experimental, alimentado com alta quantidade de alimento (AR) teve biomassa média de 49,127 g \pm 9,685.

Por fim, a quantidade de energia bruta obtida para o grupo controle (BR) foi de 176,6 cal g⁻¹ e para o grupo experimental (AR) foi de 272,49 cal g⁻¹.

Discussão

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para se cultivar microalgas em larga escala, desde procedimentos menos controlados e de forma extensiva, até culturas intensivas. No entanto, a produção controlada de microalgas é ainda um procedimento complexo e caro. O cultivo de microalgas para aplicação na aquicultura (criação de moluscos, camarões e larvas de peixes) ocorre principalmente no local, isto é, nas pisciculturas onde são utilizadas, aproveitando a estrutura e os recursos disponíveis (Navarro; Sarasqueta 1998; Muller-Fuega *et al.* 2004). Desta forma, o uso de água verde na alimentação de *D. brasiliensis* não só é adequado como se adéqua a realidade dos produtores aquícolas.

Foi evidenciado um crescimento em comprimento mais rápido bem como uma densidade populacional mais alta durante o verão em ambientes com alta quantidade de recursos. Na mesma estação, com baixa quantidade de alimento, a densidade apresentou-se menor, uma vez que a escassez de alimento para *D. brasiliensis* parece ser letal em temperaturas tão elevadas. Entretanto, no inverno os quadros se inverteram. Uma grande abundância de alimento associada a baixas temperaturas leva a uma maior mortalidade, ao passo que os indivíduos em condições oligotróficas têm maior sobrevivência.

Ewald *et al* (2013) estudaram a relação entre o anostraca *Chirocephalus diaphanus* (Prévost, 1803) e a sua predação em diferentes temperaturas. Os autores observaram que os anostracas, na ausência do predador, tinham melhor desempenho de crescimento em temperaturas intermediárias (20° C) comparadas às mais quentes e mais frias (25 e 5°C respectivamente). Entretanto, estas temperaturas intermediárias foram maiores do que a temperatura média que ocorre no ambiente natural da espécie. Da mesma forma, as temperaturas em que foi registrado um melhor crescimento (28°C em média no verão) são menores do que aquelas registradas em ambientes naturais com registros de *D. brasiliensis* (Lopes, 1998). Isto nos indica que os anostracas têm potencial para acelerar o crescimento quando expostos a temperaturas mais elevadas. Entretanto, é importante mencionar que em cultivos anteriores, foi verificado um aumento da mortalidade quando a temperatura se manteve acima de 32°C.

Neste mesmo estudo, os autores observaram que ocorria drástica queda na sobrevivência de *C. diaphanus* quando os mesmos encontravam-se em temperaturas mais baixas. Já em nossos ensaios, demonstramos que as diferenças nas densidades entre inverno e verão foram estatisticamente significativas, sendo sempre menores no inverno. Porém, a queda na densidade ficou em torno de 50%, muito acima daquela registrada por Ewald *et al* (2013), o que pode significar que apesar do baixo desempenho, *D. brasiliensis* é capaz de sobreviver em temperaturas ainda mais baixas.

A diferença de densidade entre os ambientes com alta e baixa quantidade de recursos durante o inverno chama a atenção por ser oposta ao que ocorre durante o verão. Ao passo que o crescimento em comprimento no mesmo período é concordante com o que ocorre durante o verão – os indivíduos crescem mais no ambiente com alto recurso. Gonçalves (2001) testou a remoção de algas em efluente pela alimentação de *D. brasiliensis*. Em apenas 24 horas cerca de 90% das algas presentes no efluente foram removidas, mostrando a eficiência de filtração de algas pela espécie. Assim, possivelmente a maior mortalidade observada de *D. brasiliensis* durante o inverno em ambiente com muito alimento se dê por que as branconetas não conseguem manter a mesma taxa de filtração que apresentam durante o verão. Dessa forma, a matéria orgânica acumulada favorece outros consumidores primários, que no verão não competem com o ritmo de filtração das branconetas, como por exemplo, espécies de ostracodas e daphnias.

Alguns estudos utilizaram a temperatura, associada a outros fatores abióticos, como determinante no regime de eclosão dos cistos, bem como a sobrevivência dos indivíduos eclodidos (Rossi *et al* 2013; Atashbar *et al*, 2014). Nestes trabalhos pode ser observado que, em geral, temperaturas mais altas resultam em melhores condições de sobrevivência, porém a interação com um ou mais fatores pode alterar essa lógica. Assim como nossos resultados, estes trabalhos demonstram como os anostracos são altamente adaptáveis e por isso são típicos de lagoas temporárias, que são ambientes altamente suscetíveis a mudanças.

Nos resultados das análises bioquímicas, observamos que *D. brasiliensis* apresenta uma alteração do perfil bioquímico frente aos diferentes regimes alimentares testados durante o seu ciclo de vida.

Na condição controle, isto é, quando o organismo foi mantido sob baixa quantidade de alimento, nota-se um aumento da proporção de proteínas (64,06%). Além disso, observamos em nossas análises bioquímicas a presença de praticamente todos os aminoácidos, embora sejam vistos com concentrações distintas. É importante salientar a presença de alguns deles, tais como: ácido glutâmico, leucina, glicina, alanina, isoleucina e valina que tiveram maior abundância. Considerando as alterações bioquímicas que ocorrem no organismo, é razoável inferir que sob tais condições haja uma regulação positiva do metabolismo, principalmente, vias relacionadas ao processo glicolítico e/ou a gliconeogênese, uma vez que os aminoácidos que tiveram maior abundância estão associados a essas vias (Cervantes-Ramírez M, et al., 2013). Talvez, para estes organismos, a gliconeogênese seja uma via recorrente para obtenção de energia, frente a abundante quantidade de proteína.

Além disso, os aminoácidos de cadeia ramificada aqui identificados: leucina, isoleucina e valina, são aminoácidos essenciais que despertam interesse pelas suas propriedades fisiológicas. A literatura destaca uma série de estudos demonstrando a capacidade desses aminoácidos em promover a síntese proteica muscular (Cervantes-Ramírez M, et al., 2013). Verifica-se também que agem estimulando a fase de iniciação da tradução do RNA mensageiro em proteína, por mecanismos ainda desconhecidos (Rogerio, M. M.; Tirapegui, J., 2008). Isso reforça os resultados encontrados, uma vez que de modo geral, nos dois tratamentos, a quantidade de proteína é alta.

De acordo com Sorgeloos *et al* (1998), a composição bioquímica média (em peso seco) de artêmias recém-eclodidas é de cerca de: 56,2% de proteínas, 17,0% de lipídios, 3,6% de carboidratos 7,6% de cinzas. A composição bioquímica dos cistos de artemia descapsulados é virtualmente a mesma daquela dos náuplios recém-eclodidos, sendo cerca de 50 - 57% de proteínas, 13 - 14% de lipídios, 6 - 7% de carboidratos e 5 - 9% de cinzas, contudo, o peso seco e a quantidade de energia é 30 - 40% superior ao primeiro instar naupliar. Por outro lado, em comparação com os náuplios de instar I, os cistos descapsulados têm uma proporção mais baixa de aminoácidos livres, proteína total, lipídios polares e de ácidos graxos livres em relação aos lipídios totais. (Van Stappen 1996; Garcia Ortega et al.1998). No tratamento com baixa quantidade de alimento, encontramos valores superiores de proteínas (64,06%), e valores muito próximos destes apresentados pelos autores citados no tratamento com alta quantidade de recursos alimentares (55,42%). De forma geral, *D. brasiliensis*

pode ser considerada uma boa fonte de proteínas para a alimentação de peixes ou crustáceos.

Em muitos casos, o potencial uso de uma espécie como alimento vivo é avaliado pela presença de ácidos graxos insaturados em sua composição. Em *D. brasiliensis*, foram detectados alguns ácidos graxos insaturados, tais como o ácido alfa linolénico (LLA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido araquidônico. Os níveis destes ácidos graxos aqui observados estão muito próximos daqueles recomendados para várias espécies de peixes de água doce (Watanabe 1987). Contudo não foi detectada a presença de ácido docosahexaenóico (DHA). Este componente também é comumente ausente em *Artemia* (selvagem) e cistos, e é considerado essencial na larvicultura de espécies de peixes e crustáceos marinhos (Bengtson, Leger ; Sorgeloos 1991).

A falta de ácidos graxos de cadeia polinsaturada dentre os anostraca é uma limitação considerável para a utilização destes organismos como um todo na larvicultura de espécies de peixes, em especial as marinhas. Por isso, diversos trabalhos procuram técnicas de enriquecimento nutricional, na tentativa de reverter essa limitação (Merchie, 1996). Contudo, vários autores notaram que o fornecimento de ácidos graxos insaturados na dieta de anostracos muitas vezes é ineficiente, uma vez que estes compostos podem acabar sendo direcionados para outras vias metabólicas, e não são fixados nos organismos estudados (Navarro, Henderson, McEvoy, Bell ; Amat 1999).

Conclusões

D. brasiliensis cresce mais em comprimento com maiores quantidades de alimento, tanto no verão quanto no inverno.

No entanto, durante o inverno, grande quantidade de alimento pode causar maior mortalidade e resultar em baixa densidade.

As branconetas apresentam concentrações protéicas maiores que *Artemia* sp, com grande variedade de aminoácidos.

A alimentação com baixa quantidade de recursos resulta em melhor qualidade nutricional, com maior quantidade de proteínas e aminoácidos.

D. brasiliensis possuem ácidos graxos poliinsaturados, porém alguns destes ácidos graxos essenciais não foram detectados.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do Projeto Temático do qual este estudo fazia parte. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor. Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais por todo o suporte fornecido.

Referências bibliográficas

BELK AND COLE (1975) APUD NAMIN I., ARSHAD J. U. ; RAMEZANPOOR Z.(2007). Mass culture of fairy shrimp *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea – Anostraca) and its use in larviculture of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research* 38: 1088-1092.

BENGSTON D., LEGER P. ; SORGELOOS P. (1991) Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: *Artemia Biology* (ed. By R.A. Brown, P. Sorgeloos ; C.N.A Trotman), CRC Press, Boca Ratn, FL, USA,374pp.

CERVANTES-RAMÍREZ, M., MÉNDEZ-TRUJILLO, V., ARAIZA-PIÑA, B.A. , BARRERA-SILVA, M.A. , GONZÁLEZ-MENDOZA, D. AND MORALES-TREJO, A . Supplemental leucine and isoleucine affect expression of cationic amino acid transporters and myosin, serum concentration of amino acids, and growth performance of pigs. *Genetics and Molecular Research*, 2013.

GARCIA ORTEGA A.,VERRETHJ.A.J., COUTTEAU P., SEGNER H., HUISMAN E.A. ; SORGELOOS P. (1998) Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161: 501-514.

GIRI S.S., SAHOO S.K., SAHU B.B., SAHU A.K., MOHANTY S.N., MUKHOPADHYAY P.K. ; AYYAPPAN S. (2002) Larval survival and growth in *Wallago attu* (Bloch and Schneider): effects of light, photoperiod and feeding regimes. *Aquaculture* 213: 151–161.

GOLÇALVEZ, J. L. Remoção de algas via alimentação pelo microcrustáceo *Dendrocephalus brasiliensis* (Crustacea: Anostraca). Dissertação de pós-graduação em Tecnologias Ambientais. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2001.

HEMRE, G.I., MOMMSEN, T.P. ; KROGDAHL, A. (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8:175-194.

JOMORI R.K., DUCATTI C., CARNEIRO D.J. ; PORTELLA M.C. (2008) Stable carbon (^{13}C) and nitrogen (d^{15}N) isotopes as natural indicators of live and dry food in

Piaractus mesopotamicus (Holmberg,1887) larval tissue. *Aquaculture Research* 39:370-381.

KAUSHIK, S.J. ; MÉDALE, F. (1994) Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture*, 124: 81-97.

KOVEN W., KOLKOVSKI S., HADAS E., GAMSIZ K. ; TANDLER A. (2001) Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194:107-121.

LAVENS, P; SORGELOOS, P. (eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.)

MERCHIE G. (1996) Use of nauplii and meta-nauplii. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361 (ed. by P. Lavens ; P. Sorgeloos),p.137-163. FAO, Rome, Italy.

MULLER-FUEGA A., MOAL J. ; KAASA R. (2004) Microalgae for aquaculture. The current global situation and future trends. in *Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology* (ed. by A. Richmond), p. 352-364. Blackwell Science, Pondicherry, India.

NAMIN I., ARSHAD J. U. ; RAMEZANPOOR Z.(2007). Mass culture of fairy shrimp *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea – Anostraca) and its use in larviculture of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research* 38: 1088-1092.

NAVARRO J.C., HENDERSON R.J., MCEVOY L.A., BELL M.V. ; AMAT F. (1999) Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174:155-166.

NAVARRO N. ; SARASQUETE C. (1998) Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae cl. Growth, histology and water quality. *Aquaculture* 167:179-193.

OGLE J.T., LEMUS J.T., NICHOLSON L.C., BARNES D.N. ; LOTZ J.M. (2005) Characterization of an extensive zooplankton culture system coupled with intensive larval rearing of red snapper *Lutjanus campechanus*. in *Copepods in Aquaculture* (ed. By C.-S. Lee, P.J. O'Bryen ; N.H. Marcus), p.225-244.Blackwell Publishing, Oxford, UK.

PAYNE M.F. ; RIPPINGALE R.J. (2001) Effects of salinity, cold storage and enrichment on the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201: 251-262.

POLICAR T., KOZÁK P., HAMÁCKOVÁ J., LEPICOVÁ A., MUSIL J. ; KOURIL J. (2007) Effects of short-time *Artemia* spp. feeding in larvae and different rearing environments in juveniles of common barbel (*Barbus barbus*) on their growth and survival under intensive controlled conditions. *Aquatic Living Resources* 20: 175–183.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008.

SARGENT, J., HENDERSON, R.J. ; TOCHER, D.R. (1989) The lipids. In: *Fish Nutrition* (Ed. By Halver, J.E.), 2nd Ed., Vol. 1, p. 219–257. Academic Press Inc., San Diego, USA.

SHIAU, S.Y. (1997) Utilization of carbohydrates in warmwater fish— with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture* 151: 79-96.

SORGELOOS P., DHERT P. ; CANDREVA P. (2001) Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200:147-159.

VAN DER MEEREN T. ; NAAS K.E. (1997) Development of rearing techniques using large enclosed ecosystems in the mass production of marinefish fry. *Reviews in Fisheries Science* 5: 367-390.

VAN STAPPEN G. (1996) Introduction, biology and ecology of *Artemia*. in *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper (ed. By P. Lavens ; P. Sorgeloos), p.79-106. FAO, Rome, Italy.

VERNBERG W.B. ; VERNBERG F.J. (1983) apud Namin I., Arshad J. U. ; Ramezanpoor Z.(2007). Mass culture of fairy shrimp *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea – Anostraca) and its use in larviculture of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research* 38: 1088-1092.

VERRETH J., EDING E.H., RAO G.R.M., HUSKENS F. ; SEGNER H. (1993) A review of feeding practices, growth and nutrition physiology in larvae of the catfishes *Clarias gariepinus* and *Clarias batrachus*. *Journal of World Aquaculture Society* 24: 135–144.

WANG C., XIE S., ZHENG K., ZHU X., LEI W., YANG Y. ; LIU J. (2005) Effects of live food and formulated diets on survival, growth and protein content of first feeding larvae of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 210-214.

WATANABE, T. (1982) Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73: 3–15.

WATANABE, W.O., ELLIS, S.C. ; CHAVES, J. (2001) Effects of dietary lipid and energy to protein ratio on growth and feed utilization of juvenile mutton snapper *Lutjanus analis* fed isonitrogenous diets at two temperatures. *J. World Aquac. Soc.* 32: 30-40.

WILLIAMS, W.D. (1985) Biotic adaptation in temporary lentic waters with special reference to those in arid and semiarid regions. *Hydrobiologia* 125: 85-110.

WILSON, R.P. (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124:67-80.

CONCLUSÕES GERAIS

- A eclosão ocorre em baixas proporções e é influenciada principalmente pela densidade de cistos presente no sedimento, tendo certa tolerância a diferentes níveis de temperatura e pH.
- O tempo médio para se atingir a idade adulta foi de dez dias e durante as fases iniciais.
- Alguns indivíduos apresentam eclosão tardia, o que ser um mecanismo preventivo da espécie contra condições impróprias de cheia da lagoa.
- Dentre as variáveis ambientais estudadas, temperatura e condutividade desempenham papel principal no crescimento durante os primeiros estágios de vida, juntamente com a alimentação, a qual deve ser fornecida a partir do terceiro dia.
- Em condições de cultivo semi-intensivo, grandes quantidades de alimento promovem maior crescimento em comprimento, tanto no verão quanto no inverno, contudo, durante o inverno, baixas quantidades de alimento conferem maior sobrevivência.
- Os indivíduos cultivados em regime com baixa quantidade de alimento apresentaram maior proporção de proteínas, valores estes maiores do que aqueles encontrados em *Artemia sp.* Também detectamos a presença de ácidos graxos poliinsaturados, que são de grande interesse em organismos a serem utilizados como alimento vivo para peixes.
- De modo geral, *D. brasiliensis* pode ser considerada uma espécie propícia ao uso na aquicultura, devido a: facilidade no manejo de cistos, uma vez que cistos presentes no sedimento são suficientes para obtenção de grandes populações;

alta taxa de crescimento e tolerância às variações ambientes, não exigindo grandes esforços na manutenção do meio de cultivo e; qualidade nutricional, com alta concentração de proteínas e presença de ácidos graxos poliinsaturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ATENCIO-GARCÍA, V.; ZANIBONI-FILHO, E.; PARDO-CARRASCO, S. & ARIAS-CASTELLANOS, A. 2003. Influência da primeira alimentação na larvicultura e alevinagem do yamú *Brycon siebenthalae* (Characidae). Acta Scientiarum. Animal Sciences, 25(1):61-72.

CRISPIM, M. C.; CAVALHEIRO, J. M. O. & PEREIRA, J. A. 1999. A influência do zooplâncton no crescimento de peixes em viveiros de aquacultura. ANAIS DO XI CONBEP E DO I CONLAEP. vol. 1. Recife, 17 a 21 de outubro de 1999. p. 78-87.

DABROWSKI, K. & GLOGOWSKI, J. 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. Hydrobiologia, v.54, p.129-134.

FEIDEN, A. & HAYASHI, C. 2005. Desenvolvimento de juvenis de Piracanjuba (*Brycon orbignyannus*), Valenciennes (1849) (Teleostei: Characidae) em tanques experimentais fertilizados com adubação orgânica. Semina: Ciências Agrárias, 26(4): 591-600.

FEIDEN, A., HAYASHI, C., BOSCOLO, W. R., 2006. Desenvolvimento de larvas de surubim-do-iguazu (*Steindachneridion melanodermatum*) submetidas a diferentes dietas. R. Bras. Zootec. vol.35 no.6 Viçosa Nov./Dec. 2006

GERKING, S.D. LARVAL FEEDING. IN: GERKING, S.D. (ED.) Feeding ecology of fish. London: Academic Press, 1994. p.139-170.

HERBERT, P.D.N. 1978 The population biology of *Daphnia* (Crustacea: Daphnidae). Biology Review, v.53, p.387-426.

IGARASHI, M. A.; ARAGÃO, L. P. & CARVALHO, M. C. de. 1999. Aspectos para o desenvolvimento da aqüicultura. ANAIS DO XI CONBEP E DO I CONLAEP. vol. 1. Recife, 17 a 21 de outubro de 1999. p. 127-136.

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

LAVENS, P. & SORGELOOS, P., 2000, *The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture*. Aquaculture 181: 397-403.

LINS, L.V.; A.B.M. MACHADO; C.M.R. COSTA & G. HERMANN 1997. Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial de fauna ameaçada de Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 55p.

LOPES, J. P. ; DA SILVA, A. L. N.; DOS SANTOS, A. J. G & TENÓRIO, R. A. 1998, *Branchoneta, uma notável contribuição à larvicultura e alevinagem de peixes carnívoros de água doce*. Panorama da aqüicultura nov/dez 1998: 31-34.

LOPES, M. C.; FREIRE, R. A. B.; VICENSOTTO, J. R. M.; SENHORINI, J. A. 1996. Alimentação de larvas de surubim pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829), em laboratório, na primeira semana de vida. Boletim Técnico CEPTA, Pirassununga, v. 9, p. 11-29.

LUZ, R. K.; SALARO, A. L.; SOUTO, E. F.; REIS, A. & SAKABE, R. 2001. Desenvolvimento de Alevinos de Trairão Alimentados com Dietas Artificiais em Tanques de Cultivo. Rev. Bras. Zootec. v.30 n.4.

MARCELINO, S. C.; OLIVEIRA, L. H. V. de; ANTONELLO, A. & SEVERI, W. 2000. Comparação da comunidade zooplancônica do açude Dois Irmãos e um viveiro da base de piscicultura da UFRPE. ANAIS DO X CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE, Recife, 27 a 30 de novembro, p. 259-260.

MOURA, M. A. M.; KUBITZA, F.; CYRINO, J. E. P. 2000. Feed training of peacock bass (*Cichla* sp.). Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, p. 645-654, 2000.

OLIVEIRA, A. K.; ALVIM, M. C. C.; PERET, A. C. and ALVES, C. B. M. 2004. Diet shifts related to body size of the pirambeba *Serrasalmus brandtii* Lütken, 1875 (Osteichthyes, Serrasalminae) in the Cajuru reservoir, São Francisco river basin, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 64(1): 117-124.

PESSOA, E. V. & KLEIN, V. L. M. 1999. Análise do valor protéico do rotífero *Brachionus plicatilis* submetido à diferentes dietas. ANAIS DO XI CONBEP E DO I CONLAEP. vol. 1. Recife, 17 a 21 de outubro de 1999. p. 262-269.

PEZZATO, L.E.O. 1997 estabelecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes cultivadas. *In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES*, 1997, Piracicaba. *Anais...*Piracicaba, p. 45-62.

SANTIAGO, A. P.; HOLANDA, F. C. A. F.; SOUZA, J. de A. & SILVA, L. A. C. da. 1999. Análise de investimento em aquicultura: um estudo de caso. ANAIS DO XI CONBEP E DO I CONLAEP. vol. 1. Recife, 17 a 21 de outubro de 1999. p. 30-39.

SATO, Y.; N. FENERICH-VERANI; A. P. O. NUÑER; H.P. GODINHO & J. R. VERANI. 2003. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco, p.229-274. *In: H.P. Godinho & A.L. Godinho (Orgs.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte, PUC Minas, 468p.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes. São Carlos: UFSCar, 1988. 191p (Tese).

SOUZA, P. C. G. & KLEIN, V. L. M. 1999. Velocidade de produção do rotífero *Brachionus plicatilis* em condições de laboratório. ANAIS DO XI CONBEP E DO I CONLAEP. vol. 1. Recife, 17 a 21 de outubro de 1999. p. 56-63.

VERRETH J., EDING E.H., RAO G.R.M., HUSKENS F. ; SEGNER H. (1993) A review of feeding practices, growth and nutrition physiology in larvae of the catfishes *Clarias gariepinus* and *Clarias batrachus*. Journal of World Aquaculture Society 24: 135–144.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L.2001.Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vancouver, v. 130, p. 477-478.

ZAVALA CAMIM, L.A. 1996. *Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes*. Maringá: Eduem.

ANEXOS

Capítulo 1

Tabela 1: Contagem de náuplios na densidade de 750 cistos do primeiro ensaio.

750	Náuplios				% total
	Contagem 21h	%	Contagem 24h	%	
1	167,00	22,27	24,00	4,32	26,59
2	107,00	14,27	25,00	4,05	18,31
3	151,00	20,13	16,00	2,87	23,00
4	215,00	28,67	15,00	2,96	31,63
5	138,00	18,40	20,00	3,39	21,79
6	144,00	19,20	20,00	3,82	23,02
Média	153,67	20,49	20,00	3,57	24,06
Variância	1292,67	22,98	16,40	0,35	23,33
D.P.	35,95	4,79	4,05	0,54	5,33

Tabela 2: Contagem de cistos na densidade de 750 cistos do primeiro ensaio.

Cistos				
Contagem 21h	%	Contagem 24h	%	% total
28,00	3,73	24,00	4,32	8,06
25,00	3,33	58,00	9,39	12,72
41,00	5,47	58,00	10,39	15,86
28,00	3,73	24,00	4,73	8,47
22,00	2,93	44,00	7,46	10,39
83,00	11,07	122,00	23,33	34,39
37,83	5,04	55,00	7,33	12,38
531,77	9,45	1310,00	48,91	58,36
23,06	3,07	36,19	6,99	10,07

Tabela 3: Contagem de náuplios na densidade de 1125 cistos do primeiro ensaio.

1125	Náuplios				% total
	Contagem 21h	%	Contagem 24h	%	
1	220,00	19,56	95,00	10,80	30,35
2	308,00	27,38	104,00	13,21	40,59
3	181,00	16,09	84,00	9,93	26,02
4	274,00	24,36	75,00	9,31	33,66
5	205,00	18,22	44,00	5,79	24,01
6	233,00	20,71	74,00	8,92	29,63
Média	236,83	21,05	79,33	9,66	30,71
Variância	2174,97	17,18	434,27	5,93	
D.P.	46,64	4,15	20,84	2,44	

Tabela 4: Contagem de cistos na densidade de 1125 cistos do primeiro ensaio.

Cistos			
Contagem 21h	%	Contagem 24h	%
25,00	2,22	38,00	4,32
30,00	2,67	74,00	9,40
98,00	8,71	71,00	8,39
45,00	4,00	79,00	9,80
160,00	14,22	119,00	15,66
62,00	5,51	96,00	11,57
70,00	6,22	79,50	9,86
2639,60	20,86	731,50	13,92
51,38	4,57	27,05	3,73

Tabela 5: Contagem de náuplios na densidade de 2250 cistos do primeiro ensaio.

2250	Náuplios				% total
	Contagem 21h	%	Contagem 24h	%	
1	79,00	3,51	50,00	2,56	6,07
2	170,00	7,56	64,00	3,52	11,07
3	149,00	6,62	55,00	2,93	9,55
4	123,00	5,47	55,00	3,21	8,67
5	97,00	4,31	37,00	1,92	6,23
6	226,00	10,04	49,00	2,93	12,97
Média	140,67	6,25	51,67	2,84	9,09
Variância	2846,67	5,62	79,87	0,31	
D.P.	53,35	2,37	8,94	0,55	

Tabela 6: Contagem de cistos na densidade de 1125 cistos do primeiro ensaio.

Cistos			
Contagem 21h	%	Contagem 24h	%
216,00	9,60	173,00	8,85
261,00	11,60	273,00	15,01
224,00	9,96	213,00	11,35
411,00	18,27	197,00	11,48
224,00	9,96	122,00	6,32
349,00	15,51	240,00	14,33
280,83	12,48	203,00	11,22
6529,37	12,90	2773,20	10,74
80,80	3,59	52,66	3,28

Tabela 7: Contagem de náuplios nos ensaio de reeclosão após 3 meses.

Há 3 meses		Atual		
Cistos não eclodidos	Nauplios eclodidos	Cistos iniciais	Nauplios	%
28	167	555,00	10	1,80
25	107	618,00	16	2,59
41	151	558,00	8	1,43
28	215	507,00	2	0,39
22	138	590,00	2	0,34
83	144	523,00	8	1,53
24	24	702,00	6	0,85
58	25	667,00	5	0,75
58	16	676,00	1	0,15
24	15	711,00	2	0,28
44	20	686,00	3	0,44
122	20	608,00	3	0,49

Tabela 8: Contagem de náuplios nos ensaio de reeclosão após 6 meses.

Há 6 meses		Atual		
Cistos não eclodidos	Nauplios eclodidos	Cistos iniciais	Nauplios	%
25,00	220,00	880,00	0,00	0,00
30,00	308,00	787,00	2,00	0,25
98,00	181,00	846,00	2,00	0,24

45,00	274,00	806,00	2,00	0,25
160,00	205,00	760,00	5,00	0,66
62,00	233,00	830,00	4,00	0,48
38,00	95,00	992,00	0,00	0,00
74,00	104,00	947,00	7,00	0,74
71,00	84,00	970,00	8,00	0,82
79,00	75,00	971,00	17,00	1,75
119,00	44,00	962,00	24,00	2,49
96,00	74,00	955,00	20,00	2,09

Tabela 9: Contagem de náuplios nos ensaio com tempo de desidratação de 3 meses.

Pote	3 meses	
	Náuplios	%
1	165	16,5
2	95	9,5
3	280	28
4	215	21,5
5	213	21,3
6	199	19,9
Média	194,5	19,45
Variância	3772,7	37,727
Desvio	61,42231	6,142231

Tabela 9: Contagem de náuplios nos ensaio com tempo de desidratação de 6 meses.

Pote	6 meses	
	Náuplios	%
1	126	12,6
2	273	27,3
3	240	24
4	102	10,2
5	90	9
6	213	21,3
Média	174	17,4
Variância	6044,4	60,444
Desvio	77,74574	7,774574

Tabela 10: Contagem de náuplios nos ensaio com tempo de desidratação de 9 meses.

Pote	9 meses	
	Náuplios	%
1	180	18
2	205	20,5
3	233	23,3
4	124	12,4
5	128	12,8
6	117	11,7
Média	172,5	16,45
Variância	3016,333	23,603
Desvio	54,92116	4,858292

Tabela 11: Contagem de náuplios nos ensaios de temperatura.

Pote	Temperatura		
	18°	25°	30°
1,00	235,00	242,00	173,00
2,00	104,00	261,00	274,00
3,00	84,00	224,00	213,00
4,00	179,00	411,00	197,00
5,00	119,00	224,00	122,00
6,00	196,00	280,00	240,00
Média	152,83	273,67	203,17
Variância	3513,37	4999,47	2801,37
Desvio padrão	59,27	70,71	52,93
	% eclosão		
	18°	25°	30°
1,00	23,50	24,20	17,30
2,00	10,40	26,10	27,40
3,00	8,40	22,40	21,30
4,00	17,90	41,10	19,70
5,00	11,90	22,40	12,20
6,00	19,60	28,00	24,00
Média	15,28	27,37	20,32

Tabela 12: Contagem de náuplios nos ensaios de pH.

Pote	pH				
	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00
1,00	177,00	269,00	304,00	194,00	154,00
2,00	203,00	228,00	214,00	149,00	238,00
3,00	109,00	119,00	224,00	219,00	301,00
4,00	288,00	376,00	315,00	170,00	194,00
5,00	81,00	332,00	270,00	134,00	118,00
6,00	186,00	411,00	229,00	217,00	182,00
Média	174,00	289,17	259,33	180,50	197,83
Variância	5372,80	11464,57	1886,27	1252,30	4163,37
Desvio padrão	73,30	107,07	43,43	35,39	64,52
	% eclosão				
	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00
	17,70	26,90	30,40	19,40	15,40
	20,30	22,80	21,40	14,90	23,80
	10,90	11,90	22,40	21,90	30,10
	28,80	37,60	31,50	17,00	19,40
	8,10	33,20	27,00	13,40	11,80
	18,60	41,10	22,90	21,70	18,20
Média	17,40	28,92	25,93	18,05	19,78
Variância	53,73	114,65	18,86	12,52	41,63
Desvio padrão	7,33	10,71	4,34	3,54	6,45

Capítulo 2

Tabelas 1: Variáveis ambientais em cada réplica nos diferentes meses estudados.

	jul/12			DP
Temp.	23,45	22,56	21,67	0,89
pH	6,58	6,78	6,98	0,20
Cond.	72,55	81,88	91,21	9,33
OD	6,75	6,96	7,17	0,21

	out/12			DP
Temp.	29,35	28,47	27,58	0,88
pH	5,79	5,95	6,10	0,16
Cond.	525,76	544,67	563,57	18,91
OD	7,21	7,35	7,48	0,14

	mai/13			DP
Temp.	23,90	24,60	25,30	0,70
pH	7,57	7,63	7,69	0,06
Cond.	75,90	79,52	83,14	3,62
OD	5,45	5,56	5,67	0,11

	jul/13			DP
Temp.	23,40	23,80	24,20	0,40
pH	7,90	7,98	8,06	0,08
Cond.	80,56	87,68	94,80	7,12
OD	6,43	6,78	7,13	0,35

	set/13			DP
Temp.	27,12	27,42	27,73	0,30
pH	6,83	6,99	7,14	0,16
Cond.	549,44	580,33	611,23	30,89
OD	7,83	7,99	8,16	0,16

	nov/13			DP
Temp.	30,90	30,90	32,30	0,81
pH	7,34	7,41	7,47	0,07
Cond.	428,43	442,00	455,57	13,57
OD	7,49	7,84	8,19	0,35

	dez/13			DP
Temp.	31,35	32,76	34,17	1,41
pH	6,14	6,18	6,21	0,04
Cond.	542,12	561,33	580,55	19,21
OD	6,95	7,04	7,12	0,09

Tabela 2: Contagem de náuplios nos com diferentes regimes alimentares nos estágios iniciais..

Densidade populacional sob diferentes regimes alimentares									
Dias	Alimentação inicial			Sem alimento			Alimentação alternada		
1	1390	1260	1410	1530	1300	1340	1350	1410	1420
2	348	479	183	1209	1079	1072	1080	1184	1108
3	209	311	101	1039	863	943	918	1019	886
4	156	230	81	852	716	802	734	764	797
5	125	200	69	597	466	609	676	688	686
6	113	176	62	388	317	408	642	639	665
7	96	141	59	271	238	278	610	614	632
8	82	110	42	217	178	217	591	602	600
9	71	99	38	163	160	184	580	571	540
10	64	94	35	147	144	177	562	549	530

Capítulo 3

Tabelas 1: Medidas de comprimento de *D. brasiliensis* ao longo do experimento com alto recurso alimentar nas diferentes réplicas durante o inverno.

jun/14							
Tratamento	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	10º dia	15º dia	20º dia
Alto Recurso	1	2	2	3	7	11	15
	2	1	1	4	7	12	16
	1	2	1	3	8	12	13
	1	2	1	4	5	13	14
	1	1	2	2	6	10	13
	2	2	1	3	5	12	12
	1	1	1	4	6	11	14
	1	1	2	2	7	10	11
	1	2	2	3	6	10	11
	1	2	2	4	5	11	12
Média	1,20	1,60	1,50	3,20	6,20	11,20	13,10
Desvio	0,42	0,52	0,53	0,79	1,03	1,03	1,66
Densidade	5	5	7	16	12	17	21

Tratamento	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	10º dia	15º dia	20º dia
------------	--------	--------	--------	--------	---------	---------	---------

	2	2	3	4	8	13	16
Alto Recurso	2	2	2	4	7	12	15
	1	2	2	3	7	11	17
	1	1	3	4	6	10	15
	1	1	1	2	6	10	13
	1	1	2	2	5	13	11
	1	1	1	3	5	11	12
	1	2	1	3	5	9	13
		1	1	2	6	9	13
		1	1	3	5	9	12
Média	1,25	1,40	1,70	3,00	6,00	10,70	13,70
Desvio	0,46	0,52	0,82	0,82	1,05	1,57	1,95
Densidade	3	6	8	13	12	15	17

Tabela 2: Medidas de comprimento de *D. brasiliensis* ao longo do experimento com alto recurso alimentar nas diferentes réplicas durante o verão.

		dez/14						
Tratamento	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	10º dia	15º dia	20º dia*	
		3	4	6	8	16	18	22
Alto Recurso		3	5	7	7	16	20	24
		2	3	5	8	17	18	16
		3	3	5	7	13	17	18
		3	5	7	7	13	17	19
		3	4	4	6	14	18	23
		2	3	6	6	15	19	16
		3	3	6	8	13	17	20
		3	3	6	6	14	20	21
		2	3	7	7	15	18	19
Média	2,70	3,60	5,90	7,00	14,60	18,20	19,80	
Desvio	0,48	0,84	0,99	0,82	1,43	1,14	2,74	
Densidade	12	16	30	39	78	66	62	

Tratamento	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	10º dia	15º dia	20º dia*	
		2	3	5	9	17	19	21
Alto Recurso		2	4	8	8	16	20	21
		2	3	7	8	16	20	20

	3	3	7	6	15	15	17
	3	4	6	7	14	16	22
	2	4	5	6	15	17	19
	3	4	4	7	16	18	18
	2	2	5	6	14	17	20
	2	3	4	7	13	16	20
	2	3	5	7	14	17	22
Média	2,30	3,30	5,60	7,10	15,00	17,50	20,00
Desvio	0,48	0,67	1,35	0,99	1,25	1,72	1,63
Densidade	10	18	22	45	62	64	51

Tabela 3: Medidas de comprimento de *D. brasiliensis* ao longo do experimento com baixo recurso alimentar nas diferentes réplicas durante o inverno.

Tratamento	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	10º dia	15º dia	20º dia*
	2	4	6	8	9	12	18
Baixo							
Recurso	3	3	6	5	10	16	17
	3	2	5	6	9	13	15
	2	2	7	5	8	13	15
	2	2	6	6	6	14	14
	2	5	6	8	7	12	17
	2	3	4	4	6	10	15
	2	3	5	5	8	11	14
	3	2	6	6	8	11	17
	2	4	5	5	9	10	12
Média	2,30	3,00	5,60	5,80	8,00	12,20	15,40
Desvio	0,48	1,05	0,84	1,32	1,33	1,87	1,84
Densidade	9	18	25	30	28	42	37

Tratamento	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	10º dia	15º dia	20º dia*
	3	4	5	6	9	14	18
Baixo							
Recurso	2	5	5	8	9	13	21
	2	3	6	7	11	12	15
	2	3	5	6	8	15	16

	3	4	7	5	8	13	14
	2	3	5	6	9	11	16
	2	2	6	5	7	9	15
	2	4	7	6	8	13	12
	2	5	5	6	6	12	12
	2	3	6	6	7	11	13
Média	2,20	3,60	5,70	6,10	8,20	12,30	15,20
Desvio	0,42	0,97	0,82	0,88	1,40	1,70	2,78
Densidade	13	21	19	27	34	35	28

Tabela 5: Resultados originais da análises bioquímicas para o cultivo em baixo recurso.

Substância	Resultado
Ácido Butírico	não detectado
Ácido Capróico	não detectado
Ácido Caprílico	não detectado
Ácido Cáprico	não detectado
Ácido Undecanóico	não detectado
Ácido Láurico	não detectado
Ácido Tridecanóico	não detectado
Ácido Mirístico	0,01
Ácido Miristoleico	0,01
Ácido Pentadecanóico	0,01
Ácido 10-Pentadecenóico	não detectado
Ácido Palmítico	0,17
Ácido Palmitoleico	0,01
Ácido Margárico	0,01
Ácido cis-10-Ácido Heptadecenóico	não detectado
Ácido Esteárico	0,07
Ácido Elaidico	não detectado
Ácido Oleico	0,05
Ácido Linolelaídico	0,01
Ácido Linoleico	0,03
Ácido Gama-Linolênico	não detectado
Ácido Alfa Linolenico LNA	0,03
Ácido Araquídico	0,01
Ácido Cis-11-Eicosenóico	não detectado
Ácido Heneicosanóico	não detectado
Ácido cis-11,14- Eicosadienóico	não detectado
Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	não detectado

Ácido Araquidônico AA	0,01
Ácido 11,14,17-Eicosatrienóico	não detectado
Ácido Behênico	0,01
Ácido Erúico	não detectado
Ácido 5,8,11,14,17- EPA	0,01
Ácido Tricosanóico	não detectado
Ácido 13,16-Docosadienóico	não detectado
Ácido Lignocérico (C24:0) 0,01 % MA-006	0,01
Ácido Nervônico (C24:1n9) NÃO DETECTADO % MA-006	não detectado
Ácido Docosa-hexaenóico DHA	não detectado
Gordura Monoinsaturada	0,07
Gordura Poli-insaturada	0,08
Gorduras Insaturadas	0,15
Gorduras Saturadas	0,29
Ômega 3	0,03
Gorduras Trans	0,01
Ômega 6	0,05
Ômega 9	0,05
Ácido Aspártico	0,15
Ácido Glutâmico	0,77
Serina	0,07
Glicina	0,35
Histidina	0,13
Taurina	0,03
Arginina	0,06
Treonina	0,06
Alanina	0,37
Prolina	0,28
Tirosina	0,09
Valina	0,24
Metionina	0,1
Cistina	0,03
Isoleucina	0,22
Leucina	0,46
Fenilalanina	0,23
Lisina	0,09
Triptofano	0,05
Soma dos Aminoácidos	3,78
Fucose	não detectado
Arabinose	não detectado
Ramnose	não detectado
Galactose	não detectado
Glicose Total	0,34

Xilose	não detectado
Manose	não detectado
Frutose Total	não detectado
Glicídios Totais	0,34
Proteína Bruta	5,1
Extrato Etéreo por Hidrólise Ácida	0,44
Energia Bruta	176,6

Tabela 6: Resultados originais da análises bioquímicas para o cultivo em baixo recurso.

Substância	Resultado
Ácido Butírico	não detectado
Ácido Butírico	não detectado
Ácido Capróico	não detectado
Ácido Caprílico	não detectado
Ácido Cáprico	não detectado
Ácido Undecanóico	não detectado
Ácido Láurico	não detectado
Ácido Tridecanóico	não detectado
Ácido Mirístico	0,01
Ácido Miristoleico	0,01
Ácido Pentadecanóico	0
Ácido 10-Pentadecenóico	não detectado
Ácido Palmítico	0,19
Ácido Palmitoleico	0,01
Ácido Margárico	0,01
Ácido cis-10-Ácido Heptadecenóico	não detectado
Ácido Esteárico	0,08
Ácido Elaidico	0
Ácido Oleico	0,08
Ácido Linolelaídico	0
Ácido Linoleico	0,03
Ácido Gama-Linolênico	não detectado
Ácido Alfa Linolenico LNA	0,02
Ácido Araquídico	0
Ácido Cis-11-Eicosenóico	0
Ácido Heneicosanóico	não detectado
Ácido cis-11,14- Eicosadienóico	não detectado
Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	não detectado
Ácido Araquidônico AA	0
Ácido 11,14,17-Eicosatrienóico	0
Ácido Behênico	0,01

Ácido Erúcico	não detectado
Ácido 5,8,11,14,17- EPA	0
Ácido Tricosanóico	não detectado
Ácido 13,16-Docosadienóico	não detectado
Ácido Lignocérico	0,01
Ácido Nervonico	não detectado
Ácido Docosaheptaenóico DHA	não detectado
Gordura Monoinsaturada	0,1
Gordura Poli-insaturada	0,06
Gorduras Insaturadas	0,16
Gorduras Saturadas	0,3
Ômega 3	0,03
Gorduras Trans	0
Ômega 6	0,03
Ômega 9	0,08
Ácido Aspartico	0,16
Ácido Glutâmico	0,55
Serina	0,08
Glicina	0,27
Histidina	0,14
Taurina	0,03
Arginina	0,1
Treonina	0,09
Alanina	0,35
Prolina	0,22
Tirosina	0,16
Valina	0,06
Metionina	0,02
Cistina	0,04
Isoleucina	0,19
Leucina	0,41
Fenilalanina	0,22
Lisina	0,13
Triptofano	0,05
Soma dos Aminoácidos	3,27
Fucose	não detectado
Arabinose	não detectado
Ramnose	não detectado
Galactose	não detectado
Glicose Total	0,14
Xilose	não detectado
Manose	não detectado
Frutose Total	não detectado

Glicídios Totais	0,14
Proteína Bruta	5,26
Extrato Etéreo por Hidrólise Ácida	0,46
Energia Bruta	272,49