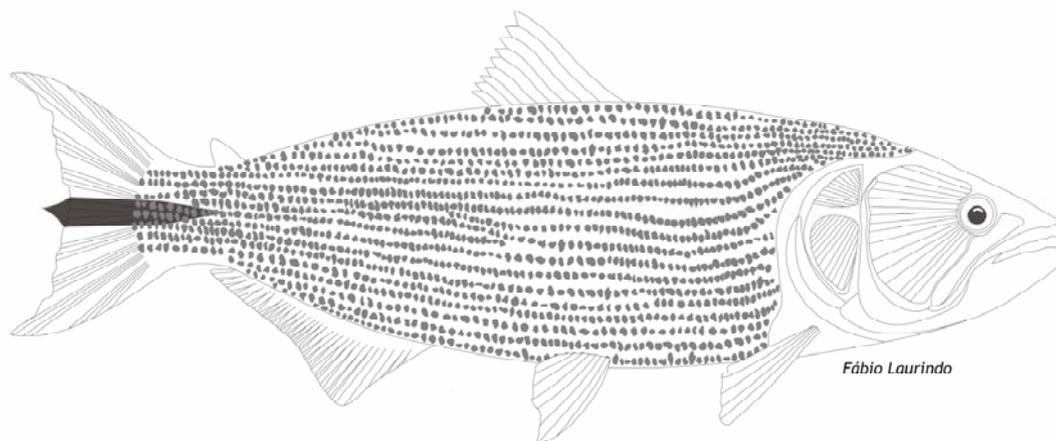




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS**

**ESTUDOS DA ONTOGENIA E DA ALIMENTAÇÃO INICIAL DE  
LARVAS DE PEIXES, COM ÊNFASE EM DOURADO *Salminus  
brasiliensis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

Mônica Giacometti Mai



**SÃO CARLOS  
2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS**

**ESTUDOS DA ONTOGENIA E DA ALIMENTAÇÃO INICIAL DE  
LARVAS DE PEIXES, COM ÊNFASE EM DOURADO *Salminus  
brasilensis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

Mônica Giacometti Mai

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.  
Orientador: José Roberto Verani  
Co-orientadora: Maria Célia Portella

**SÃO CARLOS  
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M217eo

Mai, Mônica Giacometti.

Estudos da ontogenia e da alimentação inicial de larvas de peixes, com ênfase em dourado *Salminus brasiliensis* (Characiformes, Characidae) / Mônica Giacometti Mai. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
97 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Peixe. 2. Desenvolvimento larval. 3. Órgãos dos sentidos. 4. Histologia. 5. Transição alimentar. 6. Radioisótopos. I. Título.

CDD: 597 (20<sup>a</sup>)

Mônica Giacometti Mai

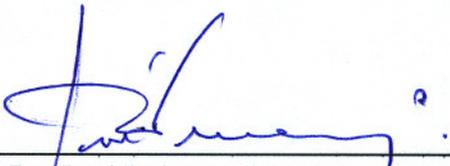
**ESTUDOS DA ONTOGENIA E DA ALIMENTAÇÃO INICIAL DE LARVAS DE PEIXES, COM ÊNFASE EM DOURADO *Salminus brasiliensis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

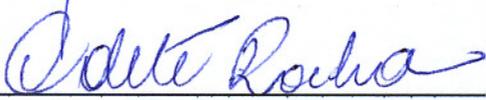
Aprovada em 12 de novembro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

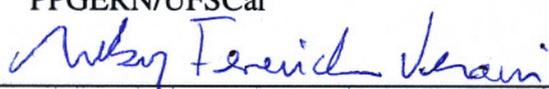
Presidente

  
Prof. Dr. José Roberto Verani  
(Orientador)

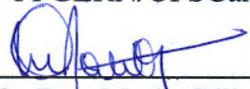
1º Examinador

  
Profa. Dra. Odete Rocha  
PPGERN/UFSCar

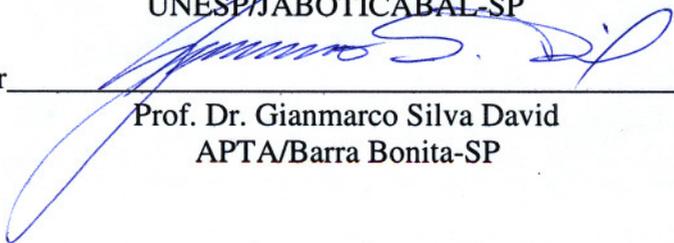
2º Examinador

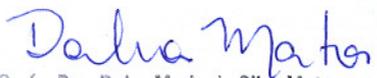
  
Profa. Dra. Nelsy Fenerich Verani  
PPGERN/UFSCar

3º Examinador

  
Profa. Dra. Maria Célia Portella  
UNESP/JABOTICABAL-SP

4º Examinador

  
Prof. Dr. Gianmarco Silva David  
APTA/Barra Bonita-SP

  
Profa. Dra. Dalva Maria da Silva Matos  
Coordenadora  
PPGERN/UFSCar

Dedico este trabalho à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento e finalização desta tese, especialmente:

- a meu orientador Prof. Dr. José Roberto Verani, não só pela orientação, mas também pela oportunidade, paciência, confiança e amizade desde o início;

- a minha co-orientadora Prof. Dra. Maria Célia Portella, do Centro de Aquicultura da UNESP/Jaboticabal, por sua orientação na área de aquicultura, por sua inestimável versatilidade, disposição e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

- ao meu co-orientador português Pesquisador Dr. Luís E.C. Conceição, pela boa vontade, paciência, amizade e por toda ajuda (não somente acadêmica) durante os 7 meses em Portugal, introduzindo-me na nutrição de larvas e cultivos marinhos, bem como na utilização das marcações radioativas dos alimentos em dietas.

- à Capes pela bolsa de estudos concedida, que permitiu minha completa dedicação nesses anos de doutorado;

- ao CNPq pela bolsa de Doutorado Sandwich concedida para os meses de treinamento na Universidade do Algarve – Portugal;

- ao Ministério de Ciência e Tecnologia e CNPq, que através de Edital Universal financiou o desenvolvimento deste trabalho e mais algumas complementações no estudo com dourado;

- aos amigos do Laboratório de Dinâmica de Populações da UFSCar e do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos da UNESP/Jaboticabal, pela ajuda na montagem dos experimentos, coleta de dados, análises, e acima de tudo pela amizade e incentivo, em especial ao Rodrigo Takata.

- ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da ESALQ-USP/Piracicaba, na pessoa do Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pelo curso de Microscopia de Varredura e por permitir o uso do MEV e preparações das amostras;

- aos amigos do Laboratório de Aquicultura da Universidade do Algarve/Portugal, por toda colaboração nos experimentos, pela amizade e paciência com a “brazuca”, e por todas as horas de reuniões e cafés em suas casas ou na “Baixa de Faro”;

- à Piscicultura Pirajuba (Porto Ferreira), nas pessoas queridas de Elizabeth Prada Foz e Daniel Junqueira, pelo fornecimento de larvas de peixe para os

experimentos e análises, pelas conversas boas e pela receptividade com que sempre me receberam;

- à Piscicultura Pirajuba Aqua Genética, nas pessoas de João Campos e Fernando Kubitza, pela continuidade na colaboração e apoio no fornecimento de larvas de peixes;

- aos amigos do Laboratório de Cultivo de peixes de Água Doce/UFSC por também enviarem larvas de peixe por avião para as tentativas, muitas vezes frustradas, de fazer experimentações com o dourado, pelos conselhos e incentivo desde a época do mestrado, principalmente ao Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho e MSc. Marcos Weingartner;

- aos colegas de Pós-Graduação, pela convivência, amizade, e principalmente pelas discussões sempre saudáveis;

- a minha preciosa família, que mesmo distante e sabendo das dificuldades de seguir na carreira acadêmica, sempre me apoiou incondicionalmente;

- a todas as pessoas com quem convivi nesses anos de República em São Carlos e Portugal, pela amizade, conselhos, incentivos e paciência nos dias difíceis.

- enfim, a todas as pessoas que com amizade e seriedade colaboraram para a realização deste trabalho, seja na parte experimental, analítica, correções, sugestões, logística (todos aqueles que abriram as portas de suas casas para me receber durante essas fases estão aqui lembrados).

Sou muitíssimo grata a todas essas pessoas.

"De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção, um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro..."

Fernando Pessoa

Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a Lua toda  
Brilha, porque alta vive.

*Ricardo Reis (Fernando Pessoa)*

## RESUMO

Foram realizadas amostragens em embriões e larvas de dourado *Salminus brasiliensis* desde as 6 horas após a fertilização (haf) até o 17º dia após fertilização (daf) com o intuito de estudar o desenvolvimento do sistema sensorial, por meio de microscopia eletrônica de varredura e o desenvolvimento estrutural e funcional do trato digestório por meio de análises histológicas e histoquímicas. Do sistema sensorial foram estudados: o desenvolvimento dos olhos, do órgão olfativo, dos mecanorreceptores cefálicos e da linha lateral, e os quimiorreceptores (botões gustativos). Foi observado que os olhos e as narinas se desenvolvem muito precocemente (a partir de 18 horas após a fertilização - haf), seguidos pelos mecanorreceptores cefálicos e das linhas laterais principal e acessória (48 haf), sendo esses tipos de recepção provavelmente os mais usados para alimentação durante essa fase inicial. As papilas gustativas mostraram desenvolvimento mais tardio em relação às outras estruturas sensoriais citadas, com poucas papilas distribuídas esparsamente na região bucofaríngea, sendo observadas primeiramente aos 8 dias após a fertilização. O desenvolvimento morfológico do sistema digestório foi descrito com base nas lâminas histológicas e a funcionalidade desse sistema foi analisada através de colorações histoquímicas. Com 18 haf, o canal alimentar foi observado acima do vitelo. Nessa fase também se constatou um grupo de células que formaria o fígado e o pâncreas. Às 24 haf verificou-se a formação do esôfago e da futura cavidade oro - branquial que, com 48 haf, ficou caracterizada como a boca e faringe. O esôfago e o esfíncter esofágico também se encontravam formados e o canal alimentar continuava como um tubo retilíneo. O reto, válvula ílio-retal e ânus já estavam presentes, assim como o fígado e o pâncreas estavam diferenciados, caracterizados pela observação dos hepatócitos e dos ácinos pancreáticos, respectivamente. Dentes foram observados às 72 haf, bem como dobras no revestimento do reto. Entre as 96 e 120 haf o fígado mostrou-se completamente formado, assim como o pâncreas. Paralelamente, ocorreu a formação e o aumento das dobras da mucosa de revestimento em todo o canal alimentar. A partir do 8º daf, o sistema digestório do dourado encontrava-se completamente formado, possivelmente apto a assimilar nutrientes de dieta formulada. Também foram realizados experimentos avaliando diferentes alimentos para a transição alimentar das larvas de dourado de alimento vivo à alimentação com dieta inerte, a fim de reduzir os custos durante a larvicultura. Os tratamentos com larvas forrageiras

de piau *Leporinus obtusidens* proporcionaram as maiores taxas de sobrevivência em comparação com os demais tratamentos. Coração bovino e biomassa de artêmia congelada induziram aos piores desempenhos, tanto em regime de co-alimentação, quanto em transição abrupta. Pode ser observado que artêmias vivas usadas no protocolo gradual ou em co-alimentação com ração e, mesmo a ração oferecida diretamente, produzem resultados de sobrevivência muito baixos ao final de 17 dias de experimento, sendo que para em um período curto de tempo, permitiram algum crescimento. Assim, uma dieta ideal não foi identificada para o dourado, especialmente no que tange à quantidade de dieta inerte oferecida, que evite altas concentrações de amônia ao mesmo tempo que atenda às necessidades nutricionais e sejam atrativas para esses peixes durante a larvicultura. O último experimento da tese relaciona-se com técnicas de marcações radioativas de alimentos com  $C^{14}$  para avaliar os efeitos da introdução precoce de dieta inerte na digestibilidade e metabolismo lipídico de larvas de peixes (com a utilização do linguado senegalense *Solea senegalensis*). Foram monitorados a ingestão de presas, o crescimento e a sobrevivência após a aplicação de um regime alimentar padrão com alimento vivo (ST) e um regime de co-alimentação com a substituição de artêmia por dieta inerte (Art R). Além disto, foram feitos testes usando artêmias enriquecidas com duas diferentes emulsões lipídicas, contendo glicerol tri  $[1-^{14}C]$  oleato (TAG) e L-3-fosfatidilcolina-1,2-di- $[1-^{14}C]$  oleoil (PL), aos 9 e 17 dias após a eclosão (DAE) para estudar a utilização de lipídios. A co-alimentação não afetou a taxa sobrevivência das larvas de linguado (ST  $59.1 \pm 15.9$  %; Art R  $69.56 \pm 9.3$  %), mas refletiu significativamente em menores pesos finais aos 16 DAE (ST  $0.71 \pm 0.20$ ; Art R  $0.48 \pm 0.14$  mg). Maiores taxas de ingestão de presas foram observadas em larvas de linguado alimentadas com artêmia enriquecida com PL marcada aos 9 DAE, mas não aos 17 DAE. Aos 17 DAE, as larvas menores (tratamento Art R) ingeriram proporcionalmente mais artêmias em percentagem de peso, independentemente do enriquecimento. Aos 9 DAE a digestibilidade lipídica foi igual entre os tratamentos e maiores que 90%, enquanto aos 17 DAE esta foi mais alta no tratamento ST (cerca de 73 %) comparado ao grupo Art R (cerca de 66 %). A retenção lipídica aos 9 DAE foi mais alta no tratamento Art R, alcançando valores de 50 %, enquanto esses valores quase duplicaram aos 17 DAE, acima de 80 % nos dois tratamentos sem diferenças significativas. Estes resultados sugerem que a co-alimentação de dieta viva e inerte desde a primeira alimentação em linguado senegalense tem um efeito

prejudicial em termos de crescimento e digestibilidade lipídica, mas não parece comprometer a utilização metabólica de lipídios.

## ABSTRACT

Samples were carried out on embryos and larvae of dourado *Salminus brasiliensis* from 6 hours after fertilization (haf) until the 17th day after fertilization (daf) in order to study the development of sensory system, by scanning electron microscopy, and on the structural and functional development of digestive tract by histological and histochemical analysis. From the sensory system were studied: the development of the eyes, the olfactory organ, the cephalic mechanoreceptors and the lateral line mechanoreceptors and chemoreceptors (taste buds). It was observed that the eyes and the nostrils develop very early (from 18 haf), followed by the cephalic mechanoreceptors and by the mechanoreceptors of the principal and secondary lateral line (48 haf). These types of senses are probably the most used for feeding during this initial phase. The taste buds showed a later development compared to the other sensorial structures cited, and were first observed sparsely distributed along the buccopharynx at 8 daf. The morphological development of the digestive system was described based on histological slides and its functionality was analyzed by histochemical staining. At 18 haf, the gut was observed dorsally to the yolk-sac. At this phase were also observed a group of cells that would form the liver and the pancreas. At 24 haf were verified the formation of oesophagus and the future orobranchial, which were characterized as mouth and pharynx at 48 haf. The oesophagus and the oesophagic sphincter were also defined and the gut remains as a straight tube at 48 haf. The rectum, ileo-rectal valve and anus were already present, as well as the liver and pancreas were differentiated, characterized by the hepatic cells and pancreatic acini, respectively. Teeth were observed at 72 haf, and folds were seen in the rectum epithelium. Between 96 and 120 haf the liver and pancreas showed complete development. In the same time, folds appeared and increased in number on the mucosal wall of the entire intestine. From the 8<sup>o</sup> daf, the digestive system was completely developed, possibly able to absorb the nutrients of a formulated diet. Experiments were also conducted in order to evaluate different feeds for weaning the dourado larvae from live feed onto inert diet, aiming at to reduce the costs during the larviculture. The treatment using piau *Leporinus obtusidens* as prey promoted the higher survival rates compared to the others. Bovine's heart and frozen artemia biomass induced to the worst performances in both co-feeding regime and in abrupt regime. Artemia used as live feed in both

regimes, and even inert diet offered directly, produced very low survival results along 17 days of trial, but at in a short term, could allow some growth. Therefore, an ideal diet was not identified to dourado, specially concerning to inert diet amount offered that avoid high concentrations of ammonium as the same time that reaches the nutritional requirements, being also attracting to these fish during the larviculture phase. A last experiment of this thesis is related to techniques for radioactive labeling of food with  $C^{14}$ , used for monitoring the effects of early introduction of inert diet in lipid digestibility and metabolism of sole *Solea senegalensis*. Larval feed intake, growth and survival were also monitored in larva reared on a standard live feed regime (ST) and co-feeding regime with inert diet (Art R). Trials using sole larvae fed with Artemia enriched with two different lipid emulsions, containing glycerol tri [ $^{1-14}C$ ] oleate (TAG) and L-3-phosphatidylcholine- $^{1,2}$ -di- $^{1-14}C$ ] oleoyl (PL), were performed at 9 and 17 days after hatching (DAH) to study lipid utilization. Co-feeding did not affect sole survival rates (ST  $59.1 \pm 15.9\%$ ; Art R  $69.56 \pm 9.3\%$ ), but was reflected in significantly smaller final weight at 16 DAH (ST  $0.71 \pm 0.20$ ; Art R  $0.48 \pm 0.14$  mg). Higher feed intake was observed in sole larvae fed on Artemia enriched with labeled PL at 9 DAH but not at 17 DAH. At 17 DAH, the smaller larvae (Art R treatment) ingested proportionally more Artemia in weight percentage, independently of enrichment. At 9 DAH lipid digestibility was equal among treatments and higher than 90%, while at 17 DAH it was higher in ST treatment (around 73%) compared to the Art R group (around 66%). Lipid retention efficiency at 9 DAH was higher in the Art R treatment, reaching values of 50%, while these values almost duplicated at 17 DAH, ranging up to 80% in both treatments without significant differences. These results show that co-feeding of live feed and inert diet from first-feeding in Senegalese sole has a toll in terms of growth and lipid digestibility but does not seem to compromise lipid metabolic utilization.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	12
<b>1 CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA SENSORIAL DO DOURADO (<i>SALMINUS BRASILIENSIS</i>).....</b>	<b>1</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	2
1.2 OBJETIVO .....	4
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	4
1.3.1 <i>Obtenção das larvas de dourado</i> .....	4
1.3.2 <i>Manejo das larvas e amostragens</i> .....	5
1.3.3 <i>Análises microscópicas</i> .....	6
1.3.4 <i>Resultados e Discussão</i> .....	6
1.4 CONCLUSÃO .....	16
1.5 AGRADECIMENTOS .....	17
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
<b>2 CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DO SISTEMA DIGESTÓRIO DE DOURADO (<i>SALMINUS BRASILIENSIS</i>) .....</b>	<b>20</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	22
2.2 OBJETIVOS .....	23
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
2.3.1 <i>Obtenção das larvas de dourado</i> .....	23
2.3.2 <i>Manejo das larvas e amostragens</i> .....	23
2.3.3 <i>Análises histológicas</i> .....	24
2.4 RESULTADOS.....	24
2.4.1 <i>Análises histológicas e histoquímicas</i> .....	24
2.5 DISCUSSÃO .....	38
2.6 CONCLUSÃO .....	41
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
<b>3 CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA TRANSIÇÃO ALIMENTAR PRECOCE EM DOURADO <i>SALMINUS BRASILIENSIS</i>.....</b>	<b>44</b>
EFEITOS DA TRANSIÇÃO ALIMENTAR PRECOCE DE DOURADO <i>SALMINUS BRASILIENSIS</i> – EXPERIMENTO PILOTO (2007) .....	45
3.1 INTRODUÇÃO .....	45
3.2 OBJETIVO .....	46

3.3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
3.3.1	<i>Obtenção e manejo das larvas de dourado</i> .....	46
3.3.2	<i>Delineamento experimental</i> .....	47
3.3.3	<i>Qualidade de água e biometrias</i> .....	48
3.3.4	<i>Análise Estatística</i> .....	48
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
3.4.1	<i>Sobrevivência</i> .....	49
3.4.2	<i>Sobrevivência após 5 dias de transição alimentar</i> .....	49
3.4.3	<i>Sobrevivência após uma semana com dieta comercial</i> .....	50
3.4.4	<i>Qualidade da água e biometrias</i> .....	50
3.5	CONCLUSÃO .....	52
3.6	AGRADECIMENTOS .....	53
EFEITOS DA TRANSIÇÃO ALIMENTAR PRECOCE DE DOURADO <i>SALMINUS BRASILIENSIS</i> – EXPERIMENTO DEFINITIVO (2008).....		
		54
3.1	INTRODUÇÃO .....	54
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
3.2.1	<i>Obtenção e manejo das larvas de dourado</i> .....	54
3.2.2	<i>Delineamento experimental</i> .....	54
3.2.3	<i>Qualidade de água e biometrias</i> .....	55
3.2.4	<i>Análise Estatística</i> .....	55
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
3.3.1	<i>Sobrevivência</i> .....	56
3.3.1.1	<i>Sobrevivência após 5 dias de transição alimentar</i> .....	56
3.3.1.2	<i>Sobrevivência após uma semana com dieta comercial</i> .....	57
3.3.2	<i>Qualidade da água e biometrias</i> .....	59
3.4	CONCLUSÃO .....	61
3.5	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS EXPERIMENTOS REALIZADOS DE TRANSIÇÃO ALIMENTAR DE DOURADO .....	61
3.6	AGRADECIMENTOS .....	62
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ANEXO I .....		64
ANEXO II .....		66
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 4 - CO-ALIMENTAÇÃO COM ALIMENTO VIVO E DIETA INERTE DESDE A PRIMEIRA ALIMENTAÇÃO AFETA A DIGESTIBILIDADE E RETENÇÃO DE LIPÍDIOS EM LARVAS DE LINGUADO SENEGALENSE (<i>SOLEA SENEGALENSIS</i>).....</b>	<b>68</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	71
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
4.2.1	<i>Cultivo larval</i> .....	73

4.2.2	<i>Regimes alimentares</i> .....	73
4.2.3	<i>Amostragens</i> .....	74
4.2.4	<i>Testes de metabolismo lipídico</i> .....	74
4.2.4.1	<i>Marcação da artêmia [<math>1-^{14}\text{C}</math>]</i> .....	74
4.2.4.2	<i>Teste Frio(Cold Chase) - preparo</i> .....	75
4.2.4.3	<i>Determinação da radiomarcção</i> .....	75
4.2.5	<i>Análises estatísticas</i> .....	77
4.3	RESULTADOS.....	77
4.3.1	<i>Crescimento e sobrevivência larval</i> .....	77
4.3.2	<i>Ingestão de presas</i> .....	77
4.3.3	<i>Digestibilidade e metabolismo larval</i> .....	78
4.4	DISCUSSÃO .....	79
4.4.1	<i>Co-alimentação com dieta inerte desde a primeira alimentação afeta o crescimento, mas não a sobrevivência larval</i> .....	79
4.4.2	<i>Fonte lipídica e marcação da artêmia</i> .....	80
4.4.3	<i>Enriquecimento de artêmia com fosfolipídios estimula a ingestão de presas por larvas de linguado senegalense</i> .....	81
4.4.4	<i>Estratégia de co-alimentação precoce afeta a capacidade digestiva de lipídios em larvas de linguado</i> .....	82
4.4.5	<i>Co-alimentação afeta a retenção e o catabolismo em larvas de linguado</i> .....	83
4.5	CONCLUSÃO .....	84
4.6	AGRADECIMENTOS .....	85
4.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
	ANEXOS .....	93

**1 CAPÍTULO 1 - Desenvolvimento do Sistema Sensorial do Dourado  
(*Salminus brasiliensis*)**

## DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA SENSORIAL DO DOURADO (*Salminus brasiliensis*)

Mônica Giacometti Mai <sup>1\*</sup>, Maria Célia Portella <sup>2</sup>, José Roberto Verani <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, Km 235, Cx. Postal 676, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista - Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14.884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

### Resumo

Visando gerar informações para melhor fundamentar a tecnologia de cultivo do dourado *Salminus brasiliensis*, uma espécie nativa de alto valor econômico, este estudo priorizou a caracterização do desenvolvimento das estruturas sensoriais relacionadas à busca e apreensão de alimentos e à relação presa-predador (considerando o hábito piscívoro e canibal) das larvas em sua fase inicial de crescimento. Observou-se que os olhos e as narinas foram as primeiras estruturas a se desenvolver, e muito rapidamente (a partir de 18 horas após a fertilização - haf), seguidos pelos mecanorreceptores cefálicos e das linhas laterais principal e acessória (48 haf), sendo esses tipos de recepção provavelmente os mais usados para alimentação durante essa fase inicial. As papilas gustativas mostraram desenvolvimento mais tardio em relação às outras estruturas sensoriais citadas, com poucas papilas distribuídas esparsamente na região bucofaríngea, sendo observadas primeiramente aos 8 dias após a fertilização. Não foram observados eletrorreceptores.

**Palavras-chave:** Desenvolvimento ontogenético, órgãos dos sentidos, mecanorreceptores, quimiorreceptores, botões gustativos, microscopia de varredura

### 1.1 Introdução

O dourado *Salminus brasiliensis* é um peixe de escamas e coloração dourada de reflexos avermelhados, com várias listras longitudinais irregulares ao

longo do corpo e uma mancha escura alongada na base da nadadeira caudal. É uma espécie piscívora de grande porte (que pode alcançar mais de 1 m de comprimento), que realiza migrações reprodutivas e utiliza sucessivamente os ambientes de várzea (planície de inundação) e o leito dos rios durante seu ciclo de vida (AGOSTINHO et al., 1997). Embora a biologia da espécie ainda seja pouco conhecida, resultados levantados por Vazzoler e colaboradores (VAZZOLER et al., 1997) indicam a utilização dos afluentes do rio Paraná à montante e à jusante da foz do rio Paranapanema para a realização de atividades reprodutivas (rios Ivinhema e Iguatemi no Mato Grosso do Sul e Piquiri e Ivaí no Paraná).

Nos últimos anos aumentaram as pesquisas voltadas ao desenvolvimento de sistemas de cultivo intensivos para algumas espécies nativas de importância comercial, como é o caso do dourado *Salminus brasiliensis*. Porém, a disponibilidade de larvas e alevinos, com boa qualidade e em quantidade, é considerada um gargalo para o sucesso da produção intensiva de peixes (PORTELLA et al., 2000).

O cultivo comercial de dourado ainda está pouco estabelecido, devido, principalmente, à baixa taxa de fertilização, ao hábito alimentar carnívoro desde as primeiras horas de vida, ao acentuado canibalismo e à inabilidade das larvas em aceitar de imediato as rações artificiais convencionais, obrigando a utilização de alimento natural. Todos estes fatores dificultam a produção do dourado em larga escala (WOYNAROVICH e SATO, 1989; KUBITZA, 1995; ZANIBONI FILHO, 1997), sendo que o desenvolvimento de estratégias que reduzam as perdas na larvicultura poderá criar novas perspectivas para o cultivo intensivo desta espécie.

Dessa forma, é necessário o conhecimento das estruturas sensoriais e a compreensão do comportamento larval, particularmente o alimentar mediado por essas estruturas, para o estabelecimento de uma dieta apropriada e seu uso efetivo. Sem a adequada interação, qualquer dieta tornar-se-á insatisfatória (APPELBAUM e RIEHL, 1997).

Um passo extremamente importante para a maioria das espécies de peixes é o desenvolvimento da visão. Este sistema permite que o indivíduo detecte e capture presas, bem como evite se tornar presa de outros (EASTER e NICOLA, 1996), assim como serve para receber informações sobre objetos próximos da superfície e/ ou dentro da água (GUTHRIE e MUNTZ, 1993).

KOTRSCHAL (2000) em uma revisão sobre o olfato e o paladar, relata que existem 3 sistemas quimiossensoriais em peixes: o olfato, o paladar (dividido em dois subsistemas: os botões gustativos e as células quimiossensoriais isoladas) e o senso químico comum, baseado em terminações livres de nervos epidérmicos. Os botões gustativos são considerados os responsáveis pelo espectro de estímulo relacionado à alimentação, principalmente pela detecção de aminoácidos, bem como por estímulo táctil. As células quimiossensoriais isoladas respondem a um espectro mais restrito de estímulos, principalmente a compostos biliares, mas não a estímulos tácteis. Já o sistema olfatório é sensível tanto para a procura de alimentos, com a discriminação de diversos aminoácidos, como pode ter seu papel em interações inter e intraespecíficas, juntamente com as células quimiossensoriais isoladas.

HANSEN e ZIELINSKI (2005) consideram o sistema olfatório um dos mais cruciais nos peixes, e relatam que este sistema pode ter funções que vão desde encontrar alimentos, até detectar parceiros sociais e sexuais, além de evitar predadores e outras situações de perigo para esses animais. Sendo assim, esse sistema responde a diversas moléculas dispersas no meio aquático, que incluem aminoácidos, ácidos biliares, peptídeos, ácidos nucléicos e componentes esteróides.

Por sua vez, a mecanorrecepção nos peixes está relacionada com a detecção de movimentos e diferenças de pressão na água circundante (BLECKMANN, 1993), que são captadas por estruturas denominadas neuromastos. Esses últimos podem estar distribuídos na linha lateral ou em canais ou linhas sensoriais acessórias na cabeça (WEBB e SHIREY, 2003; CESTAROLLI, 2005).

## **1.2 Objetivo**

Este trabalho teve o objetivo de estudar o desenvolvimento morfológico de larvas de dourado *Salminus brasiliensis* durante seu desenvolvimento inicial, com ênfase no sistema sensorial.

## **1.3 Materiais e Métodos**

### **1.3.1 Obtenção das larvas de dourado**

As larvas de dourado *Salminus brasiliensis* foram obtidas por reprodução induzida na piscicultura comercial Pirajuba Aquicultura localizada do município de Porto Ferreira – SP. Utilizou-se a proporção de dois machos para cada fêmea, sendo que os ovos e larvas utilizados foram provenientes da mesma desova.

### 1.3.2 Manejo das larvas e amostragens

Os ovos (e posteriormente as larvas recém eclodidas) de dourado permaneceram em incubadoras na piscicultura, sendo recolhidas amostras 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a fertilização (haf). Depois disso, o intervalo de coletas passou a ser de 3 dias, ocorrendo no 8<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> dias após a fertilização. Da quantidade total de ovos e larvas obtidos com a reprodução foram amostrados no mínimo 30 ovos e larvas em cada horário estabelecido a fim de garantir número suficiente de indivíduos para a visualização dos estágios do desenvolvimento dos órgãos sensoriais. Após 24 horas da fertilização, as larvas foram transferidas para o Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Aquicultura da UNESP/ Jaboticabal, onde permaneceram em tanques com volume de 180 litros (Fig. 1 A e B) até o fim das coletas.

Os animais foram alimentados durante todo o período de amostragem com larvas de piau (*Leporinus obtusidens*) e biomassa de artêmia para sua manutenção. Os tanques foram mantidos sob aeração e fluxo de água constantes, sendo que o fundo dos mesmos foi sifonado diariamente para a retirada dos resíduos alimentares.

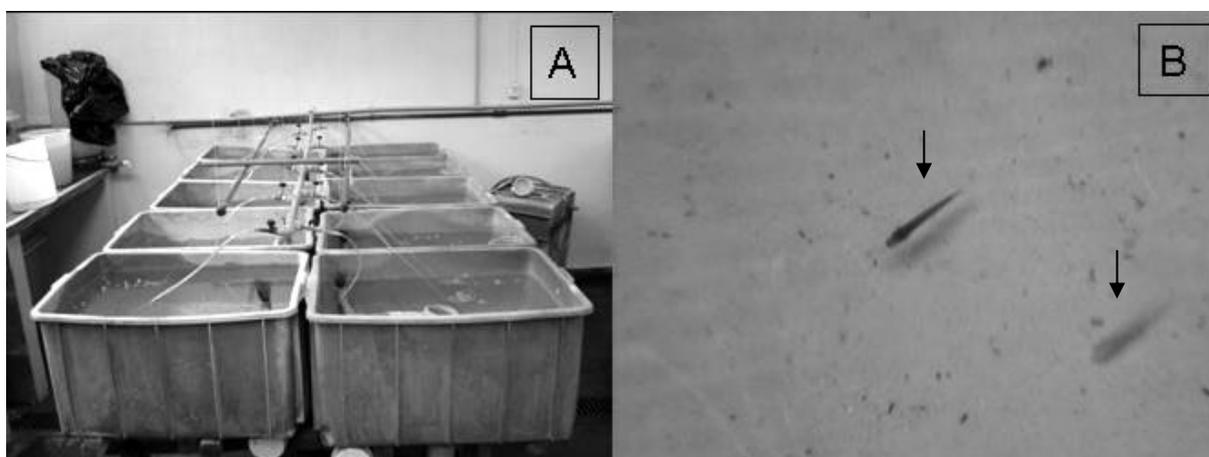


Figura 1 A) Unidades experimentais do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LNOA) do Centro de Aqüicultura da UNESP; B) Larva pigmentada e larva albina de dourado *S. brasiliensis* dentro do tanque de cultivo.

### 1.3.3 Análises microscópicas

Para o estudo do desenvolvimento das estruturas sensoriais foi empregada a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP, campus de Piracicaba. Os embriões e larvas coletados foram imediatamente fixados em solução de MacDowell. Os embriões foram cuidadosamente liberados do interior dos ovos pela ruptura e remoção do cório. Em seguida, os embriões e larvas foram desidratados em série (30%, 50%, 70%, 90% e três banhos de 100%, 20 minutos em cada concentração) de álcool etílico ou de acetona. Das duas substâncias utilizadas na desidratação das amostras, verificou-se que a série de acetona permitiu a melhor preservação das formas, quando comparadas com a série de álcool etílico, que provocou rachaduras e distorções dos espécimes, dificultando a análise. Posteriormente, os espécimes foram secos em secador de ponto crítico CPD 050 da marca Balzers, montados sobre suporte de latão com fita adesiva de face dupla e recobertos com uma fina camada de ouro (cerca de 35nm), em equipamento apropriado (metalizador MED 010 da marca Balzers). Após esses procedimentos, os espécimes foram examinados e fotomicrografados em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 940 A).

### 1.3.4 Resultados e Discussão

O desenvolvimento dos embriões de dourado ocorreu muito rapidamente, sendo que 12 horas após a fertilização já podiam ser observados miômeros na região dorsal e, apesar do tubo neural não estar completamente fechado na região cefálica, já se podia identificar o esboço da abertura bucal (Figura 2A). A tabela 1 resume as transformações morfológicas gerais e do sistema sensorial durante o período entre a fertilização dos ovos e os 17 dias após a fertilização de dourado *S. brasiliensis*.

As dezoito haf todas as larvas já haviam eclodido, podendo notar-se o

desenvolvimento do órgão olfatório em forma de uma pequena placa anterior com células receptoras ciliadas e células receptoras com micro vilosidades, bem como o aparecimento da abertura da câmara branquial (Figura 2B), que ficou mais evidente às 24 horas, com a exposição de três arcos branquiais. CLAVIJO-AYALA (2008), quando descreve o rápido desenvolvimento da larva de pacu *Piaractus mesopotamicus*, pontua que ao se esgotarem rapidamente as reservas vitelinas e por viverem em ambiente com risco de predação, é essencial que as larvas deste peixe desenvolvam rapidamente suas estruturas alimentares, sensoriais e locomotoras, a fim de que as larvas consigam garantir sua sobrevivência. Neste trabalho, o autor relata que às 17 h af se iniciou a diferenciação das vesículas olfatórias, sendo que às 19 h af foi possível identificar células receptoras ciliadas e células receptoras com micro vilosidades.

Às 24 horas após a fertilização a abertura bucal já havia ocorrido e também era possível a observação da vesícula óptica (Figura 2C). Isto concorda com o descrito nas análises histológicas da retina e acuidade em larvas de dourado às 24 horas após a eclosão, em que foram observadas as vesículas ópticas em formação, com as camadas de neurônios da retina não totalmente delimitadas e pigmentação incompleta da retina (BERNAL-SANCHEZ, 2006). Até esta fase o dourado tem um desenvolvimento similar ao descrito para o pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (CESTAROLLI, 2005). Porém, a partir das primeiras 24h de fertilização deste bagre, começa o desenvolvimento das papilas gustativas nos lábios e barbilhões que apresentam um crescimento acelerado nesta espécie, além do desenvolvimento dos receptores elétricos e mecânicos em detrimento do desenvolvimento dos olhos. No caso do pacu, CLAVIJO-AYALA (2008) relata que às 10 horas após a fertilização é possível reconhecer as vesículas ópticas, e que após as 16 horas diferencia-se o cristalino. Aos 3 dias após a eclosão, o pacu apresenta os olhos totalmente pigmentados.

Tabela 1. Morfologia geral e desenvolvimento do sistema sensorial em dourado *Salminus brasiliensis*:

<b>Período</b>	<b>Amostragem</b>	<b>Descrição</b>
Embrionário	6 haf	Definição do pólo animal e vegetativo do embrião, com epibolia da blastoderme sobre o vitelo.
	12 haf	Tube neural com fechamento incompleto; presença de miômeros na região dorsal; esboço da abertura bucal.
	18 haf *	Abertura da câmara branquial; placa olfatória presente, com células receptoras ciliadas e células receptoras com micro vilosidades; presença de muitos feixes ciliares não sensoriais na placa olfatória.
Larval	24 haf (1º daf)	Abertura bucal presente; câmara branquial apresenta 3 raios branquiais; início do desenvolvimento do órgão adesivo; nadadeira primordial envolvendo a larva, sem nadadeiras independentes.
	48 haf (2º daf)	Presença de dentes na boca; vesículas ópticas desenvolvidas; neuromastos livres ao redor dos olhos, nas linhas laterais principal e acessória, nos futuros canais mandibulares, operculares e supra-orbitais; diferenciação das nadadeiras pares; órgão adesivo completamente desenvolvido; nadadeiras peitorais arredondadas; epiderme com aspecto digitiforme.
	72 haf (3º daf)	Desenvolvimento da membrana branquiostegial sobre os arcos branquiais, que apresentam brânquias melhor desenvolvidas; nadadeiras dorsal e anal visíveis, com regressão contínua da nadadeira primordial; regressão completa do órgão adesivo; narina se aprofunda e se alonga Antero posteriormente; canais mandibulares ainda fechados.
	96 haf (4º daf)	
	120 haf (5º daf)	
	8º daf	Aproximação da parte medial da narina, iniciando o formato de 8; botões gustativos presentes próximos aos dentes e lábios.
	11º daf	Abertura dos canais mandibulares; botões gustativos bem evidentes; canais supra-orbitários em desenvolvimento, recobrimdo os neuromastos.
	14º daf	Narina dividida em 2 partes; nadadeiras completamente separadas e começando a apresentar raios; canais supra-orbitários, mandibulares e operculares presentes.
17º daf	Início do surgimento de escamas; lamelas presentes na narina posterior; linha lateral completando o desenvolvimento, mas ainda sem cobertura de escamas.	

\* as larvas já estavam eclodidas até as 18 horas com temperatura da água a  $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , mas foram colocadas na fase embrionária devido ao intervalo entre as amostragens de 12 e 18 horas. haf: horas após a fertilização; daf: dias após a fertilização.

No dourado as nadadeiras pares não se diferenciaram antes de 48h, porém as demais nadadeiras apareciam conectadas pela membrana primordial ou nadadeira embrionária. Esta espécie apresenta órgão adesivo na parte rostral da cabeça da larva, sendo que às 48 horas (segundo dia após a fertilização) esse se apresentava completamente desenvolvido (Figura 2D). Este tipo de estrutura também pode ser encontrado em outras espécies de Characidae, como relatado por SATO et al. (2006) para *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) e *Tetragonopterus chalceus* Spix & Agassiz, 1829, sendo que estes autores afirmam que a sua finalidade é permitir a fixação dessas larvas, principalmente em vegetais.

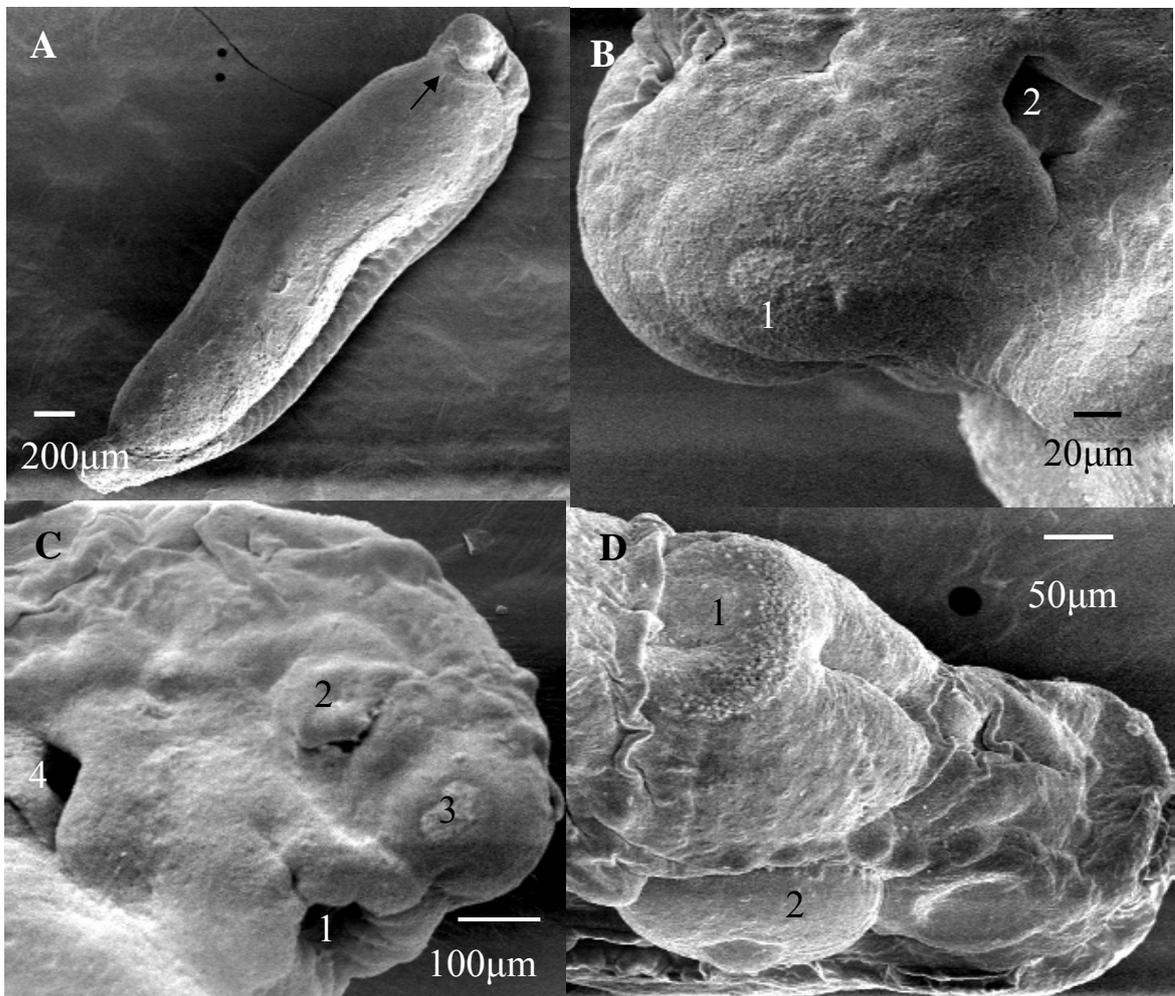


Figura 2 A - Embrião com 12 h após fertilização, a seta indica o esboço da abertura bucal; B – Larva com 18 h após fertilização, 1 indica a placa do órgão olfatório em desenvolvimento e 2 a abertura da câmara branquial; C – Larva com 24 horas, 1 indica a abertura bucal, 2 a vesícula óptica, 3 a placa do órgão olfatório e 4 a abertura branquial, com 3 rastros branquiais; D – Larva com 2 dias de vida, 1 indica o órgão adesivo da cabeça e 2, o olho.

No segundo dia de vida (48h), os olhos já estavam bastante

desenvolvidos, foi registrada a presença de dentes (Figura 3A) na boca, que já apresentava ampla abertura. Nesta fase foram detectadas as primeiras respostas optocinéticas positivas no estudo da acuidade visual em larvas de dourado, quando os olhos estavam completamente visíveis e as retinas bem pigmentadas, as diferentes camadas da retina já estavam definidas e o nervo óptico bem caracterizado (BERNAL-SANCHEZ, 2006).

Não há relato de formação de cardume durante a fase larval do desenvolvimento do dourado, independente das densidades de larvas utilizadas. Porém, este evento, conhecido como “schooling”, ocorre em juvenis quando os mesmos são agregados em mais altas densidades nas unidades de cultivo (MACHADO, 2004). Este é um comportamento mediado pela visão que se faz importante em cultivos desta espécie, uma vez que diminui os eventos de dominância e agressividade nesta etapa de crescimento. A capacidade visual das larvas de dourado melhora rapidamente nos primeiros doze dias após eclosão, sendo este desenvolvimento importante, mas não fundamental para a detecção e captura de presas (BERNAL-SANCHEZ, 2006). Esta autora ressalta ainda a probabilidade de que a larva de dourado utilize os outros sentidos conjuntamente para a localização e captura do alimento. De fato, os resultados desse estudo mostraram que no início da vida da larva de dourado há um desenvolvimento precoce do sistema olfatório, auxiliando na captura das presas entre outras atividades necessárias à vida deste peixe, corroborando a hipótese daquela autora.

Ainda às 48 haf, as placas sensoriais do órgão olfativo mostravam muitos feixes ciliares das células não sensoriais e células sensoriais menores espalhadas entre as primeiras (Figuras 3B e 3C). O tipo de estrutura do epitélio sensorial foi estudado em muitos teleósteos por YAMAMOTO (1982), o que resultou em uma descrição mais acurada desse tecido. Além das células sensoriais ciliadas, outras categorias foram reconhecidas: as células ciliadas não sensoriais, as células receptoras com micro vilosidades e as células bastão ("rod cells"). Este autor pontua que as células sensoriais ciliadas e com micro vilosidades são realmente as células receptoras olfativas dos teleósteos, e ademais da região sensorial, o epitélio olfativo apresenta também uma zona indiferente.

Com base em uma extensa pesquisa com teleósteos, Yamamoto e Ueda (YAMAMOTO, 1982) distinguiram quatro tipos de padrões de distribuição no

arranjo entre essas duas regiões epiteliais. No tipo I o epitélio sensorial é contínuo, com zonas marginais de epitélio indiferente; no tipo II, o epitélio sensorial é separado em grandes áreas por faixas de epitélio indiferente; no III, os dois tecidos formam regiões irregularmente distribuídas, enquanto que no tipo IV o epitélio sensorial está disperso em discretas ilhotas circundadas por tecido indiferente. Considerando essas duas características, ou seja, os padrões de distribuição e a densidade de cílios, Yamamoto e Ueda (YAMAMOTO, 1982) verificaram que aquelas espécies convencionalmente agrupadas como detentoras de grande acuidade olfativa apresentam área sensorial contínua (tipo I ou II) e cílios não sensoriais densamente arranjados, enquanto que aquelas que se acredita sejam essencialmente predadoras visuais apresentam área sensorial dispersa (tipo III ou IV) com cílios não sensoriais esparsos ou ausentes. Sendo assim, observando-se o padrão profuso de feixes de células não sensoriais circundando as células sensoriais da placa olfativa de dourado (Figura 3 C), infere-se que este peixe se encaixa na definição das espécies com grande acuidade olfativa.

Nos teleósteos, o olfato parece atuar como o mediador geral dos sinais químicos envolvidos em vários comportamentos como seleção de habitats, migração, cuidados parentais e prevenção a predadores (HARA, 1971), e o paladar parece estar envolvido nas fases do comportamento alimentar de busca e ingestão do alimento (NOAKES e GODIN, 1988). TANAKA et al. (1991) ressaltam que larvas de *Pagrus major* já ao eclodirem apresentam células receptoras arranjadas radialmente às narinas e, antes mesmo de começarem a se alimentar, possivelmente já conseguem detectar quimicamente e permanecer próximo ao local onde está concentrada a fonte de alimento, o que pode ser uma estratégia eficiente na sobrevivência e crescimento dessas larvas, uma vez que esta habilidade pode contribuir para reduzir o gasto de energia para a alimentação.

Na região ao redor do olho foram identificados neuromastos livres (Figura 3A e B) às 48 haf. O epitélio já apresentava aspecto digitiforme característico e neuromastos livres distribuíam-se desde a cabeça até a cauda em intervalos bastante regulares, onde posteriormente se formaram as linhas laterais principal e a acessória (Figura 3D), além dos canais supra-orbitais, operculares e mandibulares. O sistema mecanossensorial dos peixes teleósteos consiste estruturalmente do ouvido interno e de um conjunto de canais sub-superficiais cheios de líquido, o

sistema da linha lateral, ao longo do tronco e da cabeça, os quais se comunicam com a superfície por meio de uma série de poros. Os principais receptores de estímulos externos vibratórios e gravitacionais, associados a esse sistema, são as células mecanorreceptoras ciliadas do neuromasto (BLAXTER, 1986; BLECKMANN, 1993; NOAKES e GODIN, 1988). Essas células são inervadas por neurônios que compõem uma série bem definida de nervos da linha lateral. O nervo cranial anterior da linha lateral inerva os neuromastos localizados acima e abaixo do olho, nas faces, nas séries operculares e mandibulares; o nervo mediano, os neuromastos da região caudal do crânio, enquanto que o nervo posterior da linha lateral inerva outro conjunto de neuromastos na porção caudal do crânio e aqueles do tronco (WEBB, 2000).

O aparecimento dos neuromastos nas larvas permite a detecção de movimentos mínimos na água, isto é, medir a distribuição da pressão e a velocidade da água circundante. Sendo assim, pode ser utilizado pelas larvas na hora da detecção da presa. No estudo de captura de presas em diferentes intensidades de luz por larvas de dourado, BERNAL-SANCHEZ (2006) observou que a visão não é o único sentido usado pelas larvas na procura do alimento, pois em baixas intensidades de luz, onde a visão não seria funcional, as larvas ainda são capazes de capturar presas. De forma similar, MUKAI (2006) constatou que larvas de *Gnathopogon elongatus caerulescens* também são aptas a encontrar suas presas em ambiente totalmente escuro, porém quando as larvas são tratadas com estreptomicina - que impede o funcionamento dos neuromastos, e colocadas em ambiente escuro, as larvas tornam-se incapazes de encontrar as presas, revelando o papel dos neuromastos livres na localização das presas. No mesmo estudo, MUKAI ainda destacou que larvas tratadas com estreptomicina e postas a se alimentar em ambiente iluminado são capazes de detectar suas presas utilizando a visão.

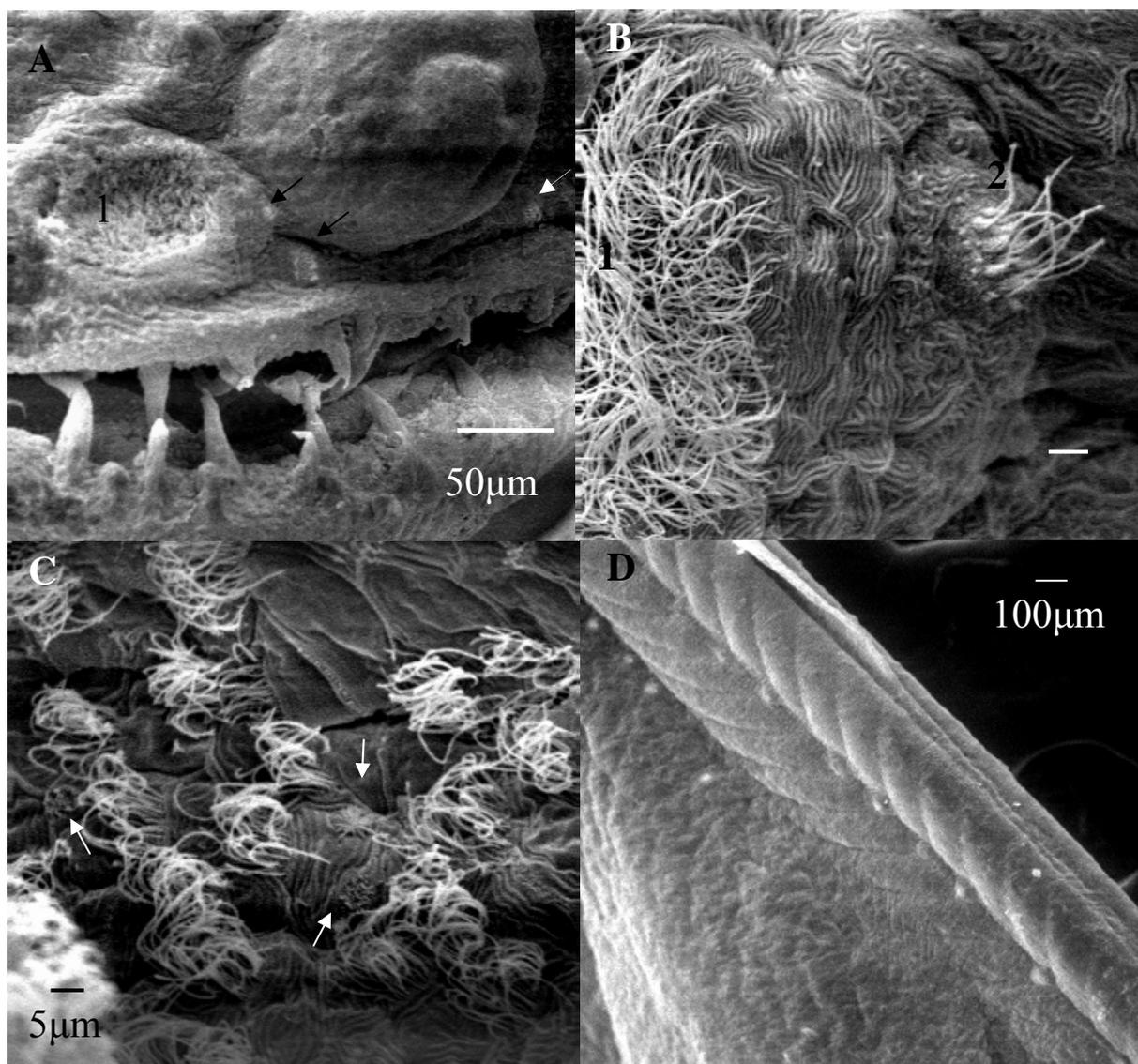


Figura 3 A – Larva com 48 haf, 1 mostra a depressão da narina, a boca está largamente aberta e as setas indicam neuromastos ao redor do olho; B – Detalhe da larva com 48 haf, 1 mostra as células ciliadas do órgão olfatório e 2 um neuromasto com um quinocílio longo e vários estereocílios mais curtos na base; C – Placa do órgão olfatório mostrando feixes de células ciliares não sensoriais e setas indicando as células sensoriais menores; D – Linha lateral principal e a acessória que se estende da cabeça em direção a cauda.

Do terceiro ao quinto de vida ocorreu o início do desenvolvimento da membrana branquiostegial sobre os arcos branquiais (Figura 4A), o aparecimento das nadadeiras peitorais e separação da dorsal, além da regressão completa do órgão adesivo. Ainda no quinto dia, foi notado que a nadadeira anal havia se separado da membrana primordial, os poros do canal mandibular ainda estavam fechados e só começam a abrir no décimo primeiro dia (Figuras 4B, C).

No oitavo dia, a narina estava distendida ântero-posteriormente e começava a se aproximar na parte mediana, dando início a uma forma de número 8.

Isto está de acordo com a revisão realizada por CESTAROLLI (2005), na qual o autor relata que com o avanço do desenvolvimento ontogenético do pintado, a depressão olfativa torna-se mais larga e profunda, sendo que cada depressão forma uma câmara onde a aproximação, e depois a fusão das bordas epiteliais externas, define um par de orifícios com formato de “número 8”, que constitui as narinas anteriores e posteriores. Este tipo de formação das narinas é comum em teleósteos (APPELBAUM e RIEHL, 1997; IWAI, 1980; MANA e KAWAMURA, 2002), porém, no caso de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*, até os 25 dias após a eclosão CLAVIJO-AYALA (2008) relata que não foi possível observar a formação de narina anterior e posterior, nem de lamelas nas narinas, apesar disto ocorrer posteriormente, já que os adultos desta espécie demonstram este padrão morfológico.

Ainda no 8º dia foram notados botões gustativos próximos aos dentes e lábios, porém restritos esta região e bem mais visíveis no décimo quarto dia (Figura 4D). O desenvolvimento do paladar não é muito grande em larvas de dourado, além de também ser bastante tardio em comparação com o de diversos bagres, como por exemplo, o pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (CESTAROLLI, 2005) e *Pangasianodon hypophthalmus* (MUKAI et al. 2010). As larvas deste último, aos 2 dias de vida, são capazes de se alimentar de artêmia congelada (inerte) em condição de escuro, revelando toda uma estratégia diferenciada de busca e alimentação no escuro, podendo assim evitar predadores diurnos.

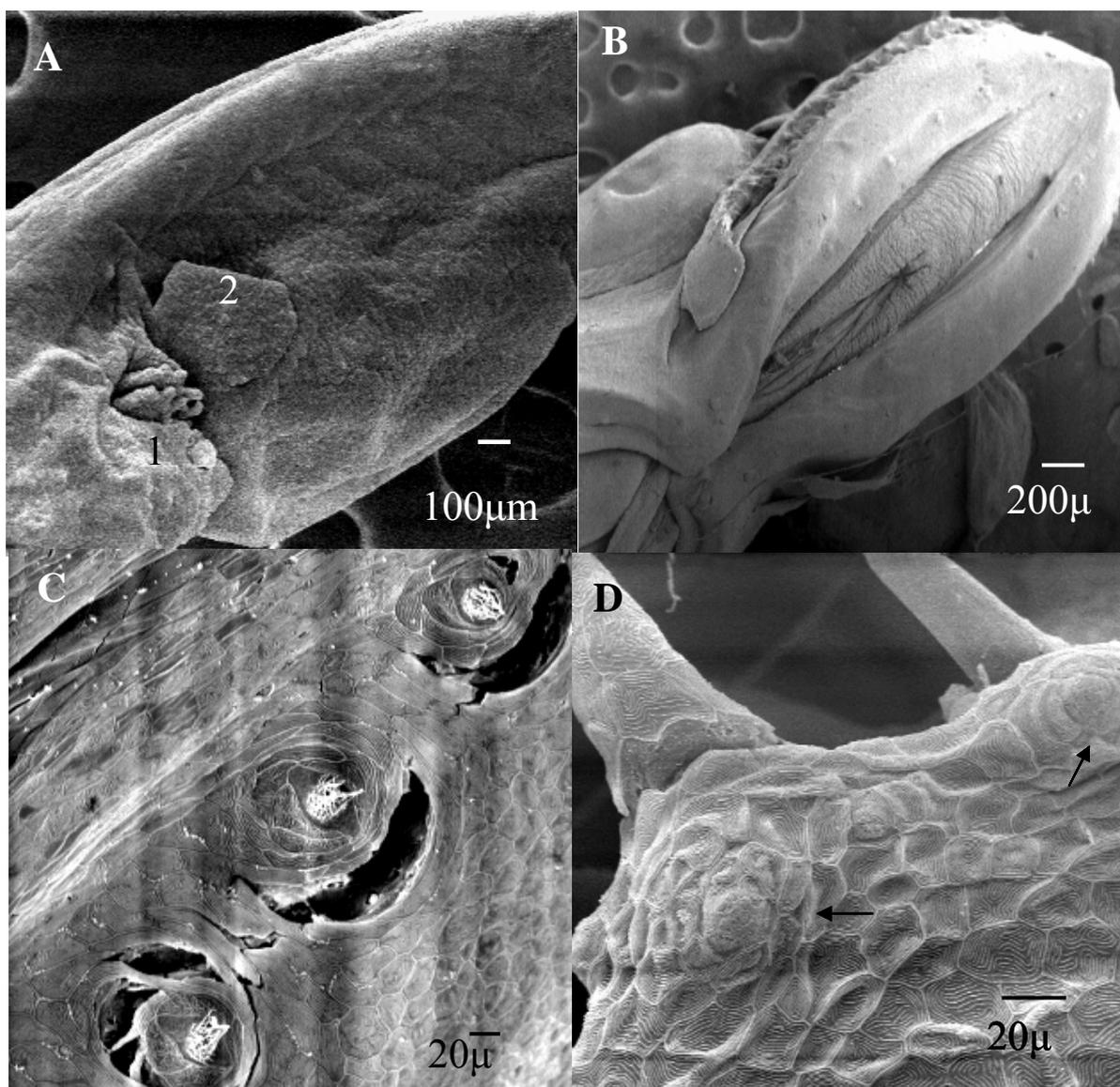


Figura 4 A – Larva de dourado com mais de 3 dias de vida, 1 mostra a membrana branquiostegial sobre os arcos branquiais e 2 o aparecimento das nadadeiras peitorais; B – Larva de dourado com oito de vida, mostrando os poros do canal mandibular fechados; C – Abertura dos poros do canal mandibular em larvas de dourado com 11 dias de vida; D – Botões gustativos na base dos dentes.

No décimo quarto dia, a narina apresentava-se dividida em duas partes (Figura 5A) e as nadadeiras já estavam todas separadas, começando a apresentar seus raios. Os canais supra-orbitários, operculares e maxilares (Figura 5A, B) já podiam ser observados, porém havia um número menor de neuromastos na cabeça e no corpo do dourado, se comparado ao encontrado nos bagres (CESTAROLLI, 2005), provavelmente porque esses costumam habitar águas mais profundas e com menor visibilidade e dependem mais dos outros órgãos sensoriais complementares à visão.

No décimo sétimo dia de vida, as escamas começaram a surgir na

epiderme, a narina apresentava lamelas (Figura 5C) e a linha lateral completava seu desenvolvimento; posteriormente, ainda receberia a cobertura das escamas especiais perfuradas.

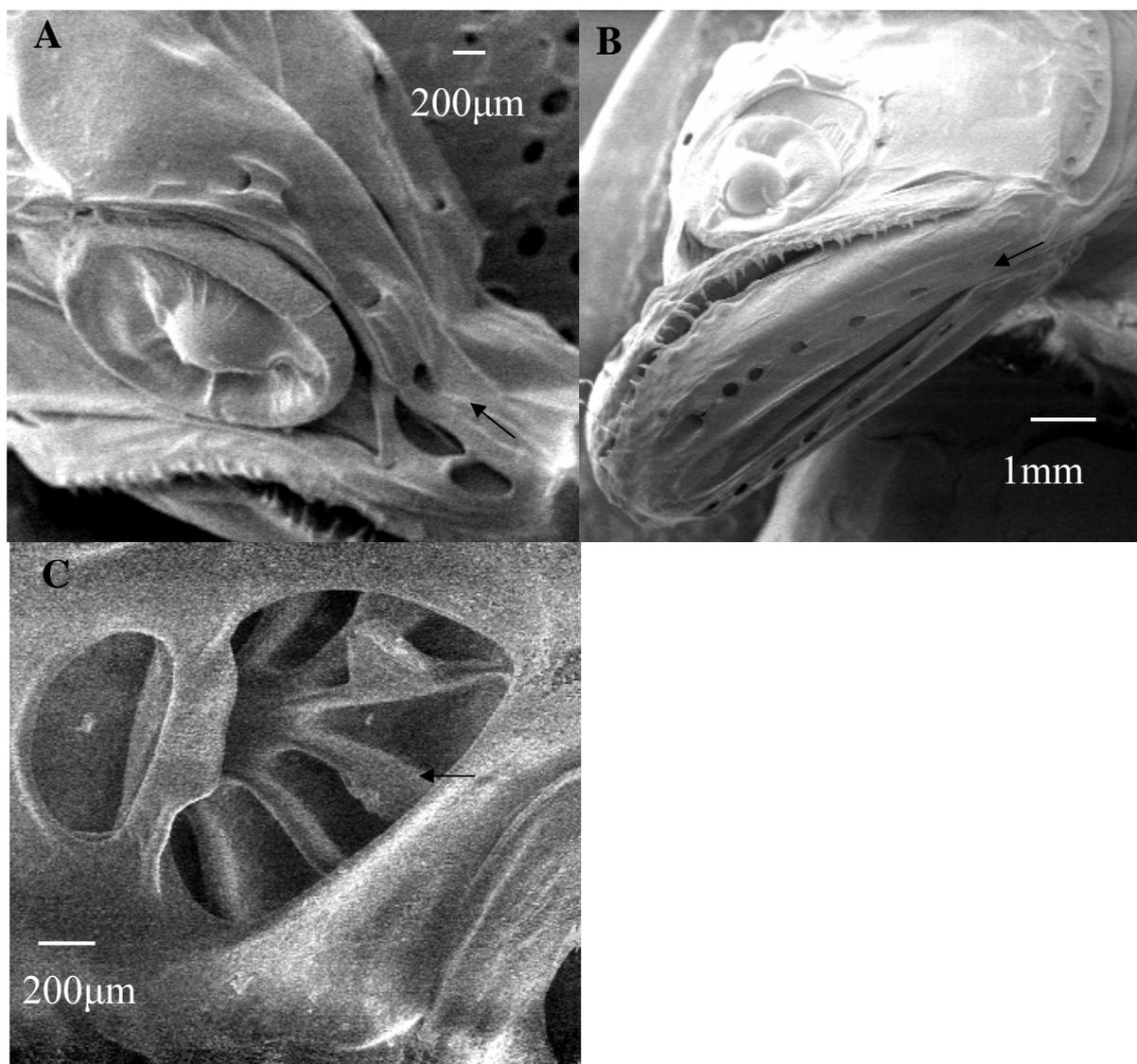


Figura 5 A – Canal supra-orbitário (seta) em larvas de dourado com 14 dias de vida; B – Canal mandibular (seta) em larvas de dourado com 14 dias de vida; C – Abertura nasal de dourado, a seta mostra as lamelas internas.

Em nenhuma fase foram detectados receptores elétricos durante o desenvolvimento do sistema sensorial de dourado; porém, este tipo de receptor ocorre em apenas 4 das mais de 30 ordens de teleósteos existentes (ZANKON, 1988).

#### 1.4 Conclusão

Os olhos e o órgão olfativo do dourado têm um desenvolvimento morfológico expressivo durante o período inicial de ontogenia, que provavelmente demonstra importância fundamental na alimentação larval. A mecanorrecepção, cujo aparato é constituído pelos canais das linhas laterais cefálica e neuromastos superficiais presentes principalmente no tronco e na cauda, também se destaca como um sentido importante no início do desenvolvimento da larva.

Os botões gustativos aparecem em número reduzido e tardiamente, ocupando uma posição secundária na busca e apreensão dos alimentos.

## 1.5 Agradecimentos

Aos produtores rurais Elizabeth Prada Foz e Daniel Junqueira da Piscicultura Pirajuba Aqua Genética pelo fornecimento das larvas de dourado, ao Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LNOA) do Centro de Aqüicultura da UNESP pelo uso das instalações para o cultivo das larvas, ao Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima do Laboratório de Microscopia Eletrônica da ESALQ – USP/Piracicaba pelo uso do laboratório, à Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar e à CAPES pela bolsa de doutoramento e ao MCT/CNPq pelo fomento ao projeto.

## 1.6 Referências bibliográficas

AGOSTINHO, A. A. et al. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997. p.229-248.

APPELBAUM, S.; RIEHL, R. Scanning electron microscopic observations of the chemo and mechanoreceptors of carp larvae (*Cyprinus carpio*) and their relationship to early behavior. **Aquatic Living Resources**, v. 10, p. 1-12, 1997.

BERNAL-SANCHEZ, G. L. **A influência do desenvolvimento da visão e do tamanho do alimento na larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae)**. 2006. 76p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BLAXTER, J. H. S. Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 115, p. 98–114, 1986.

BLECKMANN, H. Role of the lateral line in fish behaviour. In: PITCHER, T.J. (Ed.). **Behaviour of Teleost Fishes**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 201–246.

- CESTAROLLI, M. A. **Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (AGASSIZ, 1829): Aspectos da alimentação e do desenvolvimento de estruturas sensoriais.** 2005. 110 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- CLAVIJO-AYALA, J.A. **Ontogenia do sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae).** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- EASTER, S.S. JR; NICOLA, G. N. The development of vision in the zebra fish (*Danio rerio*). **Developmental biology**, v. 180, p. 646-663, 1996.
- GUTHRIE, D. M.; MUNTZ, W. R. A. Role of vision in fish behavior. Páginas 89-128, in: Pitcher, T. J. (ed) **Behavior of teleost fishes**. 2 ed. Chapman & Hall. London. 1993.
- HANSEN, A.; ZIELINSKI, B. S. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. **Journal of Neurocytology**, v. 34, p. 183–208, 2005.
- HARA, T. J. Chemoreception. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.) **Fish Physiology**. New York: Academic Press, vol. 5, p. 79–120, 1971.
- IWAI, T. Sensory anatomy and feeding of fish larvae. In: ICLARM CONFERENCE, 5. 1980, Manila, Philippines. **Proceedings...** Manila: Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes, 1980. p. 124–145.
- KOTRSCHAL, K. Taste(s) and olfaction(s) in fish: a review of specialized subsystems and central integration. **European Journal of Physiology**, v. 439 p. 178-180, 2000.
- KUBITZA, F. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Campos do Jordão. **Resumos...** Campos do Jordão: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1995, p. 53-68.
- MACHADO, C. C. **Exigência protéica de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis*.** 2004. 33 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- MANA, R. R.; KAWAMURA, G. A. comparative study on morphological differences in the olfactory system of red sea bream (*Pagrus major*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) from wild and cultured stocks. **Aquaculture**, v. 209, p. 285–306, 2002.
- MUKAI, Y. Role of free neuromasts in larval feeding of willow shiner *Gnathopogon elongatus caeruleus* Teleostei, Cyprinidae. **Fisheries Science**, v. 72, p. 705–709, 2006.
- MUKAI, Y.; TUZAN, A.D.; LIM, L.S.; YAHAYA, S. Feeding behavior under dark conditions in larvae of sutchi catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. **Fisheries Science**, v. 76, n. 3, p. 457-461, 2010.
- NOAKES, D. L. G.; GODIN, J. G. J. Ontogeny of behaviour and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1988. vol. 11-B, p. 345–395.
- PORTELLA, M. C.; VERANI, J. R.; CESTAROLLI, M. A. Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings - Effects on survival and growth. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 15, p. 45-58, 2000.
- SATO, Y.; SAMPAIO E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, vol. 23, no.1, 2006.

TANAKA, Y.; MUKAI, Y.; TAKJI, K.; KUMAI H. Chemoreception and vertical movement in planktonic yolk-sac larvae of red sea bream *Pagrus major*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 7, p. 129-135, 1991.

VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. **A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: Eduem, 1997. p. 229-248.

WEBB, J. F. Mechanosensory lateral line: functional morphology and neuroanatomy. In: OSTRANDER, G. K. (Ed.) **The handbook of experimental animals – the laboratory fish**. San Diego: Academic Press, 2000, p. 236–244.

WEBB, J. F.; SHIREY, J. E. Postembryonic development of the cranial lateral line canals and neuromasts in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 228, p. 370-385, 2003.

WOYNAROVICH, E.; SATO, Y. Criação especial de larvas e pós-larvas de matrinhã (*Brycon lundii*) e de dourado (*Salminus brasiliensis*). In: WORKSHOP ON LARVAL REARING ON FINFISH, 1989, Pirassununga. **Sumário...** Pirassununga: Canadian International Development Agency, 1989. p. 134-136.

YAMAMOTO, M. Comparative morphology of the peripheral olfactory organ in teleosts. In: HARA, T. J. (Ed.). **Chemoreception in fishes**. New York: Elsevier, 1982. p. 39–59.

ZANIBONI FILHO, E. **Piscicultura das espécies nativas de água doce**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1997. p. 20.

ZANKON, H. H. The electroreceptors: diversity in structure and function. In: ATEMA, J. et al. **Sensory Biology of Aquatic Animals**. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 813-850.

**2 CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DO SISTEMA  
DIGESTÓRIO DE DOURADO (*SALMINUS BRASILIENSIS*)**

**Desenvolvimento morfológico do sistema digestório de dourado *Salminus  
brasilensis***

Mônica Giacometti Mai<sup>1\*</sup>, Jussara Elias de Souza<sup>1</sup>, Maria Célia Portella<sup>2</sup>, José Roberto Verani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, Laboratório de Dinâmica de Populações; <sup>2</sup> Universidade Estadual de São Paulo/ Jaboticabal, Brasil, Centro de Aquicultura da UNESP

**Resumo**

O dourado *Salminus brasiliensis* é uma espécie nativa das bacias do Paraná, Paraguai e Uruguai, de alto valor econômico, mas vulnerável à extinção devido a represamentos e sobrepesca. O objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento ontogenético do sistema digestório de dourado, visando obter informações básicas sobre sua biologia que contribuam para o desenvolvimento de dietas e estratégias alimentares adequadas para seu cultivo nos estágios iniciais. As larvas foram amostradas às 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a fertilização (haf). Posteriormente, o intervalo de coletas foi de três dias (8<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 17<sup>o</sup> dias após a fertilização - daf). Às 6 haf foi observada epibolia da blastoderme sobre o vitelo. A fase de neurulação foi evidenciada nas amostras coletadas às 12 haf, com a formação do tubo neural, da notocorda e dos somitos. Com 18 haf, o canal alimentar foi observado acima do vitelo. Nessa fase também se constatou um grupo de células que formaria o fígado e o pâncreas. Nas amostras coletadas às 24 haf verificou-se a formação do esôfago e da futura cavidade oro - branquial que, com 48 haf, ficou caracterizada como a boca (com papilas gustativas) e faringe. O esôfago e o esfíncter esofágico também se encontravam formados e o canal alimentar continuava como um tubo retilíneo. O reto, válvula ílio-retal e ânus já estavam presentes, assim como o fígado e o pâncreas estavam diferenciados, caracterizados pela observação dos hepatócitos e dos ácinos pancreáticos, respectivamente. Dentes foram observados às 72 haf, bem como dobras no revestimento do reto.

Entre as 96 e 120 haf o fígado mostrou-se completamente formado, assim como o pâncreas. Paralelamente, ocorreu a formação e o aumento das dobras da mucosa de revestimento em todo o canal alimentar. A partir do 8º daf, o sistema digestório do dourado encontrava-se completamente formado, possivelmente apto a assimilar nutrientes de dieta formulada.

**Palavras-chave:** *Salminus*, dourado, desenvolvimento ontogenético, sistema digestório, histologia, diferenciação.

## 2.1 Introdução

No Brasil, a espécie *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), sinônimo de *S. maxillosus*, *S. brevidens* e *S. cuvier* (GÉRY & LAUZANNE, 1990), conhecida popularmente como dourado, ocorre nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (REIS et al., 2003). Em algumas regiões é considerada uma espécie ameaçada de extinção, como na bacia do Paraná (ROSA e LIMA, 2008) e no Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002). No entanto, não figura no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, uma vez que a bacia do Paraguai, apesar de sua elevada pressão de pesca, pode ser considerada bem preservada (ROSA e LIMA, 2008). Os principais impactos que ameaçam esta espécie são a sobreexploração da pesca, a degradação do habitat e construção de usinas hidrelétricas, que atrapalham o processo de migração para a desova (KOCH et al., 2000). Esse tipo de construção é bastante difundido em vários rios brasileiros, pois é a base da geração energética do país.

A espécie tem potencial para a aquicultura, apresentando rápido crescimento, boa qualidade da carne, elevado preço de mercado, interesse para pesca esportiva e produção ornamental, sendo que a redução de populações naturais dessa espécie resulta da degradação do habitat, além dos fatores acima mencionados (VEGA-ORELLANA et al. 2006; SCHÜTZ e NUÑER, 2007).

No entanto, a criação dessa espécie em escala comercial ainda é pouco desenvolvida principalmente por causa de sua pouca habilidade em aceitar alimentos artificiais na transição para a alimentação exógena (VEGA-ORELLANA et al., 2006), além de apresentar intensas taxas de canibalismo entre as larvas (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955). De acordo com SCHÜTZ e NUÑER (2007), uma alternativa para minimizar o problema do canibalismo de larvas é implementar

um manejo alimentar adequado durante os primeiros dias de cultivo, sendo que VEGA-ORELLANA et al. (2006) relata que é imperativo diagnosticar precocemente quando as larvas de *S. brasiliensis* são fisiologicamente capazes de digerir e absorver os nutrientes oferecidos, ou seja, quando o estômago está funcional, para resolver o problema da baixa sobrevivência durante a transição para alimentos inertes.

Alguns estudos têm sido realizados com relação ao cultivo *S. brasiliensis* (SANTOS e GODINHO, 1999; ZANIBONI FILHO, 1997; LUZ et al., 2000; MACHADO, 2004; VEGA-ORELLANA et al., 2006). No entanto, o desenvolvimento morfológico do trato digestório em estágios iniciais ainda não foi adequadamente descrito.

A compreensão da ontogenia do sistema digestório é uma importante ferramenta para o sucesso da criação de uma espécie de peixe em escala comercial (CHEN et al., 2006).

## **2.2 Objetivos**

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo acompanhar o desenvolvimento estrutural do sistema digestório de larvas de dourado, como forma de oferecer informações básicas sobre a biologia dessa espécie que venham a contribuir para o desenvolvimento de dietas artificiais adequadas aos estágios iniciais de cultivo da espécie.

## **2.3 Materiais e Métodos**

### **2.3.1 Obtenção das larvas de dourado**

Para este estudo foram obtidas amostras como relatado no capítulo 1.

### **2.3.2 Manejo das larvas e amostragens**

Da mesma forma como no item anterior, a descrição do manejo e amostragens pode ser obtida no capítulo 1.

### 2.3.3 Análises histológicas

Os embriões e larvas foram imediatamente fixados em solução de Karnovski e para as observações, os embriões foram cuidadosamente liberados do interior dos ovos, pela ruptura e remoção do cório. O estudo do desenvolvimento do sistema digestório através de histologia foi realizado no Laboratório de Dinâmica de Populações do Departamento de Hidrobiologia da UFSCar - São Carlos.

As amostras foram incluídas em Histoiresina<sup>®</sup> e cortadas na espessura de 3 a 5 µm em micrótomo de lâminas de vidro. Para as análises histológicas e histoquímicas foram empregados os métodos de Hematoxilina de Harris/Floxina B a 0,5% para observação da estrutura geral dos tecidos, ácido periódico de Schiff (PAS) para detecção de glicoconjugados neutros, Azul de Alcian (AB – sigla em inglês para Alcian Blue) pH 2,5 para detecção de glicoconjugados ácidos, Azul de Alcian pH 2,5 e PAS para evidência conjunta de glicoconjugados ácidos e neutros. As secções foram examinadas e fotografadas sob microscópio BX 51 Olympus, com câmera fotomicrográfica digital Altra 2.0 M Pixel (1596 X 1196) Olympus.

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Análises histológicas e histoquímicas

Às 6 haf foi observada epibolia das células da blastoderme sobre o vitelo (Fig. 1A), que se separaram em duas camadas distintas. Nesta fase ocorreu a formação do hipoblasto por involução de células do blastoderma em epibolização ou por delaminação do epiblasto. A fase de neurulação foi evidenciada nas amostras coletadas às 12 haf, com a formação do tubo neural, da notocorda e dos somitos. Com 18 haf, o canal alimentar presuntivo apresentava-se como uma fina camada de endoderme localizada acima do vitelo (Fig.1 B-C). A região anterior do tubo neural (neuróporo) ainda não se encontrava totalmente fechada. Nessa fase também se constatou um grupo de células que formaria o fígado e o pâncreas (Fig.1 B-C). A eclosão das larvas ocorreu por volta de 18 horas após a fertilização (haf), durante a fase final da neurulação. Neste momento, os embriões de *S. brasiliensis* tinham forma alongada e o vitelo se estendia até o final da cauda.

As amostras coletadas às 6, 12 e 18 haf não apresentaram reatividade

aos corantes histoquímicos empregados (PAS e AB). Às 24 haf, apenas o corante PAS reagiu em alguns pontos da musculatura indicando deposição de glicogênio muscular, o que não mereceu interesse no âmbito deste estudo.

Nas amostras coletadas às 24 haf (Fig.1 D) verificou-se a formação do esôfago e da futura cavidade oro - branquial, sendo que esta última às 48 haf ficou caracterizada como a boca, que já estava completamente formada (Fig. 2A). Ainda às 24 haf o canal alimentar apresentava-se como um tubo retilíneo revestido por epitélio simples localizado acima do vitelo (Fig. 1E), sendo que continuava com este formato às 48 haf, porém aumentando seu lúmen. Às 48 haf, o esôfago (Fig. 2B) e o esfíncter esofágico se encontravam formados, tendo por revestimento um epitélio estratificado (Fig. 2C), bem como nessa fase se encontrava a musculatura esquelética da camada muscular em formação. No intestino e no reto começavam a aparecer dobras na mucosa de revestimento (Fig. 2D).

O reto, válvula ílio-retal e ânus já estavam presentes (Fig.2E). Ocorreu reação ao corante PAS às 48 haf em alguns pontos da musculatura, no revestimento externo e no glicogênio armazenado no fígado (Fig. 2E). Nesse momento, o fígado e o pâncreas (Fig. 3A-B) estavam em diferenciação, caracterizados pela observação dos hepatócitos e dos ácinos pancreáticos. Os dentes foram observados às 72 haf, bem como aumento do número de dobras da mucosa do intestino posterior (Fig. 3C e 3D, respectivamente). A estrutura do canal alimentar e do fígado manteve-se como na larva de 48 horas e a camada muscular do esôfago já estava completamente formada (Fig. 3B). Às 72 haf, o corante PAS reagiu em alguns pontos da musculatura da larva e na sua superfície corporal, no fígado, na superfície do epitélio de revestimento do esôfago (Fig. 3E) e nas primeiras células mucosas do revestimento do intestino (Fig. 3F). O corante AB nessa fase reagiu em algumas células do esôfago (Fig. 4A) e no intestino. Os corantes combinados PAS+AB reagiram no fígado (Fig. 4B), nas papilas gustativas (Fig. 4C), nas células mucosas e na superfície do epitélio de revestimento do esôfago (Fig. 4D), em pouquíssimas células mucosas do intestino (Fig. 4E), no citoplasma das células do intestino posterior e células mucosas do mesmo (Fig. 4F).

O tubo digestório apresentava às 96 haf o estômago alargado dorso-ventralmente (Fig. 5A) e nessa fase ocorreu no intestino um grande aumento de dobras da mucosa, aparentemente iniciado pela parte posterior (mais estreita) para a anterior (mais larga), sendo que a mucosa do estômago começou a sofrer suas

primeiras dobras. Às 120 haf o fígado e o pâncreas mostraram-se completamente formados, sendo que nesse último estavam bem evidentes os ácinos pancreáticos cheios com grânulos de zimogênio (Fig. 5B). Quanto às marcações com PAS às 96 haf, essas se mostraram mais intensas na superfície do esôfago (Fig. 5C). A reação ao PAS no fígado diminuiu (Fig. 5D), ao mesmo tempo em que as primeiras células mucosas reagentes apareceram na região anterior do estômago (Fig. 5E). Grânulos (ou vesículas) reagentes foram observados na região apical das células de revestimento do intestino posterior (Fig. 5F). Também, a superfície da mucosa intestinal, ou borda estriada, apresentou-se reagente (Fig. 6A), além de poucas células mucosas no epitélio do intestino. O AB reagiu pouco no esôfago e no intestino, no entanto o PAS combinado ao AB reagiu no fígado (Fig. 6B), papilas gustativas, células mucosas do epitélio de revestimento do esôfago, células mucosas e na borda estriada do intestino (Fig. 6C).

Às 120 horas a reação ao PAS no fígado foi baixa (Fig. 6D). O AB também reagiu pouco no esôfago (Fig. 6E) e intestino (Fig. 6F), como às 96 haf. O PAS combinado ao AB não reagiu no fígado às 120 haf, porém reagiu nas células mucosas do esôfago e nas células do revestimento do estômago (Fig. 7A), além de ter reagido nas células mucosas e na borda estriada do intestino.

No 8º daf o sistema digestório do dourado encontrava-se completamente formado, possivelmente apto a assimilar nutrientes de dieta formulada. A partir da amostra do 8º daf as estruturas se apresentavam em sua forma definitiva, não sendo verificadas diferenças entre as amostras subseqüentes. A cavidade oral estava revestida por epitélio estratificado pavimentoso com papilas gustativas, a submucosa de tecido conjuntivo frouxo apresentava-se com uma fina camada, abaixo da muscular da mucosa (Fig. 7B, foto ao 17º daf). A faringe possuía dentes (Fig. 7C, foto ao 11º daf) e o número de células mucosas aumentou, sendo que as colorações histoquímicas (PAS, PAS+AB) evidenciaram esse aumento também nas mucosas da boca e no esôfago (Figs. 7D e F, respectivamente).

O esôfago apresentava-se curto (Fig. 7E, foto ao 11º daf) e revestido por mucosa composta de epitélio estratificado pavimentoso, com várias células mucosas (Fig. 7F, ao 8º daf), lâmina própria (tecido conjuntivo) e muscular mucosa. A camada muscular do esôfago consistia de uma camada circular externa (em corte transversal) bastante espessa e de musculatura estriada, outra camada longitudinal e interna, constituída por músculo estriado em sua primeira porção, mudando

gradualmente para musculatura lisa na transição com o estômago. A superfície interna do esôfago apresentava pregas longitudinais da mucosa (Fig. 7 E), sendo acompanhada pela camada longitudinal da muscular. Nas amostras do 8º daf em diante, as colorações histoquímicas PAS, AB e PAS + AB reagiram com as células mucosas e superfície das células de revestimento do esôfago (assim como em figuras anteriormente mostradas).

Na parede do estômago observou-se revestimento de epitélio cilíndrico simples, sendo que esse apresentava dobras (fossetas e glândulas gástricas) (Fig. 8A, ao 8º daf; visível também na Fig. 7E ao 11º daf). O núcleo era geralmente basal, e a coloração combinada de PAS + AB reagiu na região apical das células do revestimento do estômago a partir das amostras do 8º daf (Fig. 8B). A camada muscular do estômago apresentava-se formada por musculatura lisa, disposta em duas camadas, uma circular interna muito espessa e uma longitudinal externa, mais fina.

A mucosa do intestino formava dobras (Fig. 8C) revestidas por epitélio colunar simples, sendo acompanhada pela submucosa. As células possuíam núcleos geralmente centro-basais. Na mucosa encontravam-se também células caliciformes. No reto encontrava-se uma camada muscular mais espessa e células mucosas no revestimento. No intestino anterior as dobras do revestimento eram mais profundas do que no intestino posterior. O PAS reagiu nas células caliciformes do epitélio de revestimento e em alguns grânulos do reto (como em fotos anteriores). O AB não reagiu no intestino e reto nas amostras ao 11º daf, fato que também ocorreu no esôfago com este corante. O PAS combinado ao AB reagiram fortemente nas células mucosas a partir do 8º daf, bem como com o citoplasma das células do intestino (Fig. 8D).

No fígado houve reação diferenciada ao PAS nas diferentes idades, sendo pouca reação aos 8 daf, muita reação aos 11 e nenhuma aos 14 daf. Além disso, o PAS combinado ao AB apresentou reatividade no fígado somente a partir do 14º daf.

Tabela 1. Morfologia geral e desenvolvimento do sistema digestório de dourado *Salminus brasiliensis*:

Período	Amostragem	Descrição
Embrionário	6 haf	Epibolia das células da blastoderme sobre o vitelo, que se separaram em duas camadas distintas. Formação do hipoblasto por involução de células do blastoderma em epibolização ou por delaminação do epiblasto
	12 haf	Tubo neural com fechamento incompleto; presença de miômeros na região dorsal; esboço da abertura bucal.
	18 haf *	Canal alimentar presuntivo como fina camada de endoderme acima do vitelo. Região anterior do tubo neural ainda aberta. Grupo de células formadoras do fígado e do pâncreas já presentes. Embriões com forma alongada e o vitelo até o final da cauda.
Larval	24 haf (1º daf)	Formação do esôfago e abertura da cavidade oro - branquial. Canal alimentar como um tubo retilíneo revestido por epitélio simples localizado acima do vitelo.
	48 haf (2º daf)	Esôfago e o esfíncter esofágico se encontravam formados, com revestimento de epitélio estratificado, bem como se encontrava a musculatura esquelética da camada muscular em formação. O reto, válvula ílio-retal e ânus já estavam presentes. No intestino e no reto começavam a aparecer dobras na mucosa de revestimento. PAS reagiu com glicogênio armazenado no fígado. Fígado e pâncreas estavam em diferenciação, caracterizados pela observação dos hepatócitos e dos ácinos pancreáticos, respectivamente.
	72 haf (3º daf)	Presença de dentes na boca. Camada muscular do esôfago já estava completamente formada Canal alimentar e fígado como na larva de 48 horas. Aumento do número de dobras da mucosa do intestino posterior. PAS reagiu na superfície do epitélio de revestimento do esôfago, no fígado e nas primeiras células mucosas do revestimento do intestino. AB reagiu em algumas células mucosas no esôfago e no intestino. PAS+AB reagiram nas papilas gustativas, nas células mucosas e na superfície de revestimento do esôfago, no fígado, em pouquíssimas células mucosas do intestino, no citoplasma das células do intestino posterior e reto e células mucosas dos mesmos.
	96 haf (4º daf)	Estômago alargado dorso-ventralmente, cuja mucosa começou a sofrer suas primeiras dobras. Intestino com grande aumento de dobras da mucosa, aparentemente iniciado pela parte posterior (mais estreita) para a anterior (mais larga). PAS: reações mais intensas na superfície do esôfago. Reação no fígado diminuiu ao mesmo tempo em que as primeiras células mucosas reagentes apareceram na região anterior do estômago. Grânulos (ou vesículas) reagentes foram observados na região apical das células de revestimento do intestino posterior. Também, a superfície da mucosa intestinal, ou borda estriada, apresentou-se reagente, além de poucas células mucosas no epitélio do intestino. O AB reagiu pouco no esôfago e no intestino.

120 haf (5° daf)	<p>PAS+AB: reagiu no fígado, papilas gustativas, células mucosas do epitélio de revestimento do esôfago, células mucosas e na borda estriada do intestino.</p> <p>Fígado e pâncreas completamente formados, sendo bem evidentes os ácinos pancreáticos cheios com grânulos de zimogênio.</p> <p>PAS: reação no fígado foi baixa.</p> <p>AB também reagiu pouco no esôfago e intestino.</p>
8° ao 17° daf	<p>PAS+AB: não reagiu no fígado, porém reagiu nas células mucosas do esôfago e nas células do revestimento do estômago, além de ter reagido nas células mucosas e na borda estriada do intestino.</p> <p>Sistema digestório completamente formado, as estruturas se apresentavam em sua forma definitiva, não sendo verificadas diferenças morfológicas significantes entre as amostras subseqüentes.</p> <p>Boca e esôfago apresentavam epitélio estratificado pavimentoso, a primeira com papilas gustativas; Faringe apresentava dentes e o número de células mucosas aumentou, sendo que as colorações histoquímicas (PAS, PAS+AB) evidenciaram esse aumento também nas mucosas da boca e no esôfago.</p> <p>Musculatura lisa na transição do esôfago com o estômago. Nas amostras do 8° daf em diante, as colorações histoquímicas PAS, AB e PAS + AB reagiram com as células mucosas e superfície das células de revestimento do esôfago.</p> <p>Na parede do estômago observou-se revestimento de epitélio cilíndrico simples, sendo que a mucosa apresentava dobras (fossetas e glândulas gástricas) aos 8 daf. O núcleo das células de revestimento era geralmente basal, e a coloração PAS + AB reagiu na região apical das células do revestimento do estômago a partir das amostras do 8° daf.</p> <p>A mucosa do intestino formava dobras revestidas por epitélio colunar simples, sendo acompanhada pela submucosa. Núcleos geralmente centro-basais. Presença de células caliciformes. PAS reagiu nas células caliciformes do epitélio de revestimento e em alguns grânulos do reto. AB não reagiu no intestino e no reto nas amostras ao 11° daf, o que também ocorreu no esôfago.</p> <p>PAS+AB reagiram fortemente nas células mucosas a partir do 8° daf, bem como com o citoplasma das células do intestino.</p> <p>No fígado houve reação diferenciada ao PAS nas diferentes idades, provavelmente explicadas pelo dinamismo de secreções dependendo do processamento alimentar da larva, sendo que o PAS +AB somente apresentou reatividade no fígado a partir do 14° daf.</p>

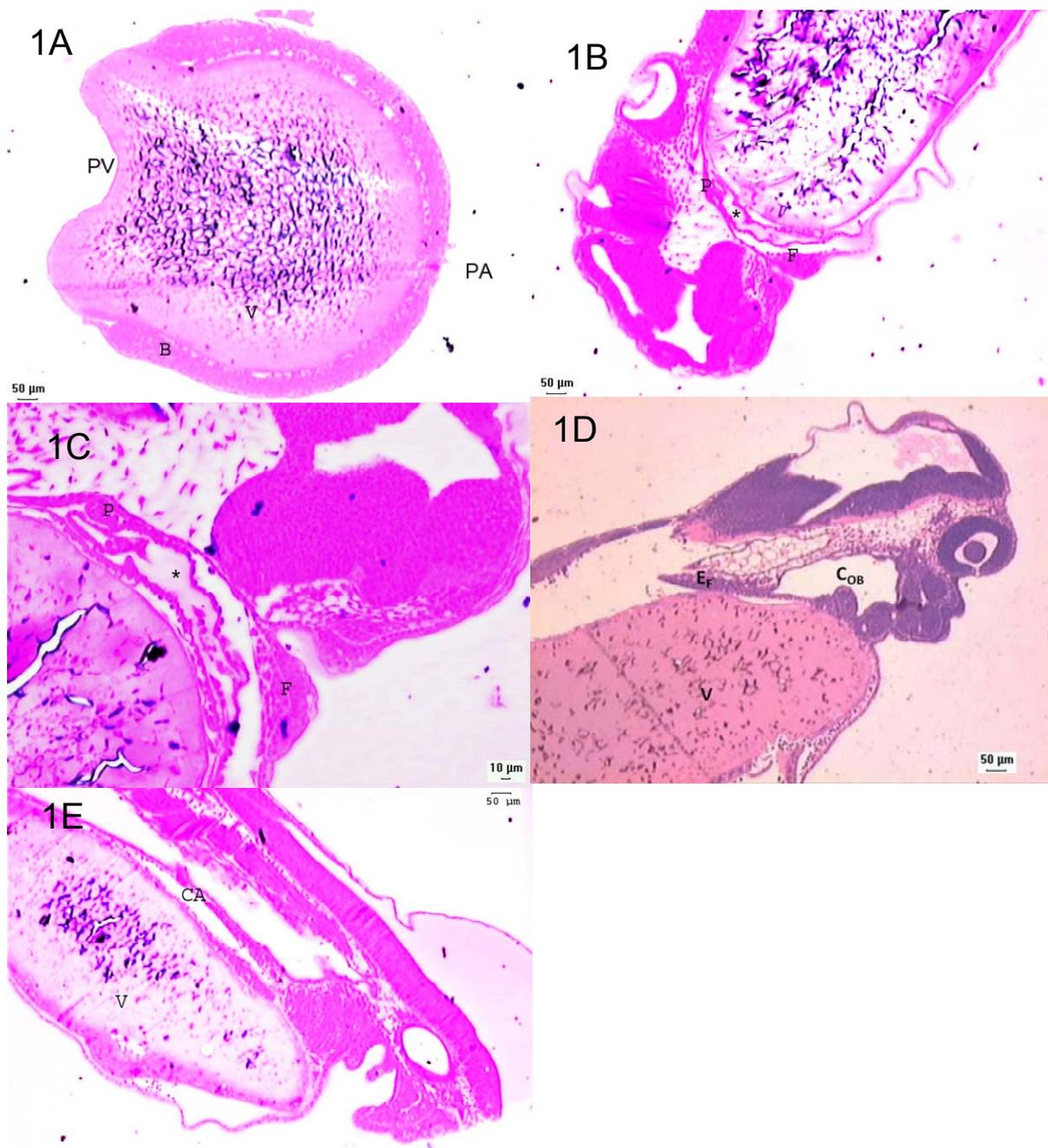


Figura 1

**A)** Embrião às 6 haf. V: vitelo, B: blastômeros PA: pólo animal e PV: pólo vegetativo. **B)** 18 haf. Canal alimentar presuntivo (\*), células precursoras do pâncreas (P) e do fígado (F). **C)** Detalhe de B. **D)** 24 haf. Esôfago em formação ( $E_F$ ), cavidade oro-branquial ( $C_{OB}$ ) presuntiva e vitelo (V). **E)** 24 haf. Canal alimentar retilíneo (CA) e vitelo (V). Coloração com hematoxilina e floxina.

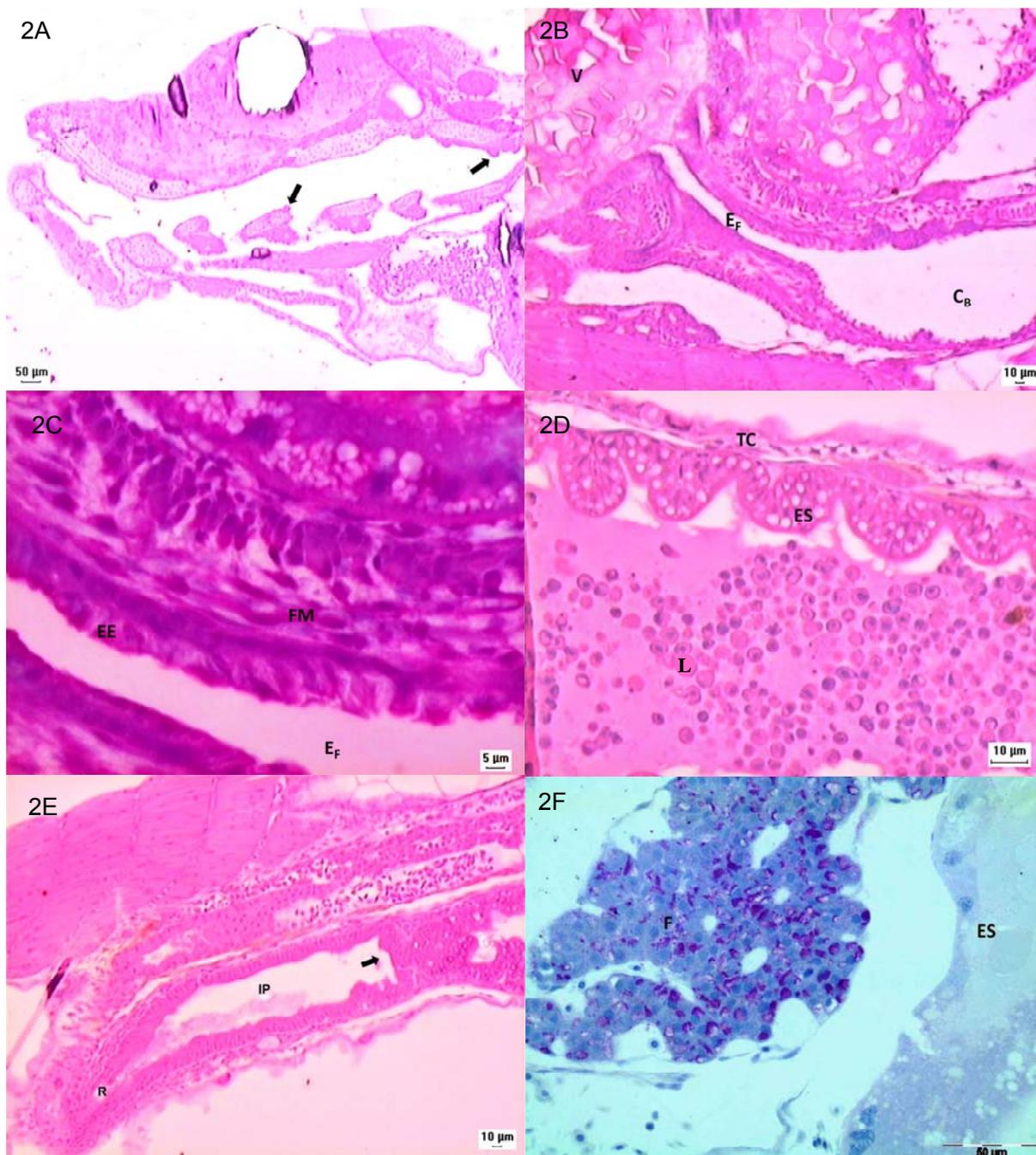


Figura 2 **A)** Boca completamente formada, mostrando algumas papilas gustativas (setas). **B)** Formação do esôfago ( $E_F$ ). Vitelo (V), cavidade bucal ( $C_B$ ). **C)** Detalhe do esôfago ( $E_F$ ), revestimento de epitélio estratificado (EE) e fibras musculares esqueléticas em formação (FM). **D)** Detalhe da região posterior do canal alimentar, epitélio simples (ES) e início da formação das dobras da mucosa. Luz do intestino (L), tecido conjuntivo (TC). **E)** Válvula ílio-retal (seta), intestino posterior (IP) e reto (R). **F)** Detalhe do fígado mostrando grânulos de glicogênio. Todas as fotos correspondem às 48 haf. Coloração com hematoxilina e floxina, exceto em F (coloração com PAS).

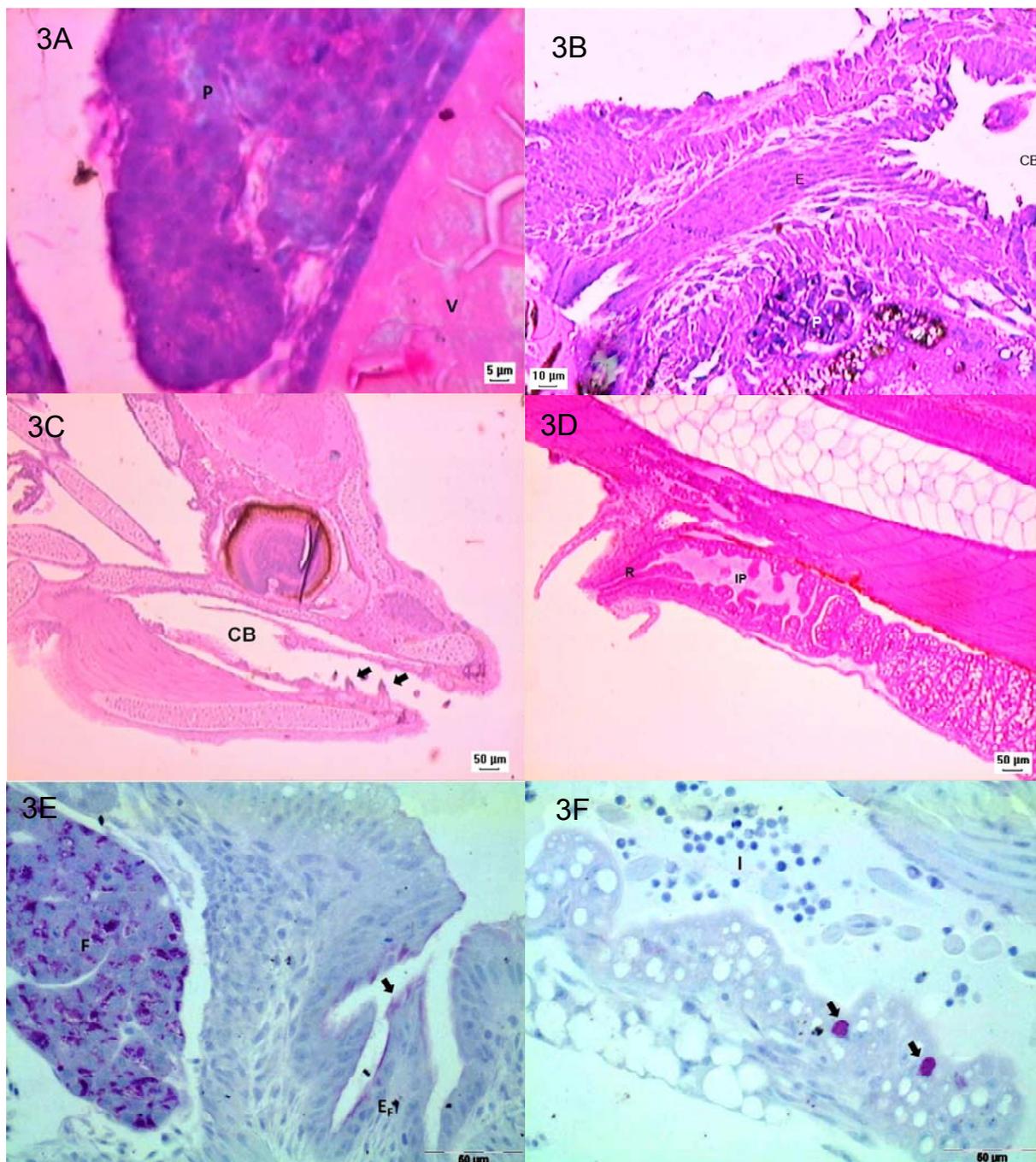


Figura 3 **A)** 48 haf: Estrutura em ácinos do pâncreas (P). Vitelo (V). **B)** 48 haf. Esôfago (E). Pâncreas (P), cavidade bucal (CB). **C)** 72 haf: Detalhe da cavidade bucal (CB), setas indicam dentes. **D)** 72 haf: Dobras na mucosa do intestino posterior (IP) e reto (R). **E)** 72 haf: Grânulos de glicogênio no fígado (F) e superfície (seta) do revestimento do esôfago ( $E_F$ ). **F)** 72 haf: primeiras células caliciformes (setas) do epitélio de revestimento do intestino (I). Colorações com hematoxilina e floxina, exceto E e F: PAS.

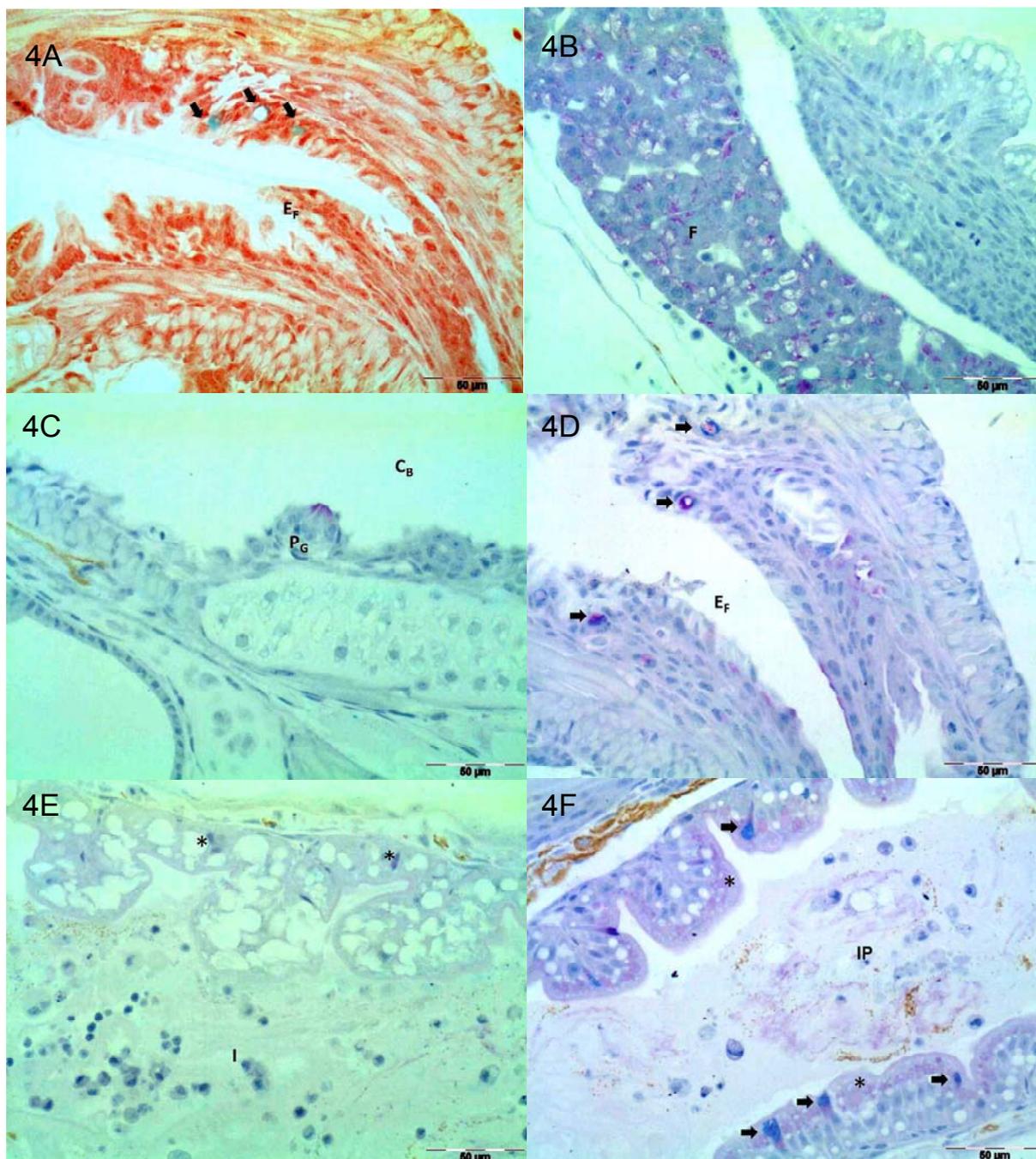


Figura 4 **A)** Células caliciformes (setas) no epitélio do esôfago ( $E_F$ ) coradas com AB e contraste. **B)** Grânulos de glicogênio no fígado (F). **C)** Cavidade bucal ( $C_B$ ) mostrando as papilas gustativas ( $P_G$ ). **D)** Esôfago ( $E_F$ ) mostrando as células caliciformes (setas). **E)** Intestino (I) mostrando as células caliciformes (\*) do epitélio de revestimento. **F)** Intestino posterior. Todas as fotos às 72 haf, coradas com PAS + AB + Hematoxilina, exceto A.

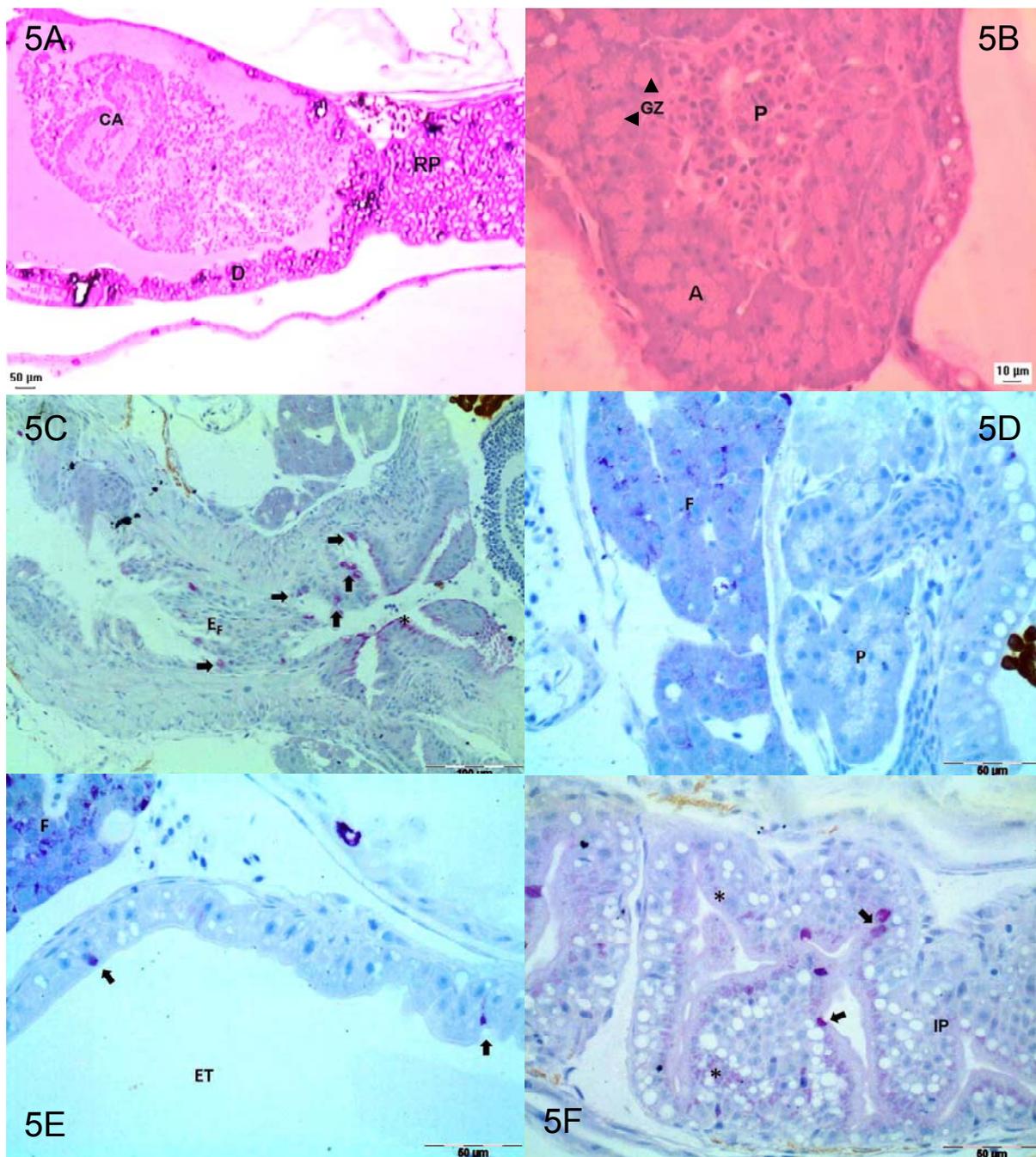


Figura 5 **A)** Estômago alargado dorso-ventralmete, apresentando dobras da parede da mucosa (D), conteúdo alimentar (CA), revestimento proximal do intestino (RP). **B)** Pâncreas (P): estruturas em ácinos (A) e grânulos de zimogênio (GZ). **C)** Células mucosas (setas) e superfície das células do epitélio (\*) do esôfago (E<sub>F</sub>). **D)** Pouca reação no fígado (F) e no pâncreas (P). **E)** Primeiras células mucosas reagentes (setas) no estômago (ET). **F)** células caliciformes (setas) e grânulos (ou vesículas) (\*) reagentes na região apical do revestimento do intestino posterior (IP). Colorações com PAS, exceto A e B: Hematoxilina e Floxina. Todas as fotos às 96 haf, exceto B (120haf).

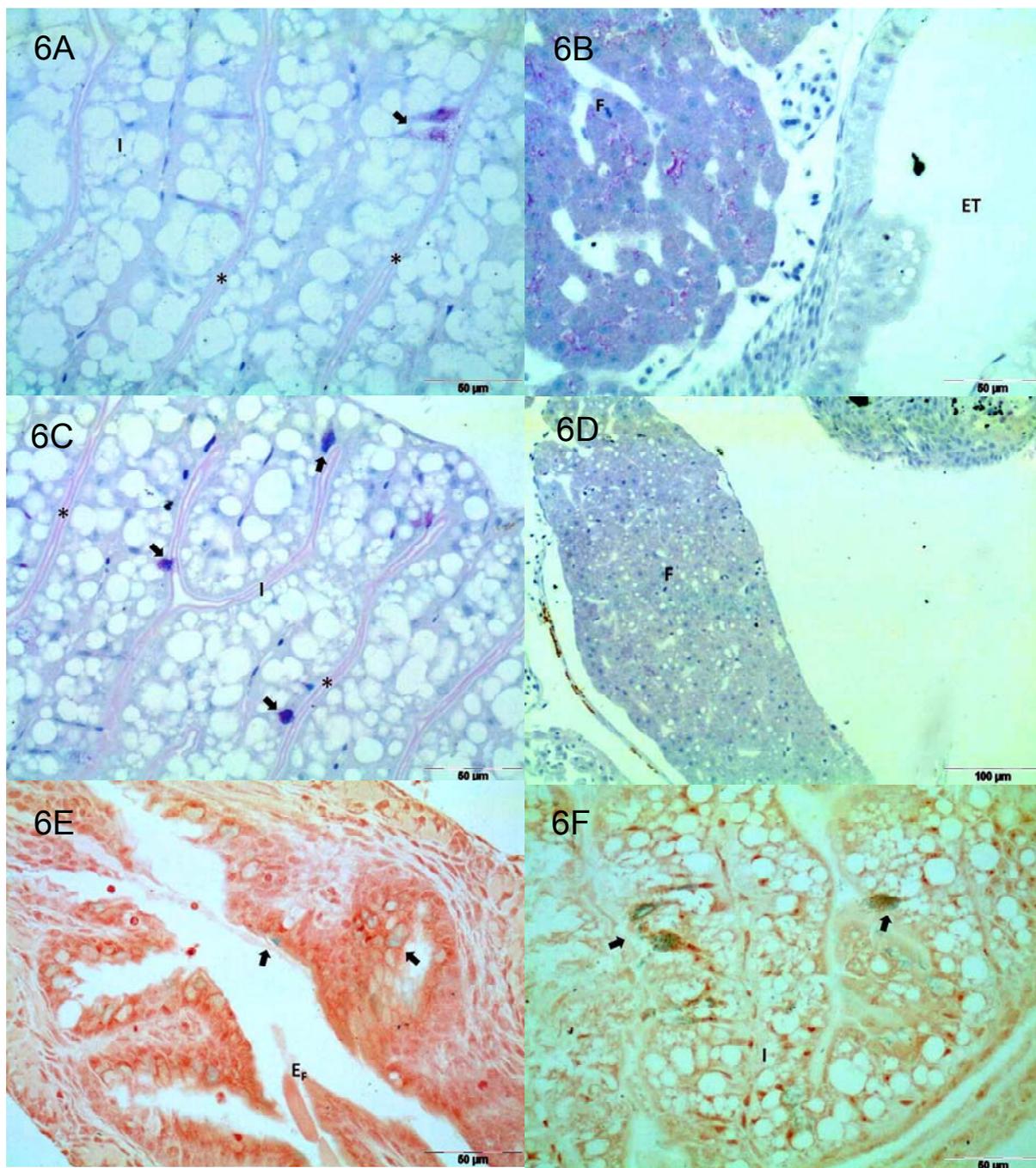


Figura 6 **A)** 96 haf: Intestino (I) mostrando a superfície da mucosa reagente (borda estriada) (\*) e poucas células mucosas (seta). PAS. **B)** 96 haf: Fígado (F). ET = estômago. PAS + AB + Hematoxilina. **C)** Intestino (I) mostrando células mucosas (setas) e borda estriada (\*). PAS + AB + Hematoxilina. **D)** 120 haf: pouca reação ao corante no fígado (F). PAS. **E)** 120 haf: Esôfago (E<sub>f</sub>) mostrando as células mucosas (setas). AB + contraste. **F)** Detalhe do intestino (I) às 120 haf mostrando as células mucosas (setas) no epitélio de revestimento. AB + contraste.

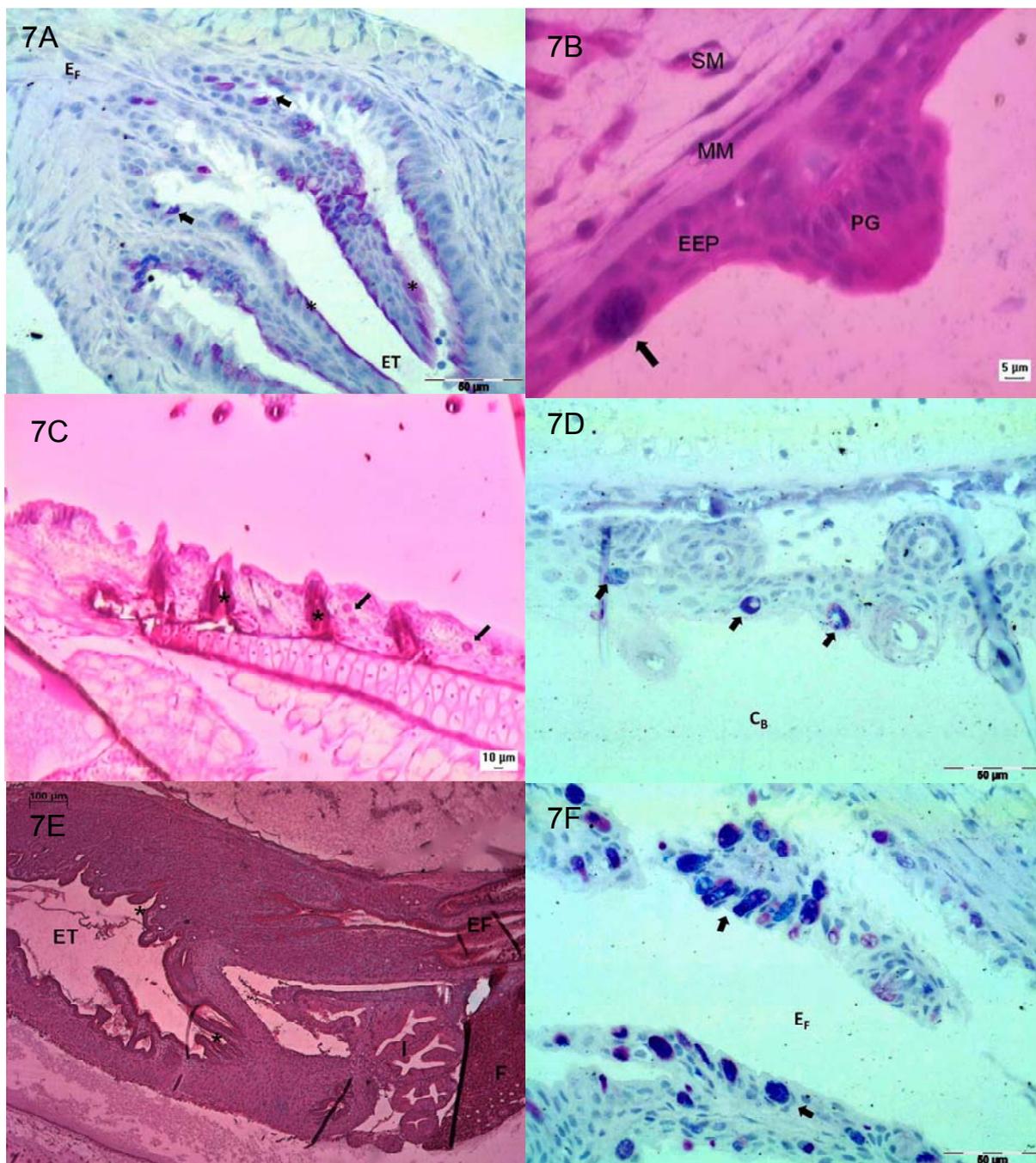


Figura 7 **A)** 120 haf, células mucosas (setas) no epitélio do esôfago ( $E_F$ ) e na superfície das células (\*) do revestimento do estômago (ET). PAS + AB + Hematoxilina. **B)** 17° daf: Boca apresentando epitélio estratificado pavimentoso (EEP), células mucosas (seta), muscular da mucosa (MM), submucosa de tecido conjuntivo (SM) e papila gustativa (PG). **C)** Detalhe da faringe ao 11° daf, dentes faríngeanos (\*) e células mucosas (setas). Hematoxilina e Floxina. **D)** cavidade bucal ( $C_B$ ) no 8° daf, células mucosas (setas) do epitélio de revestimento. PAS + AB + Hematoxilina. **E)** 11° daf: Estômago (ET), esôfago (EF), intestino (I) e fígado (F) e fossetas gástricas (\*). **F)** Esôfago ( $E_F$ ) ao 8° daf mostrando células mucosas (setas). PAS + AB + Hematoxilina.

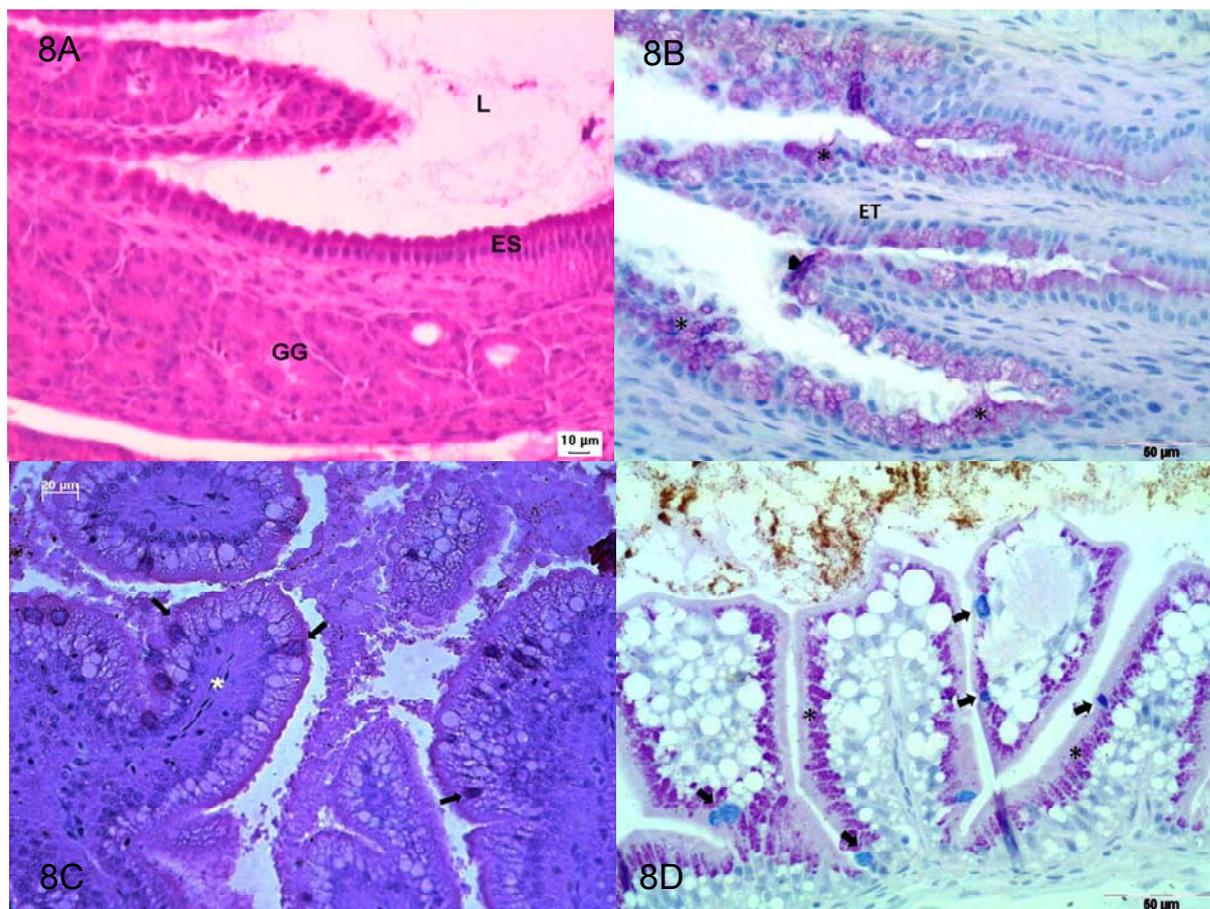


Figura 8 **A)** Detalhe do estômago ao 8<sup>o</sup> daf: lúmen (L), epitélio colunar simples (ES) e glândulas gástricas (GG). **B)** Estômago (ET) ao 8<sup>o</sup> daf, reação no citoplasma das células (\*) de revestimento. PAS + Alcian B + Hematoxilina. **C)** Intestino aos 17<sup>o</sup> daf, dobras da mucosa (\*) e células caliciformes (setas). **D)** Intestino ao 8<sup>o</sup> daf mostrando células caliciformes (setas) e vesículas (\*) do citoplasma das células do epitélio de revestimento. PAS + AB + Hematoxilina.

## 2.5 Discussão

As larvas de dourado apresentaram boca e ânus fechados no momento da eclosão, como ocorre com o bagre africano *Clarias gariepinus* (VERRETH et al., 1992), com o linguado senegalense *Solea senegalensis* (RIBEIRO et al., 1999), com o “piauí-gordura” *Leporinus piau* (BORÇATO et al. 2004), entre outras espécies de peixes. Assim como para o bagre africano (VERRETH et al., op. cit.), o dourado começou a apresentar alimentação exógena entre as 48 e 72 haf, sendo que ambas as espécies já apresentavam o fígado, o pâncreas e o intestino segmentado nesse período. Segundo a definição dada por BALON (1975), o estágio embrionário começa na fertilização e dura até o início da alimentação exógena. Assim, o embrião de dourado pode ser considerado uma larva por volta das 48 haf de acordo com o conceito citado, pois às 24 haf (com temperatura média da água a  $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) já se observava a abertura bucal, e entre as 48 haf e as 72 haf, ocorreu ingestão de alimento exógeno e puderam ser vistas vesículas grandes e claras na mucosa do intestino das larvas, sugerindo que estava ocorrendo absorção nesta parte do canal alimentar. Paralelamente, ocorreu a finalização da absorção do vitelo, e puderam ser vistas as primeiras células mucosas marcadas com PAS no intestino, o que de acordo com RIBEIRO et al. (1999) sugere a secreção de mucinas neutras que facilitarão a digestão de dissacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta, que é como os materiais alimentares chegam após passarem pelo processamento na boca, esôfago e estômago. Também às 72 haf o AB reagiu com poucas células mucosas do intestino das larvas de dourado.

As papilas gustativas, que foram vistas apenas ao 8º daf na microscopia de varredura (Cap. 1), foram visualizadas às 72 haf marcadas com PAS +AB nas lâminas histoquímicas. O dourado apresentou poucas papilas restritas à região bucofaríngea, sendo elas esparsamente dispersas na superfície da mucosa de revestimento e ao redor dos dentes. Essas estruturas estão envolvidas na seleção e aceitação de alimentos, sendo que LANE e WHITEAR (1982) e REUTTER (1982) destacam que os botões gustativos ocorrem no epitélio oral e faringiano, bem como sobre a superfície corporal e a superfície das nadadeiras de várias espécies de peixes. O pintado *Pseudoplatystoma coruscans* apresenta botões gustativos na superfície dos barbilhões horas após a sua eclosão, que refletiria a maior

capacidade dessas larvas de capturar alimento na ausência de luz, sendo que estes botões também se apresentam nos lábios e interior da boca (CESTAROLLI; 2005).

O esôfago da larva de dourado também começa a ser funcional entre o 2º e 3º dias de vida (48-72 haf), e nas amostras às 72 haf podem ser verificadas células mucosas marcadas fracamente com PAS, além de positividade ao PAS+ AB na superfície do epitélio voltada para a luz do canal esofágico, demonstrando a secreção mista de mucopolissacarídeos neutros e ácidos do esôfago, o que se mantém constante até final das amostragens neste estudo. Para a espécie de esturjão siberiano *Acipenser baeri*, somente a porção anterior do esôfago foi caracterizada como tendo função secretora pela presença de células caliciformes, sendo que a função da parte posterior seria de transporte do alimento, uma vez que apresenta células ciliadas (GISBERT et al., 1999). No dourado, ao contrário do que acontece com o esturjão acima citado, verificou-se a presença de células caliciformes em todo o esôfago até a transição com o estômago. Não foi descrito neste estudo a presença de células ciliadas nesta região.

O estômago de dourado apresentou-se distendido a partir das 48 haf, mas somente nos materiais de 72 haf foram observados alimentos parcialmente digeridos em seu interior. As primeiras reações histoquímicas foram observadas às 96 haf com o corante PAS. VEGA-ORELLANA (2006) ao analisar algumas das enzimas digestivas do dourado, encontrou atividade de pepsina de  $0.0004 \pm 0,0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  ao 3º dia após a eclosão (ou seja, por volta das 96 haf), indicando a funcionalidade do estômago, fato que corrobora a marcação com PAS nas células mucosas do revestimento do estômago vistas no presente estudo. Um elevado número de glândulas gástricas foi visualizado ao 8º daf, porém a diferenciação dessas glândulas provavelmente ocorreu antes desta amostragem, já que no material do 5º daf (120haf) estas glândulas não foram detectadas. O aparecimento dessas glândulas no estômago é indicativo da funcionalidade deste órgão e ocorre em períodos diferentes para as espécies de peixes. DABROWSKI (1984) sugere uma divisão dos peixes em 3 grupos de acordo com a morfologia e as enzimas digestórias: a) espécies que apresentam o estômago funcional antes do início da alimentação exógena; b) espécies cujo estômago torna-se funcional após o início da digestão exógena (larvas altriciais) e, c) espécies de peixes que são agastros, possuindo somente digestão alcalina para absorção dos alimentos. No caso de *Thunnus albacares* as glândulas gástricas se diferenciam aos 12 dias após a

eclosão, demonstrando que, assim como o dourado, esta espécie participa do segundo grupo (larvas altriciais) na divisão proposta por DABROWSKI (1984).

O intestino das larvas de dourado se desenvolve precocemente e ao mesmo tempo em que o fígado e o pâncreas, formando dobras em sua mucosa desde as 48 após a fertilização. As 72 haf, o intestino começa a apresentar as primeiras células calciformes reagentes ao PAS, ao AB e a ambos - PAS+AB. Com o amadurecimento deste órgão, ocorre um aumento sensível no número de células calciformes na superfície da mucosa de revestimento, sendo que a parte posterior do intestino e o reto apresentam redução do número de dobras da mucosa. O desenvolvimento do tubo digestório do dourado parece iniciar-se e ser mais rápido na parte posterior e só então na anterior, fato este descrito por GISBERT et al. (1998) como processo de diferenciação assincrônico.

Foram vistos muitos corpúsculos claros suprabasais nas células do intestino desde as 48 haf, que estão provavelmente relacionados à absorção dos alimentos que ocorre nesse órgão.

O dourado apresentou diferenciação precoce do fígado e do pâncreas, sendo que estes órgãos nesta espécie apresentam-se distintos, contrário ao que ocorre em diversas espécies de peixes que possuem inclusões de tecido pancreático dispersos no tecido do fígado, denominado hepatopâncreas, como é o descrito para o piau-gordura por BORÇATO et. al. (2004), e para tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* por MORRISON et al. (2004). Este último autor relata que a parte exócrina do pâncreas de tilápia começa a penetrar o tecido do fígado ao longo dos vasos sanguíneos aos 16 dias após a eclosão. No presente trabalho não foram visualizadas as partes endócrinas produtoras de insulina e glucagon do pâncreas (as Ilhotas de Langherans), talvez por se tratar de um tecido disperso entre os ácinos ou em baixas quantidades em relação à parte exócrina deste órgão, necessitando que outros estudos avaliem através de ensaios imuno-histoquímicos específicos a exata localização destas células endócrinas. A parte exócrina, envolvida na secreção de suco pancreático no duodeno, está desenvolvida desde às 48 haf, revelando a sua importância diante da digestão do alimento, uma vez que o estômago ainda não está funcional neste período. De forma análoga, o fígado também permite às 48 haf a visualização dos grânulos de glicogênio acumulado, com coloração de PAS. STROBAND e DABROWSKI (1981) sugerem que estas reservas de glicogênio sejam possivelmente provenientes do conteúdo do saco vitelínico que foram

transportadas pelo sistema vascular até o fígado.

## 2.6 Conclusão

O dourado apresenta um desenvolvimento extremamente rápido quanto ao sistema digestório, apresentando suas maiores modificações morfológicas e em funcionalidade entre as 48 e 72 haf. As formações do fígado e do pâncreas tiveram início muito precocemente (às 18 haf), quando um grupo de células precursoras de cada órgão foi reconhecido na parte cranial e superior do saco vitelínico da larva. As características típicas das células destes órgãos foram observadas às 48 haf, quando os primeiros hepatócitos e estruturas de ácinos do pâncreas puderam ser observados. Neste período começou o armazenamento de glicogênio no fígado e às 96 haf, tanto esse como o pâncreas pareciam completamente formados, somente aumentando de tamanho.

O esôfago e o esfíncter esofágico estão formados às 48 haf, bem como a boca e o ânus já estão abertos, sendo que a larva inicia sua alimentação exógena após as 48 haf, podendo-se encontrar restos alimentares em avançado estado de digestão no estômago de larvas de dourado às 72 haf. O estômago começa a demonstrar alguma função a partir das 96 haf, porém somente forma glândulas gástricas entre o 5º e o 8º daf.

O revestimento do intestino começou a formar dobras da mucosa desde as 48 haf, e este tem papel fundamental para a larva na digestão e absorção dos alimentos até a funcionalidade do estômago após o início da alimentação exógena, sendo auxiliado pelo fígado e pelo pâncreas.

## 2.7 Referências bibliográficas

BALON, E. Terminology of intervals in fish development. **J. Fish. Res. Board Can.**, v. 32, p. 1663-1670, 1975.

BRANCROFT, J.D., STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 4ª ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766 p.

BORÇATO, F. L., BAZZOLI, N., SATO, Y. Embryogenesis and larval ontogeny of "piau-gordura" *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 1, p. 117-122, 2004.

CESTAROLLI, M. A. **Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (AGASSIZ, 1829): Aspectos da alimentação e do desenvolvimento de estruturas sensoriais**. 2005. 110 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

- CHEN, B. N. et al. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. **Aquaculture**, v. 256, p. 489-501, 2006.
- DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present state of art and perspectives. **Reproduc Nutr. Develop.**, v. 24, n. 6, p. 807-833, 1984.
- GÉRY, J.; LAUZANNE, L. Les types des espèces du genre *Salminus* Agassiz, 1829 (Ostariophysi, Characidae) du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. **Revue Internationale d'Ichtyologie**, v. 14, n. 2, p. 113-124, 1990.
- GISBERT, E., RODRIGUES, A., CASTELLÓ ORVAY, F., WILLOT, P. A histological study of development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny., **Aquaculture**, v. 167, p. 195-209, 1998.
- GISBERT, E., SARASQUETE, M., WILLOT, P., CASTELLÓ ORVAY, F. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 596-616, 1999.
- LANE, E. B.; WHITEAR, M. Sensory structures at the surface of fish skin I. Putative chemoreceptors. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 75, p. 141-151, 1982.
- LAUER, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. Porto Alegre: ARTMED, 2006.
- LUZ, R. K. et al. Larvicultura de dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849), nos primeiros dias de vida. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA (SIMBRAq), 10., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sonopress, 2000. Não paginado, CD-ROM.
- MACHADO, C. C. **Exigência protéica de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis***. 2004. 33 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- MORRISON, C. M.; WRIGHT Jr, J. R. A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. **Journal of Fish Biology**, v. 54, p. 597-606, 1999.
- MORRISON, C. M., POHAJDAK, B. TAM, J., WRIGHT Jr, J. R. Development of the islets, exocrine pancreas, and related ducts in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Journal of Morphology**, v. 261, p. 377-389, 2004.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr, C. J. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729p.
- RIBEIRO, L., SARASQUETE, C., DINIS, M. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaupp, 1858) larvae. **Aquaculture**, v. 171, p. 293-308, 1999.
- RIO GRANDE DO SUL (Estado). Decreto nº 41.672, de 10 junho de 2002. **Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2002. 52p.
- REUTTER, K. Taste organ in the barbell of the bullhead. In: HARA, T. J. (Ed.) **Chemoreception in fishes**. New York: Elsevier, 1982. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, n. 8, p. 77-91.
- ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1ª ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. p. 9-285.
- SCHÜTZ, J. H.; NUÑER, A. P. O. Growth and survival of dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 435-444, 2007.

STROBAND, H., DABROWSKI, K. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh water fish larvae. In **La Nutrition des Poissons**. Fontaine M.Ed. Paris, 1981, 355-376 p.

VEGA-ORELLANA, O. M.; FRACALOSSO, D. M.; SUGAI, J. K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. **Aquaculture**, v. 252, p. 484-493, 2006.

VERRETH, J. TORRELE, E.ESPAZIER, E. The development of a functional digestive system in the african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 23, n. 4, p. 287:289, 1992.

ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 655-659, 1996.

ZANIBONI FILHO, E. **Piscicultura das espécies nativas de água doce**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1997. p. 20.

**3 CAPÍTULO 3 - Efeitos da Transição Alimentar Precoce em Dourado**  
***Salminus brasiliensis***

## Efeitos da transição alimentar precoce de Dourado *Salminus brasiliensis* – Experimento Piloto (2007)

Mônica Giacometti Mai <sup>1\*</sup>, Rodrigo Takata <sup>2</sup>, Olívia Cristina Camilo Menossi <sup>2</sup>, Thiago Mendes de Freitas <sup>2</sup>, Maria Célia Portella <sup>2</sup>, José Roberto Verani <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, Km 235, Cx. Postal 676, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista - Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14.884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

### Resumo

Visando contribuir com a tecnologia de cultivo do dourado *Salminus brasiliensis*, uma espécie nativa do Brasil que apresenta alto valor econômico, o presente estudo avaliou os efeitos da transição alimentar precoce na sobrevivência de dourado, utilizando protocolos gradual ou em co-alimentação. Os alimentos utilizados foram larvas forrageiras de piau *Leporinus obtusidens* (L), artêmia viva (A), biomassa congelada de artêmia (B) e coração bovino (C) na transição abrupta ou gradual (co-alimentação) desses itens com dieta comercial formulada (DC). Embora preliminares, os resultados têm mostrado que o coração bovino conduziu a resultados mais pobres na sobrevivência na transição gradual e mortalidade total na transição abrupta. Os tratamentos com larvas forrageiras foram os mais bem sucedidos (sobrevivência de  $20,5 \pm 13,10$  para L,  $11,25 \pm 9,39$  para P + DC), seguido pelo tratamento A. No entanto, recomenda-se que este experimento deva ser reconduzido, a fim de confirmar os resultados principalmente quanto à prática de co-alimentação, que foram afetados pelo nível de amônio na água.

**Palavras-chave:** weaning, transição alimentar, co-alimentação, larvicultura.

### 3.1 Introdução

O dourado *Salminus brasiliensis* é uma espécie de peixe neotropical ameaçada pela poluição, sobrepesca e construção de barragens para fins de

geração de energia hidrelétrica (KOCH et al., 2000). Estas construções são bastante comuns no Brasil e impedem que o dourado e outros peixes completem suas migrações reprodutivas.

É sabido que o desenvolvimento precoce de *S. brasiliensis* em cativeiro é o período mais crítico para a sua produção, e não raramente mortalidades da ordem de 90% são atingidas, dificultando o estabelecimento de sua criação comercial. Entre os motivos levantados por diversos autores quanto às dificuldades no cultivo de dourado salientam-se a baixa taxa de fertilização, hábito alimentar carnívoro desde as primeiras horas de vida, os altos índices de canibalismo e a inabilidade das larvas em aceitar dietas artificiais precocemente, gerando a necessidade de se usar alimentos vivos no início dos cultivos (WOYNAROVICH e SATO, 1989, KUBITZA, 1995, ZANIBONI FILHO, 1997, LUZ et al., 2000).

Neste contexto, o processo de transição alimentar é altamente recomendado para esta espécie, reduzindo o tempo de uso do alimento vivo, mas existe pouca informação disponível.

Este trabalho visa fornecer informações sobre a transição alimentar precoce de dourado *S. brasiliensis* para os aquicultores, a fim de melhorar seus métodos de alimentação e tratamento de rotina, culminando, em última instância, em melhores sistemas de produção deste peixe para a alimentação e pesca esportiva, protegendo os espécimes selvagens contra a exploração excessiva.

## **3.2 Objetivo**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da transição alimentar precoce sobre a sobrevivência, peso e comprimento de *S. brasiliensis* utilizando diferentes tipos de alimentos atrativos, tais como peixes forrageiros (larvas de piauí *Leporinus obtusidens*) (L), artêmia viva (A), biomassa de artêmia congelada (B), dieta comercial formulada (DC), e coração bovino (C), em transição abrupta ou gradual (co-alimentação).

## **3.3 Materiais e Métodos**

### **3.3.1 Obtenção e manejo das larvas de dourado**

Durante o mês de dezembro de 2007 foram obtidas as larvas de

dourado *S. brasiliensis* de reprodutores mantidos em cativeiro na piscicultura Pirajuba (Porto Ferreira – SP), por meio de indução hormonal com extrato de pituitária de carpa, segundo protocolo desenvolvido por Zaniboni-Filho e Barbosa (1996).

As larvas permaneceram nas incubadoras por 4 dias, recebendo 3 dias de alimentação com larvas de piau *Leporinus obtusidens* após a abertura da boca, que ocorreu aproximadamente 24 horas após a eclosão.

Ao final do terceiro dia, as larvas foram transportadas para o Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Aqüicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP.

### 3.3.2 Delineamento experimental

No quarto dia de alimentação exógena com larvas forrageiras de piau, as larvas de dourado *S. brasiliensis* foram divididas em 27 caixas com 180L de capacidade, recebendo 100 larvas cada, nos seguintes tratamentos:

Transição direta para

- Dieta comercial formulada com 59 % de proteína (DC)
- Larva forrageira de piau (L)
- Artêmia viva (A)
- Biomassa congelada de artêmia (B)
- Coração bovino (C)

Transição gradual para ração acrescida dos mesmos alimentos (L+DC, A+DC, B+DC, C+DC), sendo estes oferecidos 10 minutos antes da ração.

A transição teve duração de 5 dias, começando no quarto e terminado no oitavo dia após o início da alimentação exógena. O oferecimento foi realizado 8 vezes ao dia, com intervalo médio de 3 horas (3 am, 6 am, 9 am, 12 pm, 15 pm, 18 pm e 21 pm e, 24 pm).

A quantidade oferecida dos alimentos DC, B e C para os tratamentos em cada uma das alimentações foi padronizada (colher medida), sendo que o peso para cada um desses alimentos foi de 2g, 2g e 7 g por medida, respectivamente. Esta quantidade foi reduzida a menos da metade no segundo dia, pois demonstrou

ser excessiva, prejudicando a qualidade da água pela elevação da concentração de amônia.

A quantidade de larvas forrageiras seguiu o consumo indicado para dourado nos estudos realizados por WEINGARTNER et al.(2003) e WEINGARTNER e ZANIBONI FILHO 2005, ou seja, uma média estimada de 12 larvas forrageiras (L) por larva de dourado no quarto dia de alimentação, 20, 30, 45 e 50 L por larva de dourado no quinto, sexto, sétimo e oitavo dias de alimentação, respectivamente, divididas em oito alimentações diárias.

A artêmia viva foi oferecida com base na quantidade consumida pelo pintado *Pseudoplatystoma coruscans* com peso similar (TAKATA, 2006), ou seja, 1000 náuplios para o quarto dia (peso médio do dourado de 0,0028g), que foi aumentado para 2000, 3000, 4000 e 5000 no quinto, sexto, sétimo e oitavo dias de alimentação, respectivamente, igualmente divididas em oito alimentações diárias.

### **3.3.3 Qualidade de água e biometrias**

A temperatura média da água durante todo experimento foi de  $26,7 \pm 0,5$  ° C e a concentração de oxigênio média foi de  $5,3 \pm 0,7$ mg/L. A renovação da água e a aeração dentro das unidades experimentais foram constantes. Somente no segundo dia foram coletadas amostras de água para análise de amônia, nitrito e nitrato, devido à ocorrência aguda de mortes de larvas em alguns tratamentos.

O peso inicial das larvas de dourado foi anotado, sendo que foram realizadas duas biometrias e contagem da sobrevivência, a primeira ao final dos 5 dias de transição alimentar, e a segunda ao final de uma semana de cultivo após a transição alimentar, utilizando exclusivamente ração comercial como alimento.

### **3.3.4 Análise Estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos a teste de Análise de Variância (ANOVA)/ Kruskal Wallis (ANOVA NÃO PARAMÉTRICA) e teste Tukey/ teste Dunn para separação de médias utilizando o programa GraphPad InStat versão 3.0 (GraphPad InStat Inc.).

## **3.4 Resultados e Discussão**

### 3.4.1 Sobrevivência

Os tratamentos que receberam coração bovino (C) apresentaram mortalidade total na transição alimentar abrupta e resultados muito pobres na transição gradual (C+DC = 1,75% de sobrevivência) ao final do experimento. Estes tratamentos foram excluídos das análises estatísticas, porém ainda serão brevemente comentados na discussão para que se registrem os resultados obtidos com este alimento, tão comumente empregado em larvicultura de outras espécies carnívoras.

### 3.4.2 Sobrevivência após 5 dias de transição alimentar

Ao final de cinco dias de transição alimentar, as taxas de sobrevivência (em %) dos tratamentos utilizando o protocolo abrupto foram  $66,00 \pm 10,98$  (L),  $56,00 \pm 3,55$  (A),  $18,25 \pm 8,99$  (DC),  $8,75 \pm 5,18$  (B) ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos L e A foram agrupados e apresentaram elevada sobrevivência, mostrando diferença estatística significativa dos tratamentos DC e B, que formaram um grupo de baixa sobrevivência (Fig.1A).

Devido ao fracasso da transição alimentar gradual, uma comparação com a transição abrupta não foi realizada, mas algumas taxas de sobrevivência relevantes ainda foram obtidas (Fig.1B), como  $44,50 \pm 36,79$  (L + DC),  $9,25 \pm 8,09$  (A + DC) e  $8,50 \pm 10,34$  (B + DC), apresentando diferenças significativas entre estes tratamentos ( $p < 0,05$ ), e indicando que o L + DC foi o tratamento que apresentou maior sobrevivência.

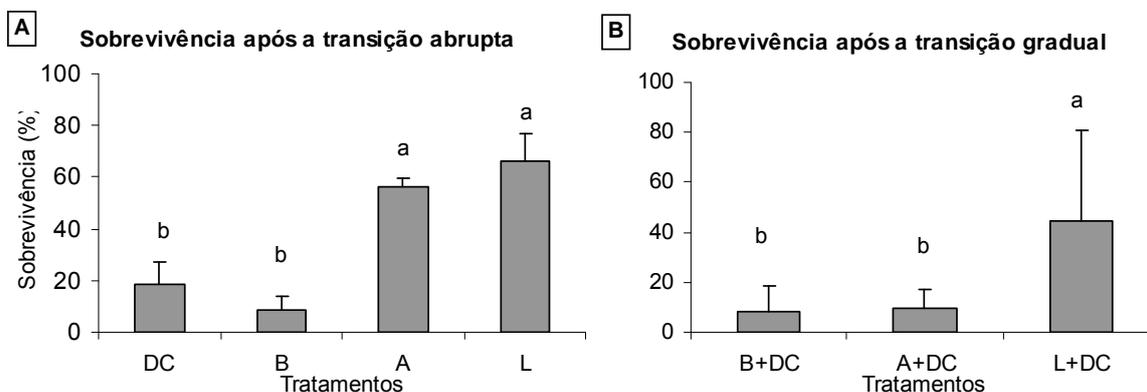


Figura 1 - Dados de sobrevivência de larvas de dourado *S. brasiliensis* submetidas a 5 dias de transição alimentar: A – abrupta; B – gradual.

### 3.4.3 Sobrevivência após uma semana com dieta comercial

Depois de uma semana recebendo dieta comercial com 59% de proteína como único alimento, a sobrevivência das larvas da transição alimentar abrupta diminuiu, apresentando (em %) valores iguais a  $20,5 \pm 13/10$  (L),  $2,25 \pm 1,25$  (A),  $3,5 \pm 1,29$  (DC),  $4 \pm 1,63$  (B) (Fig.2A). Apenas o tratamento L diferiu dos outros, apresentando a maior sobrevivência ( $p < 0,05$ ). A mesma diferença foi encontrada para os tratamentos com transição gradual ( $p < 0,05$ ), indicando que a taxa de sobrevivência de  $11,25 \pm 9,39$  (L + DC) diferiu dos valores  $1,5 \pm 1,29$  (A + DC) e  $2,0 \pm 0,81$  (B + DC) (Fig. 2B).

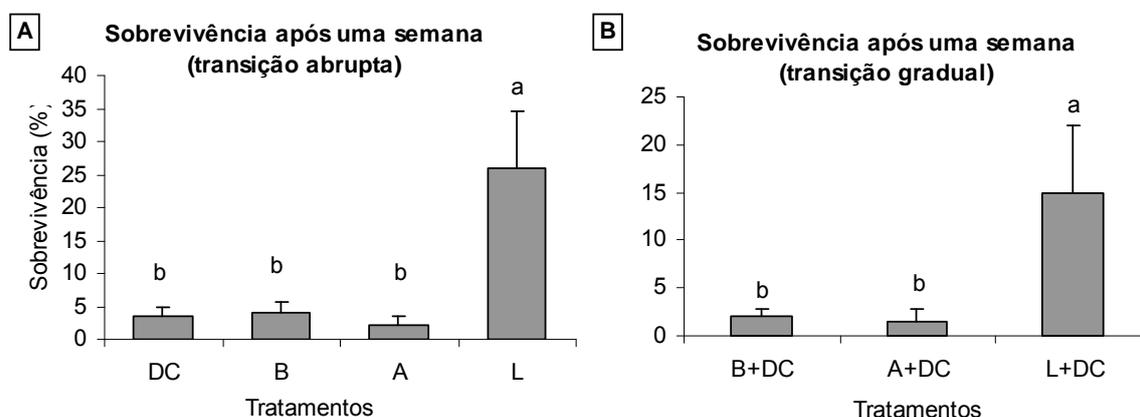


Figura 2 Dados de sobrevivência de larvas de dourado *S. brasiliensis* submetidas a uma semana de alimentação apenas com ração comercial, após os tratamentos de transição alimentar. Em A – transição abrupta; em B – transição gradual.

### 3.4.4 Qualidade da água e biometrias

Na maioria dos tratamentos utilizando a co-alimentação, foi observado um aumento nos níveis de amônia, atingindo valores considerados letais para juvenis de dourado, segundo Serafini 2004 (CL 50-96h =  $0,525 \text{ mg NH}_3 / \text{L}$  com nível de oxigênio de  $4,92 \text{ mg O}_2 / \text{L}$ ) e conseqüentemente, foram observadas altas mortalidades em alguns tanques durante o experimento, indicando que as larvas são tão sensíveis a amônia quanto os juvenis.

No caso do tratamento utilizando coração bovino, não foram atingidos níveis superiores a 0,43 mg NH<sub>3</sub>/L, porém foi observada mortalidade total, provavelmente relacionada à dificuldade de ingestão deste alimento.

O peso e comprimento inicial (primeiro dia da transição alimentar) das larvas de dourado no quarto dia após a eclosão foram, respectivamente, 0,0193g e 13,80mm. Embora tenha havido diferenças significativas de peso e comprimento entre os tratamentos, as análises do fator de condição relativa não resultaram em diferenças significativas entre eles. A relação peso-comprimento geral para o dourado é mostrada na Fig. 3.

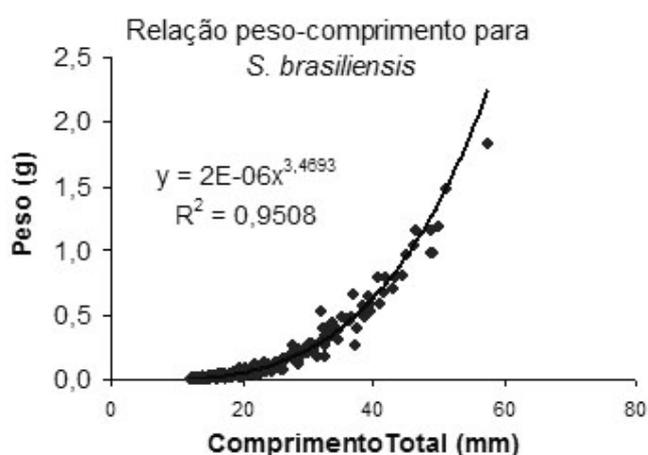


Figura 3 Relação peso comprimento durante o experimento que descreve o crescimento do dourado *S. brasiliensis*.

Estes resultados são preliminares e mais estudos são necessários para melhorar as taxas de sobrevivência durante a larvicultura de dourado. No entanto, estes resultados podem ser usados como um guia do tipo de alimentação possível em fases iniciais para este peixe.

Nesse contexto, uma alimentação de rotina usada para peixes carnívoros no Brasil (coração bovino) pode ser descartada, devido as taxas de sobrevivência muito pouco eficientes encontradas.

No tratamento com coração bovino, mesmo que este alimento tenha sido triturado duplamente em açougue antes de ser oferecido, foi constatado que algumas larvas morreram tentando ingerir de forma ineficiente este alimento, devido às suas fibras e ao tamanho insatisfatório. De maneira contrária, nesse mesmo tratamento, outras larvas apenas não se alimentaram e morriam ou de inanição ou, mais comumente, eram predadas por larvas maiores. O desinteresse dessas larvas

pode também refletir a falta de atratividade química desse item alimentar, sua pouca motilidade e fluvariabilidade, ou todos esses fatores combinados.

Por outro lado, a utilização de Artêmia viva na transição abrupta mostrou-se como uma possível solução em caso de falta de peixe forrageiro no início do desenvolvimento de dourado.

As baixas taxas de sobrevivência em todos os tratamentos deste experimento são principalmente causadas por canibalismo ligado à heterogeneidade de tamanho entre as larvas e à falta de uma alimentação adequada, desafios a serem superados para o sucesso da larvicultura de muitos peixes carnívoros.

O manejo alimentar realizado com intervalos próximos, como os de 3 horas usado neste experimento, demonstra alta eficiência na prevenção ao canibalismo, sendo importante ressaltar que os primeiros casos deste comportamento observados neste experimento ocorreram apenas quando houve o atraso de alimentação da madrugada do quinto dia de testes, sendo que os indivíduos canibais foram retirados das unidades experimentais para evitar a heterogeneidade de tamanho que propiciaria a continuidade deste comportamento alimentar. Em contrapartida, este tipo de manejo demanda que haja um nível de dedicação elevado de trabalho humano e gera a necessidade de limpeza constante das unidades experimentais para evitar a deterioração da qualidade da água. Além destes fatores, o constante manejo também aumenta o nível de estresse dos animais, colaborando para que haja mais agressividade ou perda de apetite nos peixes.

### **3.5 Conclusão**

Os tratamentos com larvas forrageiras mostraram as maiores taxas de sobrevivência em comparação com os outros tratamentos. Coração bovino induziu ao pior desempenho, tanto em regime de co-alimentação quanto em transição abrupta. Pode ser observado que artêmias vivas e congeladas permitem um certo crescimento e sobrevivência, e poderiam ser utilizadas como alimento para o dourado em fases iniciais. De qualquer forma, sugere-se confirmar estes resultados, especialmente com relação à quantidade de dieta inerte oferecida aos tratamentos em co-alimentação, numa tentativa de evitar altas concentrações de amônia.

### **3.6 Agradecimentos**

Gostaríamos de agradecer a todo o apoio dado pelos proprietários da Piscicultura Pirajuba (Elizabeth Prada Foz e Daniel Junqueira) por doarem as larvas de dourado para a realização dos testes no ano de 2007. Somos igualmente gratos à CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado para M. Mai e ao MCT / CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

## **Efeitos da transição alimentar precoce de Dourado *Salminus brasiliensis* – experimento definitivo (2008)**

### **3.1 Introdução**

Com o intuito de melhorar o experimento piloto de transição alimentar previamente testado, um novo experimento foi realizado, sendo que a introdução, os objetivos e os materiais e métodos foram essencialmente os mesmos, sendo acrescentadas apenas as informações das alterações introduzidas neste experimento definitivo, a fim de tornar mais breve essa descrição inicial.

### **3.2 Materiais e Métodos**

#### **3.2.1 Obtenção e manejo das larvas de dourado**

As larvas de dourado *S. brasiliensis* foram obtidas no mês de dezembro de 2008, como descrito no experimento piloto e foram igualmente manejadas e transferidas para as unidades experimentais.

#### **3.2.2 Delineamento experimental**

No quarto dia de alimentação exógena com larvas forrageiras de piau, as larvas de dourado foram divididas em 27 caixas com 50L de capacidade, recebendo 100 larvas cada, nos mesmos tratamentos:

Transição direta para

- Ração comercial formulada com 59 % de proteína (DC)
- Larva forrageira de piau (L)
- Artêmia viva (A)
- Biomassa congelada de artêmia (B)
- Coração bovino (C)

Transição gradual para ração dos mesmos alimentos (L+DC, A+ DC, B+ DC, C+ DC), sendo estes oferecidos 10 minutos antes da ração.

A transição teve duração de 5 dias, começando no quarto e terminado no oitavo dia após o início da alimentação exógena. O oferecimento foi realizado 5 vezes ao dia, com intervalo médio de 4 a 5 horas ( 6 am, 11 am, 16 pm, 20 pm e, 1

am).

As quantidades oferecidas dos alimentos DC, B e C para os tratamentos em cada uma das alimentações foram padronizadas (colher medida), sendo que o peso para cada um desses alimentos foi de 1g, 1g e 2 g por medida, respectivamente, tendo como base o primeiro experimento realizado um ano antes.

A quantidade de larvas forrageiras e artêmia viva foram repetidas do experimento anterior, porém dividida em 5 alimentações diárias.

### **3.2.3 Qualidade de água e biometrias**

A temperatura média da água durante todo experimento foi de  $28,07 \pm 0,79$  °C e a concentração de oxigênio média foi de  $6,52 \pm 0,20$  mg/L. A renovação da água e a aeração dentro das unidades experimentais foram constantes. Apesar da constante renovação da água nas unidades experimentais, devido à ocorrência aguda de mortes de larvas durante o primeiro experimento, foram coletadas amostras de água para análise de amônia, nitrito e nitrato durante o último dia da transição alimentar, ou seja, o oitavo dia de alimentação (equivalente ao nono dia após a fertilização).

As biometrias e contagens de sobrevivência foram feitas como no primeiro experimento, a primeira ao final dos 5 dias de transição alimentar, e a segunda ao final de uma semana de cultivo após a transição alimentar, utilizando exclusivamente ração comercial como alimento.

### **3.2.4 Análise Estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos a teste de Análise de Variância (ANOVA)/ Kruskal Wallis (ANOVA NÃO PARAMÉTRICA) e teste Tukey/ teste Dunn para separação de médias utilizando o programa GraphPad InStat versão 3.0 (GraphPad InStat). Quando houve diferença significativa verificada pelo método de Kruskal Wallis, não ocorrendo separação das médias pelo teste Dunn, foi verificada a existência das diferenças comparando-se os tratamentos par a par com o auxílio do teste de Mann-Wittney.

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Sobrevivência

Nenhum tratamento apresentou mortalidade total na transição alimentar abrupta ou gradual durante o segundo experimento (2008) após o período de transição alimentar, porém foram obtidas taxas de sobrevivência mais baixas com relação à maioria dos tratamentos nesta fase comparados aos testes realizados em 2007, como mostra a Tabela 1:

Tabela 1 Tabela comparativa das sobrevivências entre os experimentos de transição alimentar de 2007 e 2008.

Protocolo Alimentar e Tratamentos	Sobrevivência (média e desvio padrão em %)				
	após transição alimentar 2007	Final 2007	após transição alimentar 2008	Final 2008	
L	66,00 ± 10,98	<b>26 ± 8,71</b>	60,66 ± 7,09	<b>19,33 ± 13,27</b>	
A	56,00 ± 3,55	<b>2,25 ± 1,25</b>	6,33 ± 2,08	<b>1,0 ± 0</b>	
Abrupto	DC	18,25 ± 8,99	<b>3,50 ± 1,29</b>	8,00 ± 3,00	<b>1,66 ± 1,15</b>
	B	8,75 ± 5,18	<b>4,00 ± 1,63</b>	4,00 ± 1,00	<b>Excluído</b>
	C	0	<b>0</b>	1,66 ± 0,57	<b>Excluído</b>
Gradual	L+DC	44,50 ± 36,79	<b>15,00 ± 6,92</b>	45,66 ± 4,61	<b>23,00 ± 5,56</b>
	A+DC	9,25 ± 8,09	<b>1,50 ± 1,29</b>	4,66 ± 0,94	<b>1,0 ± 0</b>
	B+DC	8,50 ± 10,34	<b>2,00 ± 0,81</b>	4,00 ± 1,00	<b>Excluído</b>
	C+DC	1,75 ± 1,70	<b>Excluído</b>	4,00 ± 1,70	<b>Excluído</b>

##### 3.3.1.1 Sobrevivência após 5 dias de transição alimentar

Ao final de cinco dias de transição alimentar, se compararmos todos os tratamentos graduais e abruptos conjuntamente (Fig.4), as diferenças estatísticas apontam que, no experimento realizado ao final do ano de 2008, somente o tratamento que usou a transição abrupta de coração bovino diferiu tanto do que utilizou somente larva forrageira, quanto do que usou este alimento combinado à dieta comercial. Nenhuma outra diferença estatística foi detectada entre os outros tratamentos.

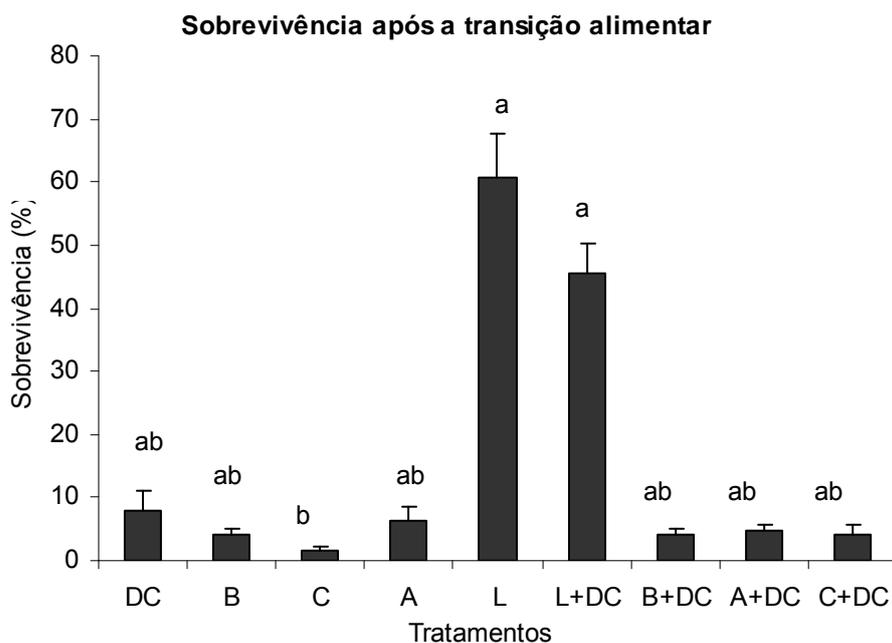


Figura 4 Dados de sobrevivência de larvas de dourado *S. brasiliensis* submetidas a 5 dias de transição alimentar.

Também, como foi feito no experimento de 2007, são mostrados separadamente para comparação, os gráficos de sobrevivência após a transição alimentar entre os protocolos abrupto (Fig.5A) e gradual (Fig.5B), que visualmente são mais demonstrativos, além do gráfico anterior que combina todos os tratamentos entre si.

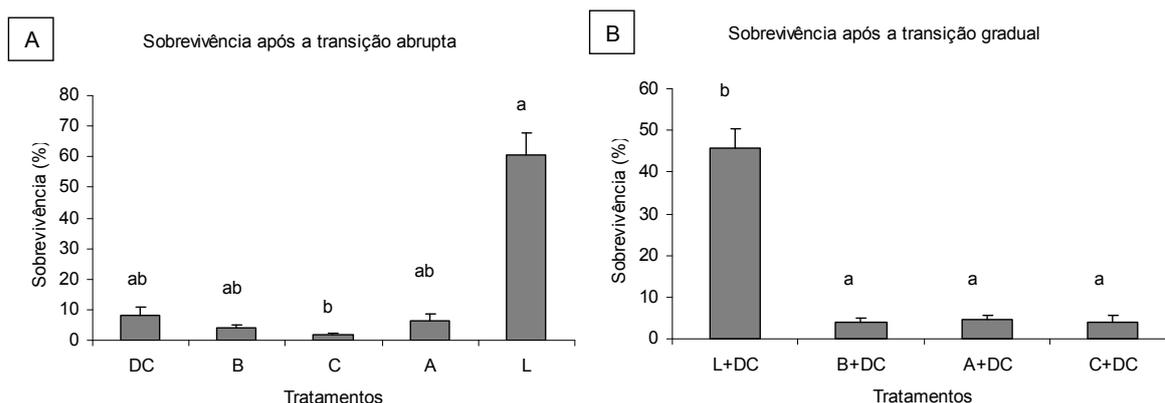


Figura 5 Dados de sobrevivência de larvas de dourado *S. brasiliensis* submetidas a 5 dias de transição alimentar: A – abrupta; B – gradual.

### 3.3.1.2 Sobrevivência após uma semana com dieta comercial

Depois de uma semana recebendo dieta comercial com 59% de proteína como único alimento, a sobrevivência das larvas diminuiu, assim como no

experimento de 2007 (Fig. 6).

Pode ser observado na tabela 1 para os resultados de 2008, que os tratamentos que apresentaram sobrevivência inferior a 5% do total inicial após a transição foram descontinuados por serem considerados ineficientes, sendo eles os seguintes: biomassa de artêmia congelada e coração bovino, assim como a combinação destes com ração (B; C; B+DC;C+DC).

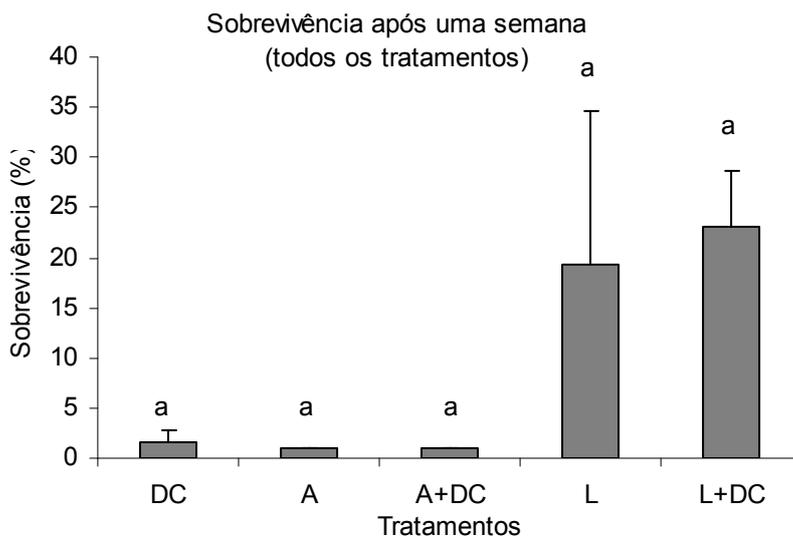


Figura 6 Dados de sobrevivência de larvas de dourado *S. brasiliensis* submetidas a uma semana de alimentação apenas com ração comercial, após os tratamentos de transição alimentar

Assim como foi feito para a sobrevivência após a transição alimentar, a sobrevivência final foi separada pelos diferentes protocolos de alimentação (Fig.7 A e B). Quando realizadas as análises estatísticas de cada grupo separadamente (entre os tratamentos de transição gradual entre si, e entre os tratamentos de co-alimentação entre si), verificou-se que, em ambos os protocolos, os tratamentos que utilizaram larva forrageira apresentaram sobrevivências mais altas que os outros grupos, apesar do alto desvio padrão encontrado, fator comum nos cultivos de peixes carnívoros.

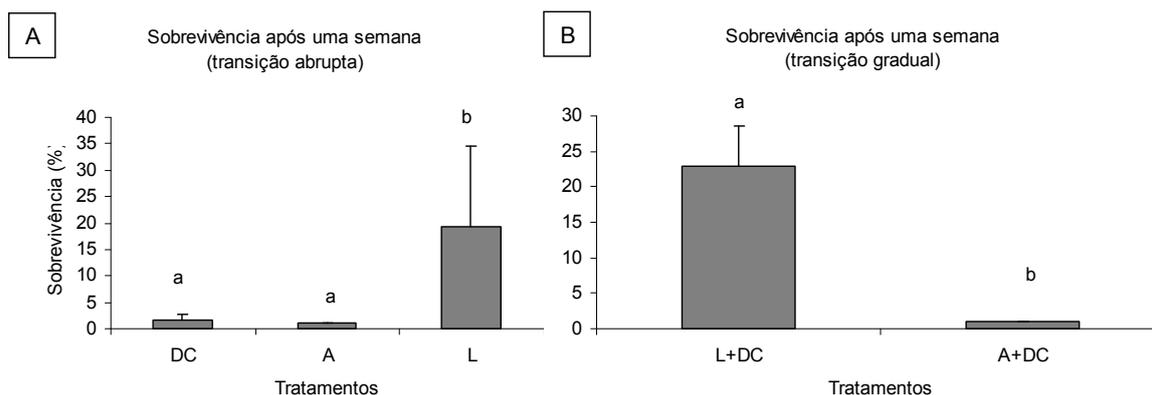


Figura 7 Dados de sobrevivência de larvas de dourado *S. brasiliensis* submetidas a uma semana de alimentação apenas com ração comercial, após os tratamentos de transição alimentar. Em A – transição abrupta; em B – transição gradual.

Pode-se inferir a partir dos gráficos de sobrevivência que as larvas que apresentam maiores valores de peso e comprimento correspondem àqueles tratamentos nos quais as sobrevivências foram menores, caracterizadas pelos altos índices de canibalismo, fator que em última instância culmina numa grande heterogeneidade de tamanho, elevando as médias dos pesos e comprimentos destes tratamentos, acompanhados por desvios-padrão altos.

### 3.3.2 Qualidade da água e biometrias

A redução no número de arraçoamento e da quantidade de alimento oferecido em cada alimentação tiveram efeito positivo na manutenção da qualidade da água, sendo o nível médio de amônia aferido igual a 0,25 mg/L, não atingindo os valores de CL 50-96h ( 0,525 mg NH<sub>3</sub> /L com nível de oxigênio de 4,92 mg O<sub>2</sub> /L, segundo Serafini 2004). Em apenas um dos tratamentos foi detectado a presença de nitrito, porém em quantidades muito baixas (C+DC repetição 2, num total de 0,4 µg/L). Ainda assim, as repetições deste tratamento também tiveram sobrevivência inferior a 5 % após a transição alimentar mesmo sem apresentar quantidades detectáveis de nitrito, o que nos permite supor que este não foi o motivo da morte das larvas nas outras repetições de C+DC, tendo como valor letal de nitrito para peixes 0,5mg/L. O valor máximo de nitrato atingido dentre todos os tratamento foi igual a 1,06 mg/L e a média 1,00mg/L, sendo o valor letal de referência igual a 5 mg/L.

O peso e comprimento iniciais (primeiro dia da transição alimentar) das larvas de dourado no quarto dia após a eclosão foram, respectivamente, 0,0193g e 13,80mm. As análises de peso e comprimento entre os tratamentos resultaram em diferenças significativas entre eles, sendo que as representações dessas diferenças após a transição alimentar, e após uma semana alimentadas apenas com ração, mostrada nos anexos I e II.

Apesar do fato de terem ocorrido diferenças significativas de peso e comprimento entre os tratamentos, as análises do fator de condição relativa (Fig.8) não resultaram em diferenças significativas entre eles. A relação peso-comprimento para o dourado durante o experimento é mostrada na Fig. 9.

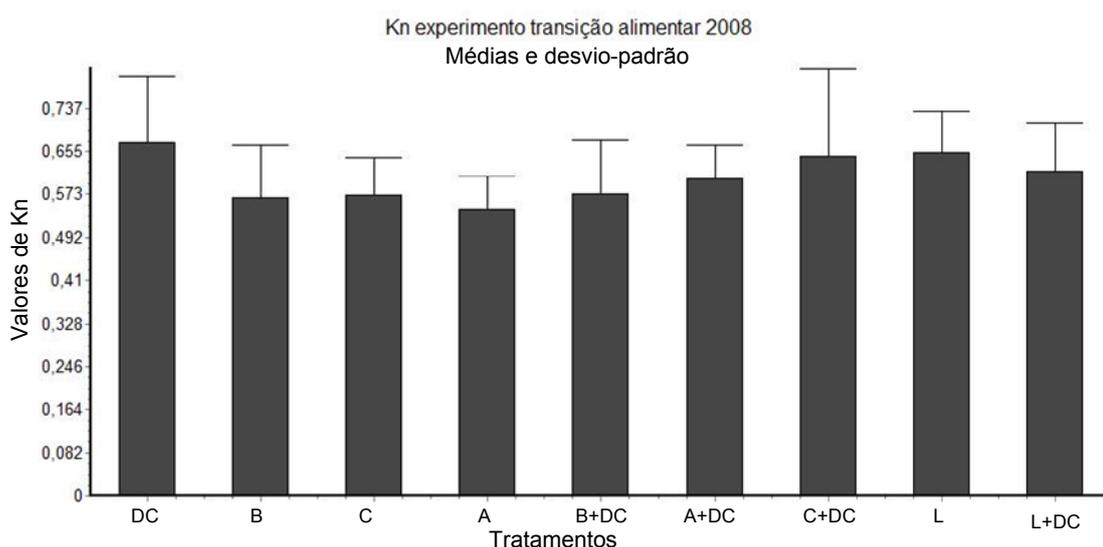


Figura 8 Fator de condição relativa entre os tratamentos logo após os 5 dias de transição alimentar. DC: dieta comercial; B: biomassa congelada de artêmia; C: coração bovino; A: artêmia viva; B+DC: biomassa de artêmia congelada e dieta comercial; A+DC: artêmia viva e dieta comercial; C+DC: coração bovino e dieta comercial; L :larva forrageira; L+DC: larva forrageira e dieta comercial. Não há diferença estatística entre os tratamentos.

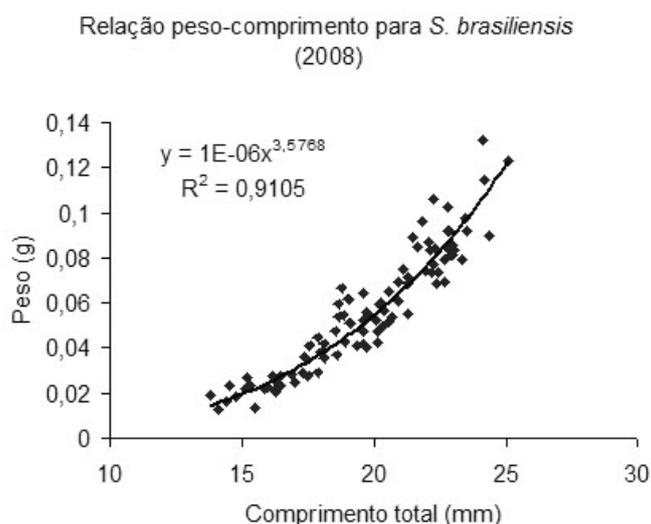


Figura 9 Relação peso comprimento para larvas de dourado *S. brasiliensis*, a partir do experimento de transição alimentar de 2008.

### 3.4 Conclusão

Os tratamentos com larvas forrageiras mostraram as maiores taxas de sobrevivência em comparação com os demais tratamentos. Coração bovino e biomassa de artêmia congelada induziram aos piores desempenhos neste experimento, tanto em regime de co-alimentação, quanto em transição abrupta. Pode ser observado que artêmias vivas usadas no protocolo gradual ou em co-alimentação com ração e, mesmo a ração oferecida diretamente, produzem resultados de sobrevivência muito baixos ao final de 17 dias de experimento, sendo que para em um período curto de tempo, permitiram algum crescimento. Ainda, concluímos que uma dieta ideal não foi identificada para a espécie, especialmente no que tange à quantidade de dieta inerte oferecida, que evite altas concentrações de amônia ao mesmo tempo que atenda às necessidades nutricionais e sejam atrativas para esses peixes durante a larvicultura.

### 3.5 Considerações sobre os experimentos realizados de transição alimentar de dourado

Atualmente a criação comercial do dourado ainda é feita com grande incerteza. Os motivos para isto, na maioria das vezes, são os fatores como as taxas

de fertilização dos peixes, incluindo-se aqueles que servirão de alimento (chamados de peixes forrageiros) no início da larvicultura do dourado, além das dificuldades na hora da desova extrusiva que acarretam na perda dos reprodutores, do precoce hábito alimentar carnívoro e do alto índice de canibalismo nessa espécie.

Não é raro ocorrer a perda de toda - ou quase toda - uma desova de dourado porque os peixes forrageiros não sobrevivem. E, mesmo com o uso de zooplâncton selvagem concomitante aos peixes forrageiros ou na falta desses, as sobrevivências atingidas até um mês de cultivo são consideradas baixas, frente a outras espécies carnívoras.

Outra dificuldade enfrentada pelos pesquisadores e criadores desta espécie voraz e onerosa, é que sua reprodução ocorre apenas uma vez ao ano e com desova total, o que restringe a possibilidade de sucesso ou repetição dos experimentos e dos cultivos propriamente ditos.

O número de alimentações parece ser um fator decisivo para a melhoria da sobrevivência durante a larvicultura do dourado, fato observado durante o experimento piloto de transição alimentar, quando foram administrados diferentes alimentos com alta regularidade (8 vezes ao dia). Nesse teste não foram observadas situações de canibalismo nos primeiros dias, até que ocorreu um intervalo de 5 (ao invés de 3) horas entre as alimentações. Este tipo de manejo alimentar resultou muito trabalhoso e ocasionou perda da qualidade da água devido ao constante input de alimentos nas unidades experimentais. Como forma de evitar a deterioração da qualidade da água, realizaram-se sifonamentos do fundo das unidades experimentais uma hora após cada oferta de alimentos, fator que pode ter gerado maior estresse nas larvas cultivadas, dificultando a interpretação dos resultados do experimento piloto.

No experimento definitivo foram oferecidas 5 alimentações ao dia para melhorar a qualidade da água, reduzindo o manejo e, possivelmente, o estresse das larvas. No entanto, diante dos resultados de sobrevivência obtidos, ainda não foi definida uma dieta ideal durante o período de transição alimentar, sendo necessário mais experimentações para elucidar essa questão.

### **3.6 Agradecimentos**

Gostaríamos de agradecer a todo o apoio dado pelos proprietários da

Pirajuba AquaGenetica (João Campos e Fernando Kubitza) por doarem as larvas de dourado para a realização dos testes. Somos igualmente gratos à CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado para M. Mai e ao MCT / CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

### 3.7 Referências bibliográficas

KOCH, W. R.; MILANI, P. C.; GROSSER, K. M. **Guia ilustrado de Peixes, Parque Delta do Jacuí**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2000. p. 28.

KUBITZA, F. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Campos do Jordão. **Resumos...** Campos do Jordão: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1995, p. 53-68.

LUZ, R. K. et al. Larvicultura de dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849), nos primeiros dias de vida. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA (SIMBRAq), 10., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sonopress, 2000. Não paginado, CD-ROM.

TAKATA, R. **Produção de juvenis de Artemia franciscana e análise da utilização de dietas vivas e inertes na larvicultura intensiva do pintado Pseudoplatystoma coruscans**. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

WEINGARTNER, M.; TATAJE, D. R.; ZANIBONI FILHO, E. Determinacion del consumo diario de larvas forrageiras de curimbata (*Prochilodus lineatus*) por larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) durante la fase inicial de larvicultura. In: SIMPOSIO COLOMBIANO DE ICTIOLOGIA - PECES Y DESARROLLO SOSTENIBLE, 7., 2003, Montería.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. In: Baldisserotto B.; Gomes L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 1ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2005. Cap. 11 (Dourado), p. 257-286. 470 p.

WOYNAROVICH, E.; SATO, Y. Criação especial de larvas e pós-larvas de matrinhã (*Brycon lundii*) e de dourado (*Salminus brasiliensis*). In: WORKSHOP ON LARVAL REARING ON FINFISH, 1989, Pirassununga. **Sumário...** Pirassununga: Canadian International Development Agency, 1989. p. 134-136.

ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 655-659, 1996.

## Anexo I

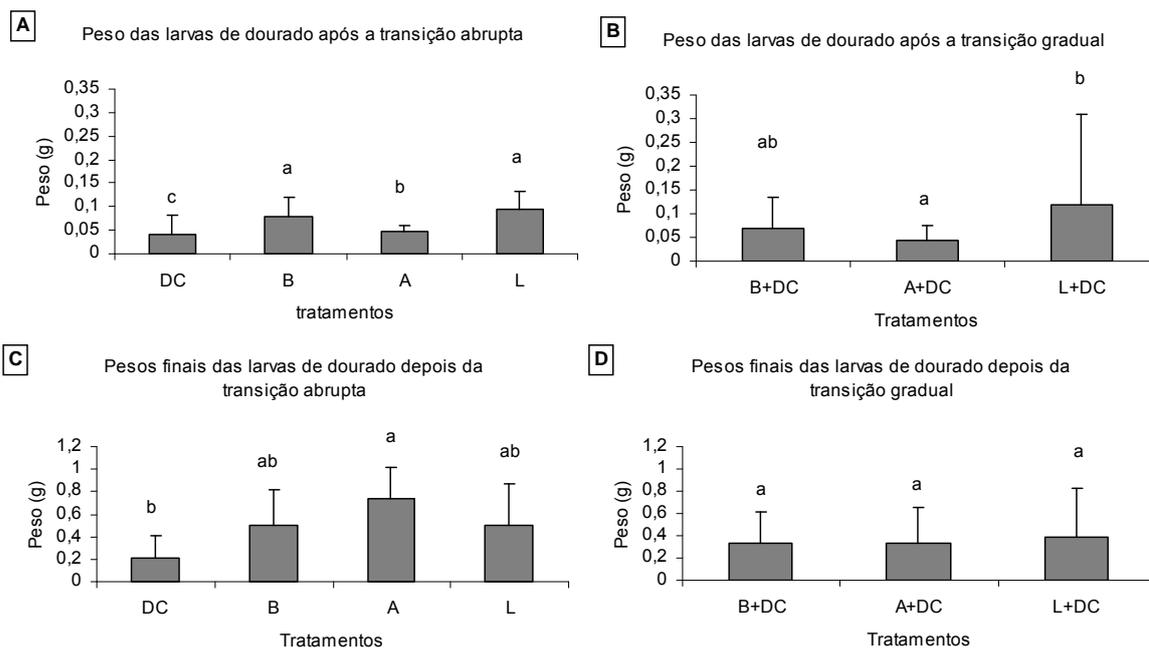


Fig. 10 Diferenças de peso entre as larvas de dourado submetidas a diferentes tratamentos (2007). Em A e C – transição abrupta; em B e D – transição gradual.

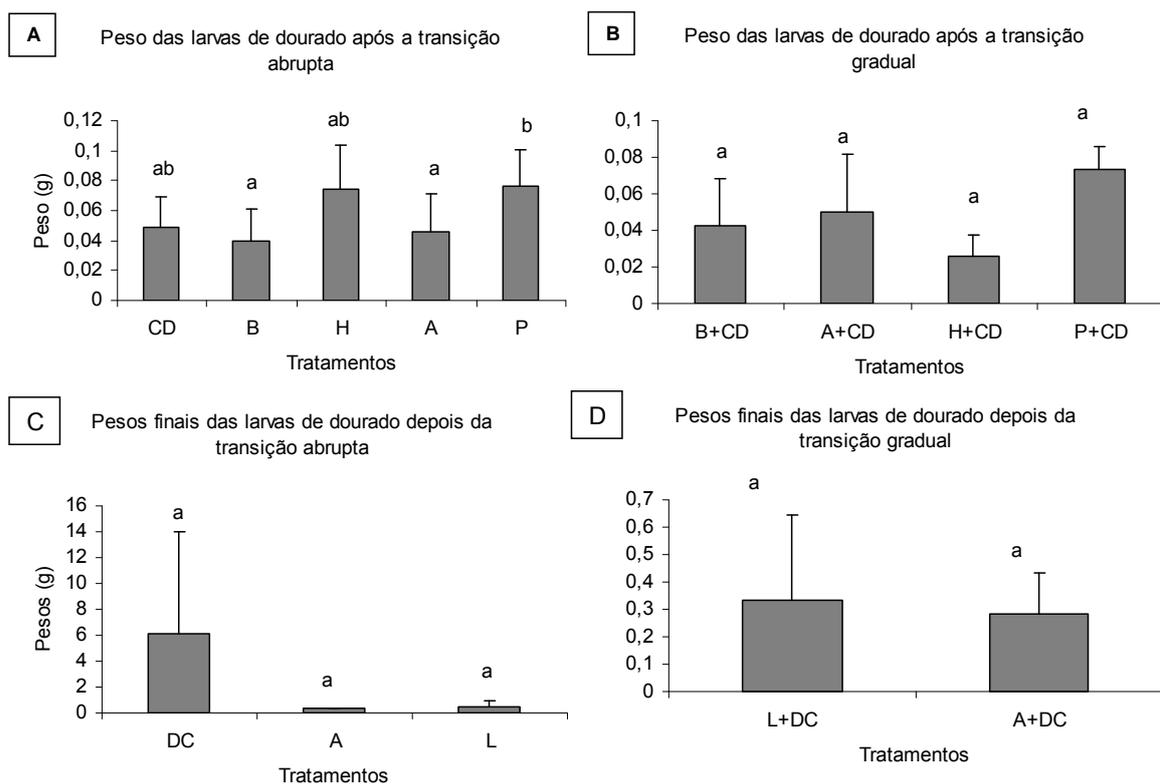


Fig. 11 Diferenças de peso entre as larvas de dourado submetidas a diferentes tratamentos (2008). Em A e C – transição abrupta; em B e D – transição gradual.

## Anexo II

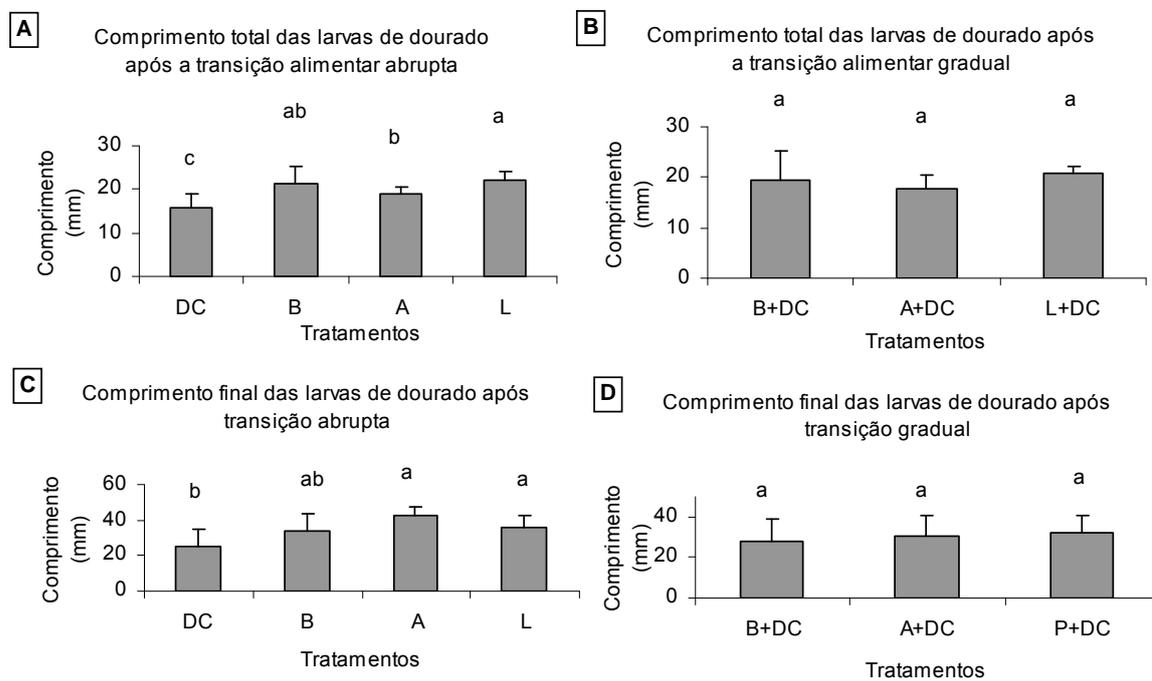


Fig. 12 Diferenças de comprimento entre as larvas de dourado submetidas a diferentes tratamentos (2007). Em A e C – transição abrupta; em B e D – transição gradual.

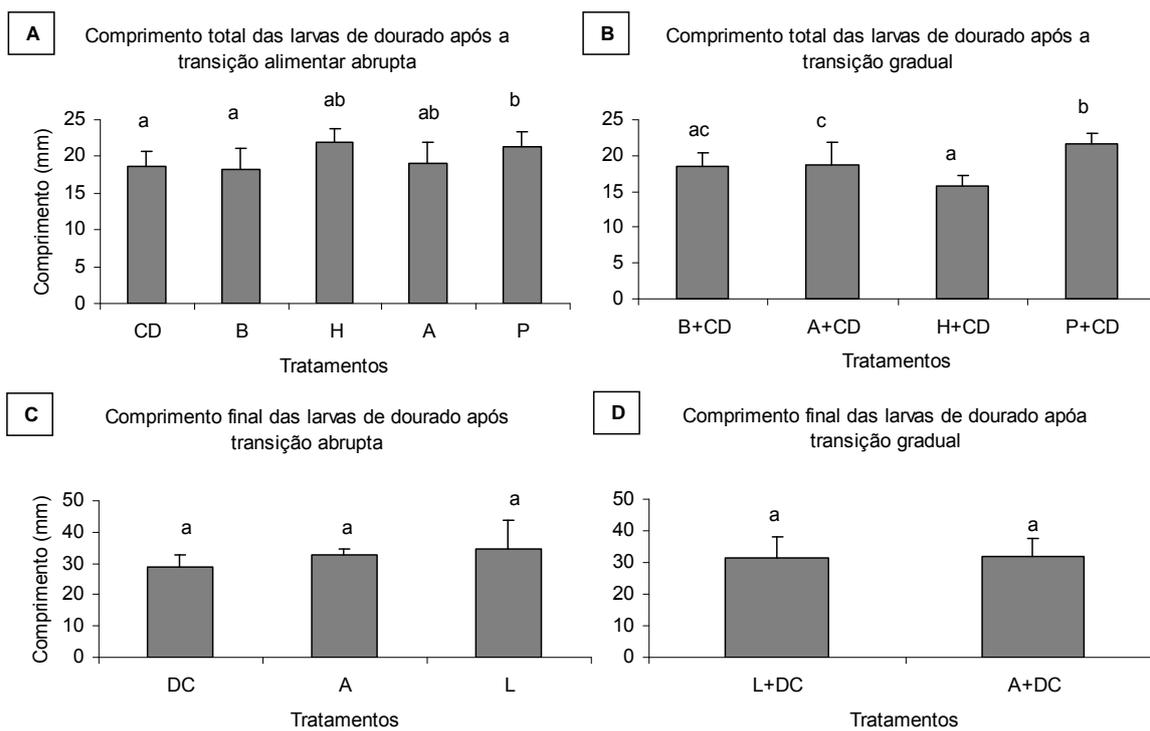


Fig. 13 Diferenças de comprimento entre as larvas de dourado submetidas a diferentes tratamentos (2008). Em A e C – transição abrupta; em B e D – transição gradual.

**4 CAPÍTULO 4 - Co-Alimentação com Alimento Vivo e Dieta Inerte Desde a Primeira Alimentação Afeta a Digestibilidade e Retenção de Lipídios em Larvas de Linguado Senegalense (*Solea senegalensis*)**

\* Este capítulo foi publicado na revista científica **Aquaculture vol. 296 (2009), pag. 284–291**, sob o título:

**Co-feeding of live feed and inert diet from first-feeding affects artemia lipid digestibility and retention in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae**

Mônica Giacometti Mai, Sofia Engrola, Sofia Morais, Maria Célia Portella, José Roberto Verani, Maria Teresa Dinis, Luís E.C. Conceição.

O trabalho corresponde ao estágio de 7 meses em Faro –Portugal, durante o período de abril a outubro de 2008, no âmbito da parceria firmada com a Universidade do Algarve (UALG). A apresentação do texto é feita no formato da Revista Aquaculture, correspondendo às normas e padrões exigidos pela revista em 09/2009, porém traduzido para o português.

1 **Co-alimentação com alimento vivo e dieta inerte desde a primeira alimentação**  
2 **afeta a digestibilidade e retenção de lipídios em larvas de linguado**  
3 **senegalense (*Solea senegalensis*)**  
4

5 Mônica Giacometti Mai<sup>1,2</sup>, Sofia Engrola<sup>1</sup>, Sofia Morais<sup>3</sup>, Maria Célia Portella<sup>4</sup>, José  
6 Roberto Verani<sup>2</sup>, Maria Teresa Dinis<sup>1</sup>, Luís E.C. Conceição<sup>1</sup>

7 <sup>1</sup> CCMAR, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

8 <sup>2</sup> UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, Brasil.

9 <sup>3</sup> Institute of Aquaculture - University of Stirling. Stirling FK9 4LA, Scotland, UK

10 <sup>4</sup> Universidade Estadual de São Paulo – Centro de Aquicultura, 14.884-900  
11 Jaboticabal, Brasil

12  
13 Autor correspondente: M. G. Mai, UFSCar - Universidade Federal de São Carlos,  
14 13565-905 São Carlos, Brasil. Endereço de e-mail: monica\_mai@hotmail.com

15  
16  
17 **Resumo**

18 O presente estudo avaliou os efeitos da introdução precoce de dieta  
19 inerte na digestibilidade e metabolismo lipídico de linguado, enquanto a ingestão de  
20 presas, o crescimento e a sobrevivência também foram monitorados. Larvas de  
21 *Solea senegalensis* foram criadas em um regime alimentar padrão com alimento vivo  
22 (ST) e um regime de co-alimentação com a substituição de artêmia por dieta inerte  
23 (Art R). Foram feitos testes usando larvas de linguado alimentadas com artêmias  
24 enriquecidas com duas diferentes emulsões lipídicas, contendo glicerol tri [1-<sup>14</sup>C]  
25 oleato (TAG) e L-3-fosfatidilcolina-1,2-di-[1-<sup>14</sup>C] oleoil (PL), aos 9 e 17 dias após a  
26 eclosão (DAE) para estudar a utilização de lipídios. A co-alimentação não afetou a  
27 taxa sobrevivência do linguado (ST 59.1 ± 15.9 %; Art R 69.56 ± 9.3 %), mas refletiu  
28 significativamente em menores pesos finais aos 16 DAE (ST 0.71 ± 0.20; Art R 0.48 ±  
29 0.14 mg). Maiores taxas de ingestão de presas foram observadas em larvas de  
30 linguado alimentadas com artêmia enriquecida com PL marcada aos 9 DAE mas não  
31 aos 17 DAE. Aos 17 DAE, as larvas menores (tratamento Art R) ingeriram  
32 proporcionalmente mais artêmias em percentagem de peso, independentemente do

33 enriquecimento. Aos 9 DAE a digestibilidade lipídica foi igual entre os tratamentos e  
34 maiores que 90%, enquanto aos 17 DAE esta foi mais alta no tratamento ST (cerca  
35 de 73 %) comparado ao grupo Art R (cerca de 66 %). A retenção lipídica aos 9 DAE  
36 foi mais alta no tratamento Art R, alcançando valores de 50 %, enquanto esses  
37 valores quase duplicaram aos 17 DAE, acima de 80 % nos dois tratamentos sem  
38 diferenças significativas. Estes resultados sugerem que a co-alimentação de dieta  
39 viva e inerte desde a primeira alimentação em linguado senegalense tem um efeito  
40 prejudicial em termos de crescimento e digestibilidade lipídica, mas não parece  
41 comprometer a utilização metabólica de lipídios.

42 **Palavras-chave:** *Solea senegalensis*; Transição alimentar;  
43 Metabolismo lipídico; Digestibilidade; Ingestão de presas; Metamorfose.

44

#### 45 **4.1 Introdução**

46 Para atingir uma significativa substituição parcial de alimento vivo por  
47 dietas inertes desde a primeira alimentação, é indispensável o entendimento  
48 detalhado da fisiologia digestiva e como isto pode ser afetado pelos componentes da  
49 dieta (Morais, 2005).

50 O linguado senegalense (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) é um peixe  
51 plano encontrado ao longo das costas do Mediterrâneo e Atlântico, e é um candidato  
52 promissor para a aquicultura europeia desde a década de 90 devido aos bons  
53 preços de mercado (Howell, 1997; Dinis et al., 1999; Imsland et al., 2003). A  
54 despeito do seu alto potencial como espécie para a aquicultura, somente poucos  
55 estudos são disponíveis sobre as condições de cultivo larval (Esteban et al., 1995;  
56 Dinis et al., 1999) e estratégias de transição alimentar (Marin-Magan et al., 1995;  
57 Cañavate e Fernández-Díaz, 1999; Ribeiro et al., 2002; Engrola et al., 2005, 2007).  
58 Além disto, o sucesso na transição alimentar de linguado senegalense ainda é um  
59 passo crítico, sendo possível através de duas estratégias: transição abrupta e em  
60 co-alimentação com metanúplios de artêmia (Engrola et al., 2007). A respeito do  
61 recente progresso sobre os requerimentos nutricionais e entendimento da fisiologia  
62 digestiva larval, os resultados de transição alimentar obtidos até agora são variáveis  
63 e difíceis de reproduzir (Conceição et al., 2007b). Desse modo, protocolos de  
64 larvicultura para linguado senegalense ainda se baseiam em presas vivas durante o  
65 período antes da metamorfose, que ocorre entre 12 e 20 DAE, quando elas podem  
66 ser gradualmente substituídas por metanúplios de artêmia congelados.

67 Recentemente tem sido demonstrado que a digestibilidade e retenção de proteínas é  
68 diminuída pela co-alimentação com altos níveis de substituição artêmia por dieta  
69 inerte, e assim leva a um crescimento mais baixo (Engrola, comunicação pessoal).  
70 No entanto, quando um nível moderado de substituição de artêmia é usado, o  
71 linguado é capaz de adaptar seu metabolismo protéico e aumentar a utilização de  
72 proteína ao longo do tempo, com um efeito promotor de crescimento ao completar a  
73 transição alimentar (Engrola et al., 2008).

74 Dietas para larvas de peixes, e particularmente artêmia enriquecida,  
75 tendem a ser ricas em triacilgliceróis (TAG) como fonte lipídica (Morais et al., 2006),  
76 numa tentativa de atingir os requerimentos de ácidos graxos essenciais (EFA, sigla  
77 em inglês), nomeadamente em termos de ácidos graxos poliinsaturados da série n-3  
78 (PUFA, sigla em inglês) (Sargent et al., 1989). Isto pode ser um problema uma vez  
79 que altos níveis de lipídios, bem como desequilíbrios na composição das classes de  
80 lipídios encontrados ocasionalmente em presas vivas enriquecidas tem sido  
81 sugerido por afetar a digestão e absorção de ácidos graxos (FA, sigla em inglês)  
82 (Salhi et al., 1995, 1997, 1999; Díaz et al., 1997; Moraes et al., 2007). No ambiente  
83 marinho, altos níveis de fosfolipídios (PL) são normalmente encontrados no total de  
84 lipídios de fitoplâncton e zooplâncton ingerido pelas larvas de peixes (Sargent et al.,  
85 1989). Um efeito benéfico tem sido demonstrado em dietas purificadas  
86 suplementadas com PL em termos de sobrevivência, crescimento, resistência a  
87 estresse e ocorrência de deformidades em larvas e juvenis de vários peixes e  
88 crustáceos (Geurden et. al., 1995; Coutteau et al., 1997; Koven et al., 1998).

89 O presente trabalho avaliou os efeitos da co-alimentação de alimento  
90 vivo e dieta inerte desde a abertura da boca sobre a capacidade digestiva e o  
91 metabolismo da larva de linguado, comparado a um tratamento padrão usando  
92 somente alimento vivo. Para alcançar estes objetivos, foram realizados dois testes  
93 metabólicos usando artêmia enriquecida com emulsões lipídicas radio marcadas  
94 contendo glicerol tri [1-<sup>14</sup>C] oleato (TAG) ou L-3-fosfatidilcolina-1,2-di-[1-<sup>14</sup>C] oleoil  
95 (PL) com larvas de linguado antes (9 dias após a eclosão, DAE) e durante o clímax  
96 da metamorfose (17 DAE). A digestibilidade, retenção e catabolismo da radio  
97 marcação incorporada na artêmia foi medida, bem como a ingestão de presas pelas  
98 larvas de linguado. Além disso, o uso de diferentes fontes de lipídio radio marcado  
99 (TAG ou PL) permitiu verificar quando esses efeitos eram dependentes também da  
100 porção molecular na qual o ácido graxo é fornecido para a artêmia.

## 101 4.2 Materiais e Métodos

102

### 103 4.2.1 Cultivo larval

104 Os ovos de linguado senegalense usados neste experimento foram  
105 obtidos por desova natural de reprodutores em cativeiro mantidos no IPIMAR-  
106 CRIPSul, Olhão, Portugal. As larvas foram estocadas em tanques cilindro-cônicos  
107 com 100 L numa densidade de 100 larvas L<sup>-1</sup>. A técnica de água verde foi usada nos  
108 tanques de cultivo com uma mistura de 1:1 de *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*  
109 num sistema de recirculação, à temperatura de 19.8 ± 0.4 °C e à salinidade de 37.8  
110 ± 1.5 ‰. A saturação de oxigênio foi de 96.4 ± 9.6% e um ciclo de 12/12-h luz/escuro  
111 foi adotado. A renovação de água aumentou de 4 vezes/dia de 0 DAE a 8 vezes/dia  
112 de 13 DAE até o final do experimento, que foi finalizado no 19 DAE.

113

### 114 4.2.2 Regimes alimentares

115 Dois diferentes regimes de alimentação foram aleatoriamente adotados  
116 em triplicata durante a fase pelágica: regime alimentar padrão com alimento vivo  
117 (Standard, ST) e substituição de artêmia por dieta inerte desde a abertura da boca  
118 (Artêmia Replacement, Art R). Ao final do experimento as larvas dos tratamentos Art  
119 R receberam 45 % de metanúplios de artêmia congelada e 55 % de dieta inerte  
120 (*Proton* 100-200 µm; INVE Aquaculture NV, Dendermonde, Belgium) em proporção  
121 ao total diário de ração. A alimentação foi baseada em rotíferos (*Brachionus*  
122 *rotundiformis*) enriquecidos com Red Pepper (BernAqua, Olen, Belgium) de 2 a 4  
123 DAE para os dois tratamentos; náuplios de artêmia (INVE Aquaculture NV) de 4 a 9  
124 DAE para ambos os tratamentos; e metanúplios de artêmia enriquecida por 12  
125 horas, com 250 náuplios mL<sup>-1</sup>, com 0,4 g L<sup>-1</sup> em duas doses (às 3 e as 6h, seguindo  
126 as instruções do fabricante) numa mistura de 1:1 (com base no peso) de Easy DHA  
127 Selco<sup>®</sup> (INVE Aquaculture NV) e Micronised Peixemeal<sup>®</sup> (Ewos, Scotland) para os  
128 dois tratamentos no final do experimento. Entre os dias 13 e 16, os metanúplios  
129 vivos foram gradualmente substituídos por artêmia congelada. Os metanúplios de  
130 artêmia foram coletados, enxaguados em água do mar, contados, e congelados a -  
131 20 °C. Quinze minutos antes da alimentação, as artêmias foram descongeladas em  
132 água do mar. A tabela 1 mostra os regimes alimentares em detalhe.

133

Tabela 1

134

As larvas foram alimentadas diariamente às 11:00 am, 14:00 pm e

135 17:00 pm. A primeira refeição foi composta por 50 % da dose diária de alimento, e  
136 os 50 % remanescentes foram divididos em duas alimentações seguintes.

137

### 138 **4.2.3 Amostragens**

139 Amostras foram coletadas para determinação do peso seco individual  
140 (dry weight, DW) aos: 2 DAE, abertura da boca ( $n=30$  por tratamento), 8 DAE ( $n=30$   
141 para cada réplica de tratamento) e 16 DAE ( $n=15$  por cada réplica de tratamento). As  
142 larvas foram estocadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e posteriormente desidratadas por 48 h numa  
143 secadora Savant SS31 (Savant Instruments Inc., Hokbrook, NY, USA). O DW das  
144 larvas foi determinado numa balança Sartorius tipo M5P (precisão de 0.001g;  
145 Sartorius micro, Göttingen, Germany). A sobrevivência foi determinada ao fim do  
146 experimento, por contagem das larvas remanescentes nos tanques de cultivo.

147

### 148 **4.2.4 Testes de metabolismo lipídico**

149 Dois testes foram realizados com artêmia marcada com diferentes  
150 fontes de lipídios- $^{14}\text{C}$  para analisar os efeitos dos regimes alimentares na  
151 capacidade digestiva e no metabolismo das larvas de linguado: o primeiro teste aos  
152 9 DAE, na fase pelágica, e o segundo aos 17 DAE, durante o clímax da  
153 metamorfose.

154

#### 155 **4.2.4.1 Marcação da artêmia [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]**

156 Duas emulsões lipídicas foram preparadas usando 0.09 g de Easy DHA  
157 Selco plus com 50  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{Ci}$ ) de glicerol tri [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] oleato (TAG;  $3\cdot7\text{MBq/mL}$ ) ou 100  
158  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{Ci}$ ) de L-3-fosfatidilcolina-1,2-di- $[1\text{-}^{14}\text{C}]$  oleoil (PL;  $0\cdot925\text{MBq/mL}$ )  
159 (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., UK). Após misturar os lipídios radio marcados, o  
160 solvente no qual a marcação vem dissolvida foi evaporado com  $\text{N}_2$ . Os eppendorfs  
161 com as emulsões foram cobertos com parafilme e submetidos a 5 min de banho de  
162 ultra-som a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vigorosamente agitados por 2 minutos e então estocados a  $-20$   
163  $^{\circ}\text{C}$ . O enriquecimento foi feito adicionando-se e misturando-se as emulsões de TAG  
164 ou PL ao meio de enriquecimento (150 mL de água do mar) antes de introduzir as  
165 artêmias (200 metanúplios/mL). A incubação durou 14 h (Morais et al., 2004b).  
166 Após a incubação, os metanúplios de artêmia foram enxaguados varias vezes,  
167 contados e amostras foram retiradas para medidas da marcação incorporada.  
168 Amostras da água de incubação foram também guardadas para se fazer correções

169 para o  $^{14}\text{C}$  presente na água.

170

#### 171 **4.2.4.2 Teste Frio (Cold Chase) - preparo**

172 Em ambos os testes, aproximadamente 14 h antes do início da  
173 alimentação com artêmia radio marcada e 30 min a seguir da última refeição, as  
174 larvas foram transferidas para bandejas menores na sala experimental e  
175 aclimatizadas. Cada uma das quatro bandejas (duas por tratamento) conteve 30  
176 larvas (10 larvas de cada triplicata dos tanques de criação). Cada bandeja recebeu  
177 aproximadamente 10,000 metanúplios de artêmia radio marcados com um dos dois  
178 lipídios marcadores, resultando nos seguintes tratamentos: ST – TAG (Regime  
179 alimentar padrão com alimento vivo + Artêmia enriquecida com glicerol tri [ $^{14}\text{C}$ ]  
180 oleato - TAG); ST – PL (Regime alimentar padrão com alimento vivo + Artêmia  
181 enriquecida com L-3-fosfatidilcolina-1,2-di- $^{14}\text{C}$ ] oleoil - PL); Art R – TAG  
182 (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com TAG) e Art R -  
183 PL (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com PL). As  
184 larvas de linguado foram alimentadas durante 30 minutos com artêmia radio  
185 marcada. Este período é o balanço entre o tempo necessário para a completa  
186 refeição e para evitar perdas significantes pelo catabolismo da larva. Após este  
187 período, 15 larvas de cada tratamento foram cuidadosamente transferidas, uma a  
188 uma com uma pipeta Pasteur, através de dois tanques com água do mar limpa (para  
189 eliminar o lipídio  $^{14}\text{C}$  que poderia estar na superfície do peixe), e subsequentemente  
190 transferidas para câmaras de incubação. Após 2h, cada larva dentro de sua câmara  
191 foi realimentada com artêmia não marcada na mesma concentração normalmente  
192 oferecida nos tanques de cultivo. Esta alimentação de artêmia marcada seguida pela  
193 alimentação com artêmia não marcada caracteriza um teste do tipo “frio” (cold  
194 chase) (Conceição et al., 2007a).

195

#### 196 **4.2.4.3 Determinação da radio marcação**

197 O método empregado permite seguir o destino metabólico de um  
198 nutriente traçador nos diferentes compartimentos: retenção no corpo (larva),  
199 catabolismo ( $\text{CO}_2$  armadilha metabólica) e evacuação (água de incubação)  
200 (Rønnestad et al., 2001). As câmaras metabólicas foram conectadas a uma  
201 armadilha metabólica (KOH 0.5 M), para capturas o  $^{14}\text{CO}_2$  eliminado pela larva.  
202 Após 24 h, cada larva foi amostrada e colocada num tubo de cintilação (Sarstedt,

203 Rio do Mouro, Portugal). Ácido hidrolórico (HCl 0.1 M) foi gradualmente adicionado  
 204 na água remanescente, resultando no progressivo decréscimo do pH causando a  
 205 difusão de qualquer CO<sub>2</sub> ainda presente na água de incubação (Rønnestad et al.,  
 206 2001). Como resultado, a radioatividade encontrada na água das câmaras de  
 207 incubação corresponde ao evacuado, i.e., não absorvido, de artêmia marcada. Foi  
 208 adicionado solubilizador de tecidos (Solvable, Packard Bioscience, Groningen,  
 209 Netherlands) aos tubos de incubação contendo as larvas amostradas e as artêmias  
 210 radiomarcas. Os tubos foram deixados overnight em estufa para permitir a  
 211 solubilização dos tecidos. Após esfriar, foi adicionado 5 mL de líquido de cintilação  
 212 Ultima Gold XR (Packard Bioscience). Aos tubos contendo a água de incubação das  
 213 larvas e KOH (armadilha metabólica), também foi adicionado 5 mL de Ultima Gold  
 214 XR. As amostras foram analisadas num contador de cintilação líquida Beckman LS  
 215 6000IC (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) e os resultados são  
 216 apresentados como percentagem de desintegrações por minuto (DPM) em cada  
 217 compartimento em relação ao total contado. A ingestão de presas (FI, feed intake  
 218 em inglês) e a utilização do alimento pela larva em cada tratamento alimentadas  
 219 com artêmia enriquecida com uma das duas emulsões (4 combinações; *n*=15 por  
 220 combinação) foram determinadas aos 9 DAE e 17 DAE. A ingestão de presas (%  
 221 DW do corpo) durante o teste “frio” cold chase foi determinado como:

$$222 \quad FI = [(R_{total}/SR_{artêmia})/DW_{peixe}] \times 100$$

223 Como descrito por Conceição et al. (1998), onde  $R_{total}$  é a soma da  
 224 radioatividade na água do mar de incubação, na armadilha de CO<sub>2</sub> e no peixe  
 225 (DPM),  $SR_{artêmia}$  é a radioatividade específica nas amostras de Artêmia (DPM/mg  
 226 DW de Artêmia), e  $DW_{peixe}$  é o peso seco (mg) de peixe.

227 Diferentes parâmetros da utilização de artêmia foram determinados:  
 228 digestibilidade (D, %), retenção (R, %) e catabolismo (C, %). Estes foram calculados  
 229 como:

$$230 \quad D = [(R_{corpo} + R_{CO_2 \text{ armadilha}})/(R_{corpo} + R_{CO_2 \text{ armadilha}} + R_{\text{água}})] \times 100;$$

$$231 \quad R = [R_{corpo}/(R_{corpo} + R_{CO_2 \text{ armadilha}})] \times 100;$$

$$232 \quad C = [R_{CO_2 \text{ armadilha}}/(R_{corpo} + R_{CO_2 \text{ armadilha}})] \times 100;$$

233 onde  $R_{corpo}$  é o total de radioatividade no corpo do peixe (DPM),  $R_{CO_2}$   
 234 armadilha é o total de radioatividade nas armadilha de CO<sub>2</sub> (DPM), e  $R_{\text{água}}$  é o total de

235 radioatividade na água de incubação (DPM).

236

#### 237 **4.2.5 Análises estatísticas**

238 Os dados obtidos para cada tratamento foram comparados através de  
239 análise de variância (ANOVA): one-way (crescimento e sobrevivência) ou two-way  
240 (distribuição das marcações radioativas em cada compartimento nos testes  
241 metabólicos), usando o software Statistica 6 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Para two-  
242 way ANOVA, foram testados os efeitos combinados dos fatores “regime de  
243 alimentação” (ST ou Art R) e “fonte lipídica” (TAG ou PL). A homogeneidade de  
244 variância foi verificada usando o teste de Bartlett e o nível de significância de 0.05 foi  
245 empregado (Zar, 1996). Os dados de dos testes de alimentação com artêmia  
246 marcada (percentagem das contagens em cada compartimento) e todas as outras  
247 percentagem foram transformadas por arco seno de  $x^{1/2}$ . Quando diferenças  
248 significantes foram encontradas nas análises de one way e two way ANOVA, foram  
249 realizados os testes de Tukey e Newman Keuls, respectivamente. Todos os dados  
250 foram dados como médias e desvios padrão.

251

### 252 **4.3 Resultados**

253

#### 254 **4.3.1 Crescimento e sobrevivência larval**

255 O DW inicial das larvas de linguado foi de  $42.68 \pm 13.91$   $\mu\text{g}$  para todos  
256 os tratamentos. Não foram observadas diferenças na sobrevivência entre os dois  
257 regimes alimentares testados (ST  $59.1 \pm 15.9$  %; Art R  $69.6 \pm 9.3$  %) aos 16 DAE,  
258 mas a média do peso seco final foi significativamente maior nas larvas alimentadas  
259 somente com alimento vivo (tratamento ST) neste período (Fig. 1b). No entanto, esta  
260 diferença em DW ainda não era observada aos 8 DAE (Fig. 1a).

261 Figura 1

262

#### 263 **4.3.2 Ingestão de presas**

264 As artêmias marcadas com as emulsões contendo  $^{14}\text{C}$ -TAG ou  $^{14}\text{C}$ -PL  
265 resultaram nos valores médios de DPM de  $78.6 \pm 7.5$  DPM/artêmia e  $37.9 \pm 2.9$   
266 DPM/artêmia para marcação com TAG e PL, respectivamente, no teste metabólico  
267 feito aos 9 DAE; e  $65.8 \pm 1.8$  e  $54.8 \pm 4.9$  DPM/artêmia para marcação com TAG e  
268 PL, respectivamente, aos 17 DAE.

269                   Aos 9 DAE, linguados alimentados com artêmia enriquecida com PL  
270 (tratamento ST e Art R) apresentaram mais alta ingestão de presas comparado  
271 aqueles alimentados com artêmia TAG-enriquecida ( $P < 0.001$ ), enquanto não foram  
272 observadas diferenças significantes entre os dois regimes alimentares. O número de  
273 artêmias consumidas por larva aos 9 DAE foi ST - TAG  $9.1 \pm 2.3$ ; ST - PL  $23.8 \pm$   
274  $6.7$ ; Art R - TAG  $11.6 \pm 4.1$ ; Art R - PL  $19.2 \pm 6.9$ . Considerando que não houve  
275 diferenças no DW das larvas nesta idade, a percentagem de peso de artêmia  
276 ingerida em relação ao peso da larva de linguado foi significativamente maior nos  
277 tratamentos alimentados com artêmia marcada com  $^{14}\text{C}$  - PL (Fig. 2a).

278                   Ao fim do experimento (17 DAE), larvas do tratamento ST e Art R  
279 consumiram a mesma quantidade de artêmia marcada, independentemente do tipo  
280 de emulsão lipídica usada para marcá-las: ST - TAG  $40.9 \pm 16.2$ ; ST - PL  $41.8 \pm$   
281  $10.5$ ; Art R - TAG  $43.7 \pm 10.8$ ; Art R - PL  $42.1 \pm 7.5$  artêmia/larva de linguado. No  
282 entanto, aos 17 DAE o DW das larvas cultivadas no regime padrão (ST) foi maior do  
283 que as do tratamento em co-alimentação Art R (Fig.1b), o que significa que as larvas  
284 menores (Art R) ingeriram proporcionalmente mais artêmias em percentagem de  
285 peso ( $P < 0,001$ ) do que aquelas larvas alimentadas somente com alimento vivo (ST)  
286 (Fig. 2b). Neste período, nenhuma diferença significativa foi observada entre os  
287 tratamentos alimentos com artêmia enriquecida com PL ou TAG.

288                   Figura 2

289

### 290 **4.3.3 Digestibilidade e metabolismo larval**

291                   Aos 9 DAE não houve diferença significativa entre os tratamentos  
292 quanto à digestibilidade das artêmias marcadas (Fig. 3a). Aos 17 DAE, no entanto,  
293 larvas do tratamento ST alimentadas com artêmia enriquecida com TAG tiveram  
294 digestibilidade de lipídios significativamente mais alta (88.7%) ( $P < 0,001$  “regime  
295 alimentar” e  $P < 0,05$  para “fonte lipídica”). Linguados do tratamento Art R  
296 alimentados com artêmia marcada com PL tiveram digestibilidade de lipídios mais  
297 baixa, 66.0% (Fig. 3b).

298                   Figura 3

299                   Larvas de linguado aos 9 DAE apresentaram retenção da radio  
300 marcação significativamente mais alta (% da marcação absorvida) no tratamento de  
301 co-alimentação (Art R) ( $P < 0,05$ ) e nenhuma diferença estatística foi encontrada para  
302 “fonte lipídica” ( $P > 0,07$ ; Fig. 4a). A retenção lipídica foi de  $48.8 \pm 11.2$  % em Art R -

303 TAG;  $40.4 \pm 17.2$  % em Art R – PL;  $32.3 \pm 10.6$  % em ST – TAG e  $40.0 \pm 11.0$  % em  
304 ST - PL. Concomitantemente, as larvas submetidas ao regime de alimentação ST  
305 apresentaram o catabolismo significativamente mais alto, independentemente da  
306 fonte lipídica utilizada para enriquecimento das artêmias ( $67.6 \pm 10.6\%$  em ST –  
307 TAG e  $59.9 \pm 12.7\%$  em ST – PL;  $51.1 \pm 11.2\%$  em Art R – TAG;  $59.5 \pm 17.2\%$  em  
308 Art R – PL). Os mesmos resultados foram observados quando foram analisados a  
309 retenção, o catabolismo e evacuação expressos como DPM/ mg de DW da larva de  
310 linguado aos 9 DAE (resultados não mostrados).

311 Figura 4

312 Aos 17 DAE não houve mais diferenças estatísticas na retenção ou  
313 catabolismo (Fig. 4b) entre os tratamentos alimentares e também entre as larvas de  
314 linguado alimentadas com artêmia enriquecida com PL ou TAG. O mesmo foi  
315 observado quando os dados foram expressos em DPM/mg de DW (resultados não  
316 mostrados) ao invés de expressos em % de DPM, mesmo quando foram feitas as  
317 correções para as marcações de artêmia enriquecida com TAG e PL.

318

#### 319 4.4 Discussão

320

##### 321 4.4.1 Co-alimentação com dieta inerte desde a primeira alimentação afeta o 322 crescimento, mas não a sobrevivência larval

323 As taxas de sobrevivência observadas no presente estudo  
324 apresentaram uma média mais alta do que os valores de estudos prévios com larvas  
325 de linguado senegalense (Dinis et al., 1999; Cañavate e Fernández-Díaz, 1999).  
326 Além disso, a introdução precoce de dieta inerte desde a abertura da boca  
327 (tratamento Art R), não afetou a taxa sobrevivência das larvas de linguado,  
328 comparado ao regime alimentar padrão até o 19 DAE. Resultados similares foram  
329 encontrados para outras espécies (Kolkovski et al., 1997; Roselund et al., 1997),  
330 quando uma co-alimentação precoce foi testada. Curnow et al (2006) quando co-  
331 alimentaram a perca gigante (Asian sea bass) *Lates calcarifer* com duas diferentes  
332 dietas inertes, verificaram sobrevivências mais baixas quando foram observadas  
333 médias de peso mais altas usando uma das dietas, e o oposto com a outra dieta,  
334 maior sobrevivência porém menores médias de peso, o que era compensado com o  
335 tempo de cultivo. Tem sido sugerido que a co-alimentação de larvas de linguado  
336 desde 1 mg de peso pode até melhorar as taxas de sobrevivência uma vez que isto

337 pode melhorar a maturação digestiva e/ou estimular a secreção digestiva (Engrola et  
338 al., 2007), mesmo que seja observada maior dispersão de tamanho das larvas.

339 O crescimento foi significativamente mais baixo no tratamento Art R,  
340 comparado às larvas alimentadas somente com alimento vivo até o final da fase  
341 pelágica. No entanto, efeitos em longo prazo da estratégia de co-alimentação  
342 precoce em diferentes espécies têm mostrado: aumento do crescimento e da  
343 sobrevivência após a transição alimentar de linguado senegalense (Cañavate e  
344 Fernández-Díaz, 1999); aumento da taxa de sobrevivência e crescimento  
345 equivalente em comprimento e peso de dourado *Salminus brasilienses* (Vega-  
346 Orellana et al., 2005); e aumento de crescimento e sobrevivência de linguado “  
347 tongue sole” *Cynoglossus semilaevis* (Chang et al., 2006). Adicionalmente, Yúfera et  
348 al. (2003) demonstraram que o linguado senegalense cresce a taxas mais baixas  
349 quando alimentado exclusivamente com dieta inerte desde o 13 DAE em diante, do  
350 que quando alimentados com alimento vivo.

351 Ainda, mesmo que as taxas de crescimento observadas no tratamento  
352 Art R tenham sido baixas comparadas com o grupo controle, estes valores estiveram  
353 dentro de valores normais para cultivo para linguado senegalense (Cañavate e  
354 Fernández-Díaz, 1999; Engrola et al., 2008).

355

#### 356 **4.4.2 Fonte lipídica e marcação da artêmia**

357 Neste estudo a artêmia foi marcada pela inclusão de um traçador de  
358 ácido oleico-<sup>14</sup>C na emulsão de enriquecimento, oferecido esterificado a TAG ou PL.  
359 No entanto, os resultados da digestibilidade e metabolismo de lipídio da artêmia não  
360 podem ser completa e diretamente relacionados com o efeito da classe de lipídio  
361 uma vez que é bem conhecido que metanúplios de artêmia não pode ser  
362 considerado como um carregador passivo de ácidos graxos (FA), e tanto a  
363 marcação com TAG e PL pode ter sido transformada em outros lipídios pela artêmia.  
364 De fato, uma importante fração dos lipídios filtrados é digerida, assimilada no corpo  
365 da artêmia e metabolizada, e não só simplesmente acumulada no trato digestivo  
366 (Ando et al., 2004).

367 Além do metabolismo diferencial de certos ácidos graxos, alguns  
368 ácidos graxos incorporados se redistribuem entre as classes de lipídios com alta  
369 imprevisibilidade, tanto durante o enriquecimento e particularmente em condições de  
370 jejum, depois de terem sido adicionadas aos tanques de cultivo larval (Watanabe et

371 al., 1982; Léger et al., 1986, 1987; Takeuchi et al., 1992; McEvoy et al., 1995, 1996;  
372 Navarro et al., 1999). No presente estudo, a composição lipídica da artêmia marcada  
373 ao final do enriquecimento não foi analisada.

374           Esta é a primeira vez que artêmia enriquecida com lipídios marcados  
375 com  $^{14}\text{C}$  é usado para estudar a utilização em dietas para larvas de peixes. Estudos  
376 metabólicos têm sido realizados usando proteína hidrolisada marcada com  $^{14}\text{C}$   
377 incorporada na proteína da artêmia, com a finalidade de estudar a ontogenia da  
378 capacidade digestiva de proteína (Morais et al., 2004a) e o efeito do regime  
379 alimentar na utilização da proteína (Engrola et al., 2008).

380

#### 381 **4.4.3 Enriquecimento de artêmia com fosfolipídios estimula a ingestão de presas** 382 **por larvas de linguado senegalense**

383           Aos 9 DAE as larvas de linguado alimentadas com artêmia enriquecida  
384 com PL marcado apresentaram 2.6 vezes (ST) e 1.6 vezes (Art R) maior ingestão de  
385 presas quando comparadas com os tratamentos alimentados com TAG marcado.  
386 Além disto, quando foi calculada a quantidade adicional de PL fornecida pela radio  
387 marcação da emulsão lipídica, um valor muito baixo ( $0.111 \times 10^{-9}$   $\mu\text{g}$  de L-3-  
388 fosfatidilcolina-1,2-di-oleoil por artêmia) foi encontrado. Este valor é ainda mais  
389 reduzido se for considerado que somente uma porção disto pode ser encontrado  
390 intacto (i.e., não assimilado e metabolizado) no trato digestivo da artêmia na hora da  
391 ingestão larval. A artêmia enriquecida com L-3-fosfatidilcolina-1,2-di-[ $^{14}\text{C}$ ] oleoil  
392 (PL) parece ter um efeito estimulante na alimentação de larva de linguado aos 9  
393 DAE. No entanto, o conteúdo de PL na artêmia não foi verificado no presente  
394 estudo. Todavia, foi demonstrado que em dietas para larvas de camarão peneídeo  
395 com artêmia enriquecida com fosfatidilcolina (PC, neste trabalho designado por PL)  
396 não aumentou o seu conteúdo de PC (Tackaert et al., 1991). Em larva de dourada (“  
397 gilthead seabream”) foi observado um aumento na ingestão de microdietas com  
398 níveis mais altos de PC (Koven et al., 1994, 1998; Izquierdo et al., 2001). A PC na  
399 dieta foi considerada como um estimulante/atrativo à alimentação e aumentou  
400 significativamente as taxas de ingestão em larvas de dourada de 15-26 DAE; apesar  
401 disto não ser mais efetivo em larvas com 28 DAE e mais velhas (Koven et al., 1998).  
402 A eficácia de PL na dieta parece se reduzir com a idade e pode refletir a natureza  
403 imatura do sistema digestivo em larvas de peixes marinhos, que carecem de um  
404 trato totalmente funcional até completarem a metamorfose (Munilla-Moran e Stark,

405 1989; Bisbal e Bengtson, 1995; Ribeiro et al., 1999; Bell et al., 2003). Também,  
406 Iritani et al. (1984) mostraram que larvas de peixes têm capacidade limitada para  
407 biossintetizar “de novo” PL endogenamente, o que pode ser insuficiente para manter  
408 taxas ótimas de síntese de lipoproteína. Isto está de acordo com Morais (2005), que  
409 sugeriu que o alto requerimento de PL na dieta é também provável em estágios  
410 iniciais para sustentar o crescimento rápido e a organogênese, que provavelmente  
411 requer altas taxas de síntese de membranas neste período.

412           Em linguado senegalense, aos 17 DAE o nível de ingestão de artêmia  
413 por larva foi independente do tipo de enriquecimento lipídico usado na artêmia. Por  
414 outro lado, as larvas menores do tratamento Art R ingeriram significativamente mais  
415 artêmia como percentagem de DW comparado com larvas alimentadas apenas com  
416 alimento vivo. Isto pode eventualmente ser explicado como uma tentativa de  
417 compensar a energia despendida na metamorfose das larvas do tratamento Art R,  
418 junto com o seu atraso em ganho de peso neste estágio. Resultados similares foram  
419 obtidos por Engrola et al. (2008).

420

#### 421 **4.4.4 Estratégia de co-alimentação precoce afeta a capacidade digestiva de lipídios** 422 **em larvas de linguado**

423           A ingestão de presas mais alta para o tratamento com artêmia  
424 enriquecida com PL nos dois tratamentos (ST e Art R) aos 9 DAE não foi traduzida  
425 em diferenças estatísticas para a digestibilidade. Neste estágio, as larvas de  
426 linguado parecem ter capacidade digestiva para lidar com os lipídios de presas vivas  
427 (mais de 90% de digestibilidade), independente do regime alimentar e da fonte de  
428 lipídio usada para radio marcar a artêmia. Assim, as larvas parecem ter melhor  
429 capacidade digestiva para lipídios comparado com proteínas, uma vez que a  
430 digestibilidade de proteína aos 8 DAE foi de 72.4% no regime padrão de alimentação  
431 e 70.4% num regime de co-alimentação (Engrola et al., 2008), e 83% aos 12 DAE  
432 (Morais et al., 2004a).

433           Aos 17 DAE uma significativa digestibilidade de lipídios foi medida no  
434 tratamento Art R comparado ao ST e também em relação aos 9 DAE. As larvas de  
435 linguado co-alimentadas com dieta inerte desde a abertura da boca têm uma  
436 redução na digestibilidade de proteína durante o clímax da metamorfose (16 DAE),  
437 comparado a idades mais jovens e mais velhas (Engrola et al. 2008). De fato, o  
438 clímax da metamorfose é um estágio crítico no desenvolvimento para larva de

439 linguado, e a adaptação precoce de dieta inerte, em particular, parece ter um efeito  
440 prejudicial em termos eficiência digestiva. Nesse estágio, o crescimento, a taxa de  
441 ingestão e o consumo de oxigênio têm mostrado ser decrescente (Parra, 1998). A  
442 mais alta digestibilidade de lipídios pelas larvas alimentadas no tratamento ST  
443 quando comparado com as larvas co-alimentadas com dieta inerte aos 17 DAE,  
444 independente da marcação usada, pode ser explicada por um desenvolvimento mais  
445 rápido do sistema digestivo dessas larvas, relativo ao seu mais alto DW (tratamento  
446 ST). Cahu and Zambonino Infante (2001) observaram que a maturação intestinal  
447 pode ser estimulada, mas também irreversivelmente impedida, dependendo de  
448 como a co-alimentação com presas vivas e dieta inerte é feita. Além disso,  
449 Fernández-Díaz et al. (2006) observaram que linguados alimentados exclusivamente  
450 com dietas microencapsuladas tiveram suas estruturas hepática e gastrointestinal  
451 alteradas quando comparadas com animais alimentados com alimento vivo.

452           Aos 17 DAE foi observada uma digestibilidade significativamente mais  
453 alta com artêmia marcada com TAG do que com PL. Como já mencionado, os  
454 ácidos graxos e a composição das classes de lipídios da artêmia radio marcada não  
455 foi determinada e dessa forma, a digestibilidade mais alta de artêmia TAG marcada  
456 deve ser discutida com cautela. Estudos prévios têm mostrado que fosfolipídios têm  
457 mais alta digestibilidade comparado a TAG (Morais et al., 2007). Ainda assim, o  
458 presente estudo sugere que o enriquecimento de artêmia com PL pode ser menos  
459 eficiente para transferir o ácido oleico, e eventualmente outros ácidos graxos,  
460 comparado com TAG durante o clímax da metamorfose de linguado. Estas  
461 descobertas claramente merecem estudos mais aprofundados.

462

#### 463 **4.4.5 Co-alimentação afeta a retenção e o catabolismo em larvas de linguado**

464           Aos 9 DAE o catabolismo lipídico foi significativamente reduzido e  
465 concomitantemente, a retenção corporal da marcação radioativa foi  
466 significativamente aumentada, quando a larva foi co-alimentada com dieta inerte  
467 desde a primeira alimentação (tratamento Art R). Tem sido sugerido que jovens  
468 larvas podem ter a habilidade de compensar por uma eventual digestibilidade mais  
469 baixa com mais altas retenções dos amino ácidos absorvidos (Morais et al., 2004a).  
470 A mesma idéia pode ser usada para explicar os presentes resultados, se for  
471 assumido que a dieta inerte é menos digerível do que as presas vivas durante os  
472 estágios iniciais de desenvolvimento. Nesse caso, larvas em co-alimentação podem

473 ter eficiência digestiva mais baixa, derivada da introdução precoce de dieta inerte no  
474 regime de alimentação.

475           Aos 17 DAE ambos o catabolismo e a retenção lipídica não  
476 apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, comparando com os  
477 dados de 9 DAE, sugerindo mudanças metabólicas com o decorrer da metamorfose.  
478 De fato, o catabolismo lipídico foi 2 vezes mais alta (ca. 50% comparado com ca.  
479 20% do total de lipídios absorvidos) aos 9 DAE comparado aos 17 DAE. Isto sugere  
480 que as perdas de lipídios são importantes como energia combustível durante a  
481 metamorfose. Alternativamente, isto pode ser resultado do aumento nos níveis de  
482 lipídios corporais como reserva de energia nos estágios anteriores à metamorfose  
483 (portanto mais retenção lipídica), para compensar pela redução no consumo de  
484 presas durante este período (Parra, 1998; Youson, 1988). Ainda, o presente estudo  
485 demonstra que a eficiência da retenção de lipídios permanece constante  
486 independentemente do regime alimentar e da fonte de lipídios usada no  
487 enriquecimento da artêmia durante o clímax da metamorfose. Por isso, parece que a  
488 substituição parcial da artêmia por dieta inerte parece não comprometer o  
489 metabolismo larval.

490

#### 491 **4.5 Conclusão**

492

493           A co-alimentação de larvas de linguado com dieta inerte desde a  
494 abertura da boca não afeta a sobrevivência, mas resulta em menores tamanhos de  
495 larva. Embora o traçador lipídico usado para marcar a artêmia tenha provavelmente  
496 sido ao menos parcialmente assimilado e metabolizado pela artêmia de um modo  
497 imprevisível, uma fração da marcação com PL permaneceu no trato digestivo da  
498 artêmia pode ter tido um efeito estimulante na ingestão de presas aos 9 DAE, mas  
499 não mais aos 17 DAE. Além disto, enquanto nenhuma diferença foi observada aos 9  
500 DAE na digestibilidade de lipídios, o tratamento ST-TAG mostrou as digestibilidades  
501 mais altas aos 17 DAE, muito provavelmente como resultado da maturação mais  
502 avançada do sistema digestivo. Ademais, aos 9 DAE o regime de co-alimentação  
503 reduziu o catabolismo lipídico e concomitantemente aumentou a retenção de lipídios  
504 nas larvas de linguado, o que pode ser uma adaptação ao regime alimentar com  
505 digestibilidade mais baixa. No entanto, a retenção lipídica foi alta em todos os  
506 tratamentos aos 17 DAE, provavelmente como resposta às mudanças morfológicas

507 e fisiológicas que acontecem no corpo da larva durante o clímax da metamorfose.

508                   Em resumo, co-alimentação de alimento vivo e inerte desde a primeira  
509 alimentação em linguado senegalense (*Solea senegalensis*) tem um efeito  
510 prejudicial em termos de crescimento e digestibilidade lipídica, mas não parece  
511 comprometer a utilização metabólica de lipídios.

512

#### 513 **4.6 Agradecimentos**

514

515                   Os autores agradecem à Helena Teixeira pela assistência prática. À  
516 bolsa concedida a Mônica Mai (SWE 201887/2007-0) pelo “Conselho Nacional de  
517 Desenvolvimento Científico e Tecnológico” - CNPq (Brasil). Este estudo teve o apoio  
518 financeiro do Projeto PROMAR/SP5.P117/03 (programa INTERREG III A, co-  
519 financiado pela FEDER, Com missão Européia).

520

#### 521 **4.7 Referências bibliográficas**

522

523 Ando, Y., Samoto, H., Murayama, Y. 2004. Positional distribution of DHA and EPA in  
524 triacyl-*sn*-glycerols (TAG) of *Artemia franciscana* nauplii enriched with fish oils  
525 ethyl esters and TAG. *Aquaculture*, 233, 321-335.

526 Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R. 2003. Optimising  
527 lipid nutrition in first-feeding flatfish larva. *Aquaculture*, 227, 211-220.

528 Bisbal, G.A., Bengtson, D.A. 1995. Development of digestive tract in larval summer  
529 flounder. *J. Fish Biol.*, 47, 277–291.

530 Cahu, C., Zambonino Infante, J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in  
531 marine fish larva. *Aquaculture*, 200, 161-180.

532 Cañavate, J.P., Fernández-Díaz, C. 1999. Influence of co-feeding larva with live and  
533 inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds.

534 *Aquaculture*, 174, 255-263.

- 535 Chang, Q., Liang, M.Q., Wang, J.L., Chen, S.Q., Zhang, X.M., Liu, X.D. 2006.  
536 Influence of larval co-alimentação with live and inert diets on weaning the  
537 tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Aquacult. Nutr.*, 12 (2), 135-139.
- 538 Conceição, L.E.C., Verreth, J.A.J., Verstegen, M.W.A., Huisman, E.A. 1998. A  
539 preliminary model for dynamic simulation of growth in fish larva: application to  
540 the African catfish (*Clarias gariepinus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*).  
541 *Aquaculture*, 163, 215-235.
- 542 Conceição, L.E.C., Morais, S., Rønnestad, I. 2007a. Tracers in fish larva nutrition: A  
543 review of methods and applications. *Aquaculture*, 267, 62-75.
- 544 Conceição, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M.,  
545 Soares, F., Dinis, M.T. 2007b. Nutritional physiology during development of  
546 Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 268, 64-81.
- 547 Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P. 1997. Review on  
548 the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture.  
549 *Aquaculture*, 155, 149-164.
- 550 Curnow, J., King, J., Partridge, G., Kolkovski, S. 2006. Effects of two commercial  
551 microdiets on growth and survival of barramundi (*Lates calcarifer* Bloch) larva  
552 within various early weaning protocols. *Aquacult. Nut.*, 12; 247–255.
- 553 Díaz, J.P., Guyot, E., Vigier, S., Connes, R. 1997. First events in lipid absorption  
554 during post-embryonic development of the anterior intestine in gilt-head sea  
555 bream. *J. Fish Biol.*, 51, 180-192.
- 556 Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C. 1999. A review on the cultivation  
557 potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176,  
558 27-38.

- 559 Engrola, S., Conceição, L.E.C, Gavaia, P.J., Cancela, M.L., Dinis, M.T. 2005. Effects  
560 of pre-weaning feeding frequency on growth, survival, and deformation of  
561 Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *Isr. J. Aquac.-Bamidgeh*,  
562 57, 10-18.
- 563 Engrola, S., Conceição, L.E.C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M.T. 2007.  
564 Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of corpo weight and  
565 digestive capacity. *Aquacult. Res.*, 38, 696-707.
- 566 Engrola, Sofia, Mai, Mônica, Dinis, Maria Teresa, Conceição, Luís E.C., Co-  
567 alimentação of inert diet from mouth opening does not impair protein utilization  
568 by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larva, *Aquaculture* (2008), doi:  
569 10.1016/j.aquaculture.2008.10.036
- 570 Esteban, J.C., Calderon J.A., Carrascosa M., Pecci, F., 1995. Cria larvaria, destete y  
571 preengorde del lenguado (*Solea senegalensis*) realizado en el departamento  
572 de cultivos marinos del IES Sancti-Petri. In: F. Castelló i Orvay, A. Calderer i  
573 Reig (Eds.), V Congreso Nacional de Acuicultura. Universitat de Barcelona,  
574 May 10-13, Sant Carles de la Ràpita, Spain, pp. 426-431.
- 575 Fernández-Díaz, C., Kopecka, J., Cañavate, J.P., Sarasquete, C., Sole, M. 2006.  
576 Variations on development and stress defences in *Solea senegalensis* larva  
577 fed on live and microencapsulated diets. *Aquaculture*, 251, 573-584.
- 578 Geurden, I., Radünz-Neto, J., Gergot, P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids  
579 for carp (*Cyprinus carpio* L.) larva. *Aquaculture*, 131, 303-314.
- 580 Howell, B.R. 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for  
581 commercial cultivation. *Aquaculture*, 155, 359-369.

- 582 Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E.,  
583 Kamstra, A., Rema, P., White, P. 2003. A review of the culture potential of  
584 *Solea solea* and *S. senegalensis*. Rev. Fish Biol. Fish., 13, 379-407.
- 585 Iritani, N., Ikeda, Y., Fukuda, H., Katsurada, A., 1984. Comparative study of lipogenic  
586 enzymes in several vertebrates. Lipids 19, 825-835.
- 587 Izquierdo, M.S., Tandler, A., Salhi, M., Kolkovski, S. 2001. Influence of dietary polar  
588 lipids' quantity and quality on ingestion and assimilation of labelled fatty acids  
589 by larval gilthead seabream. Aquacult. Nutr., 7, 153-160.
- 590 Kolkovski, S., Tandler, A., Izquierdo, M. S. 1997. Effects of live food and dietary  
591 digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus*  
592 *labrax*) larva. Aquaculture, 148, 313-322.
- 593 Koven, W.M., Henderson, R.J., Sargent, J.R. 1994. Lipid digestion in turbot  
594 (*Scophthalmus maximus*). I: Lipid class and fatty acid composition of digesta  
595 from different segments of the digestive tract. Fish Physiol. Biochem., 13, 69-  
596 79.
- 597 Koven, W.M., Parra, G., Kolkovski, S., Tandler, A. 1998. The effect of dietary  
598 phosphatidylcholine and its constituent fatty acids on microdiet ingestion and  
599 fatty acid absorption rate in gilthead seabream, *Sparus auratus*, larva.  
600 Aquacult. Nutr., 4, 39-45.
- 601 Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and  
602 nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.,  
603 24, 521-623.
- 604 Léger, P., Bengtson, D.A., Sorgeloos, P., Simpson, K.L., Beck, A.D., 1987. The  
605 nutritional value of *Artemia*: a review. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A.,  
606 Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia Research and its Applications*.

- 607 Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, pp. 357-  
608 372.
- 609 Marin-Magan V., Anguis V., Canavete, J.P., 1995. Uso de alimento inerte en larvas y  
610 alevines del lenguado *Solea senegalensis*. In: F. Castelló i Orvay, A. Calderer  
611 i Reig (Eds.), V Congreso Nacional de Acuicultura. Universitat de Barcelona,  
612 May 10-13, Sant Carles de la Ràpita, Spain, pp. 432-436.
- 613 McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G., Sargent, J.R. 1995. Autoxidation of oil  
614 emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture*, 134, 101-112.
- 615 McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R. 1996. Two novel  
616 *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture*, 144, 339-352.
- 617 Morais, S., Lacuisse, M., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Rønnestad, I. 2004a.  
618 Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*),  
619 with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from  
620 *Artemia*. *Mar. Biol.*, 145, 243-250.
- 621 Morais, S., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Rønnestad, I. 2004b. A method for  
622 radiolabeling *Artemia* with applications in studies of food intake,  
623 digestibilidade, protein and amino acid metabolism in larval fish. *Aquaculture*,  
624 231, 469-487.
- 625 Morais, S. 2005. Digestive physiology and food intake in marine fish larva with  
626 respect to dietary neutral lipids. PhD Thesis. Universidade do Algarve, Faro,  
627 219 pp.
- 628 Morais, S., Torten, M., Nixon, O., Lutzky, S., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Tandler,  
629 A., Koven, W. 2006. Food intake and absorption are affected by dietary lipid  
630 level and lipid source in seabream (*Sparus aurata* L.) larva. *J. Exp. Mar. Biol.*  
631 *Ecol.*, 331, 51-63.

- 632 Morais, S., Conceição, L.E.C., Rønnestad, I., Koven, W., Cahu, C. 2007. Dietary  
633 neutral lipid level and source in marine fish larva: Effects on digestive  
634 physiology and food intake. *Aquaculture*, 268, 106-122.
- 635 Munilla-Moran, R., Stark, J.R. 1989. Protein digestion in early turbot larva,  
636 *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, 81, 315-327.
- 637 Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F. 1999. Lipid  
638 conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture*, 174, 155-166.
- 639 Parra, G. 1998. Fisiología y balance energético durante el desarrollo larvario de  
640 peces marinos (*Solea senegalensis* Kaup y *Sparus aurata* Linneo) en cultivo.  
641 Tesis doctoral, Universidad de Cádiz, 176 pp.
- 642 Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T. 1999. Development of  
643 digestive enzymes in larva of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*,  
644 179, 465-473.
- 645 Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T. 2002. Digestive enzymes  
646 profile of *Solea senegalensis* post larva fed *Artemia* and a compound diet.  
647 *Fish Physiol. Biochem.*, 27, 61-69.
- 648 Rønnestad, I., Rojas-García, C.R., Tonheim, S.K., Conceição, L.E.C. 2001. In vivo  
649 studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larva. *Aquaculture*,  
650 201, 161-175.
- 651 Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C. 1997. Co-alimentação marine fish larva with inert  
652 and live diets. *Aquaculture*, 155, 183-191.
- 653 Salhi, M., Kolkovski, S., Izquierdo, M.S., Tandler, A. 1995. Inclusion of lecithin and  
654 polar or neutral lipids high in n-3 HUFA in microdiets for gilthead seabream  
655 *Sparus aurata* larva. In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (Eds.),  
656 *Proceedings of the Fish and Shellfish Larviculture Symposium - Larvi'95*

- 657 (European Aquaculture Society, Special Publication, vol. 24. European  
658 Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp. 184-187.
- 659 Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Socorro, J., Fernández-Palacios,  
660 H. 1997. The improved incorporation of polyunsaturated fatty acids and  
661 changes in liver structure in larval gilthead seabream fed on microdiets. *J. Fish*  
662 *Biol.*, 51, 869-879.
- 663 Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Fernández-  
664 Palacios, H. 1999. Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3  
665 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead  
666 seabream (*Sparus aurata*) larva. *Aquaculture*, 179, 253- 263.
- 667 Sargent, J., Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1989. The lipids. In: Halver, J.E. (Ed.),  
668 *Fish Nutrition*. Academic Press, London, pp. 154-218.
- 669 Tackaert, W., Camara, M.R., Sorgeloos, P. 1991. The effect of dietary  
670 phosphatidylcholine in postlarval penaeid shrimp: I. Diet preparation. In:  
671 Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi'91: Fish and*  
672 *Crustacean Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society, Special  
673 *Publication No.15*, Gent, Belgium, pp. 76-79.
- 674 Takeuchi, T., Arakawa, T., Satoh, S., Watanabe, T., 1992. Supplemental effect of  
675 phospholipids and requirement of eicosapentaenoic and docosahexaenoic  
676 acid of juvenile striped jack. *Nippon Suisan Gakk.*, 58, 707-713.
- 677 Vega-Orellana, O.M., Fracalossi, D.M., Sugai, J.K., 2006. Dourado (*Salminus*  
678 *brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive  
679 proteinases. *Aquaculture*, 252, 484-493.
- 680 Youson, J.H. 1988. Fish metamorphosis. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish*  
681 *Physiology*, vol. XI, Part B. Academic Press, New York, pp. 135-196.

- 682 Yúfera M., Kolkovski S., Fernández-Díaz C., Rinchar J., Lee K.J., Dabrowski K..  
683 2003. Delivering bioactive compounds to fish larva using microencapsulated  
684 diets. *Aquaculture*, 227, 277-291.
- 685 Watanabe, T., Ohta, M., Kitajima, C., Fujita, S. 1982. Improvement of dietary value of  
686 brine shrimp *Artemia salina* for fish larva feeding them on w-3 highly  
687 unsaturated fatty acids. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1775-1782.
- 688 Zar, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall International, NJ, USA. 662 pp.

689

## Anexos

690

691 Tabela 1 – Regimes alimentares de larvas de linguado senegalense de 2 a 19 dias após a eclosão (DAE); ST –  
 692 Regime alimentar padrão com alimento vivo; Art R – Substituição de Artêmia por dieta inerte (com  
 693 base na matéria seca) desde a abertura da boca.

DAE	Tratamentos						
	ST			Art R			
	Rot	Na AF	Meta EG	Rot	Na AF	Meta EG	Dieta Inerte
2	3.0			3.0			0.1
3	5.0			5.0			0.1
4	8.0	2.0		8.0	2.0		0.1
5		4.0			4.0		0.1
6		6.0			5.0		0.2
7		8.0			6.0		0.2
8		8.0			6.0		0.3
9		4.0	4.0		3.0	3.0	0.4
10			6.0			3.0	0.5
11			8.0			4.0	0.6
12			10.0			5.0	0.8
13			12.0			6.0	0.9
14			12.0			6.0	1.1
15			14.0			7.0	1.2
16			14.0			7.0	1.5
17			16.0			8.0	1.8
18			16.0			8.0	2.2
19			18.0			9.0	2.7

694

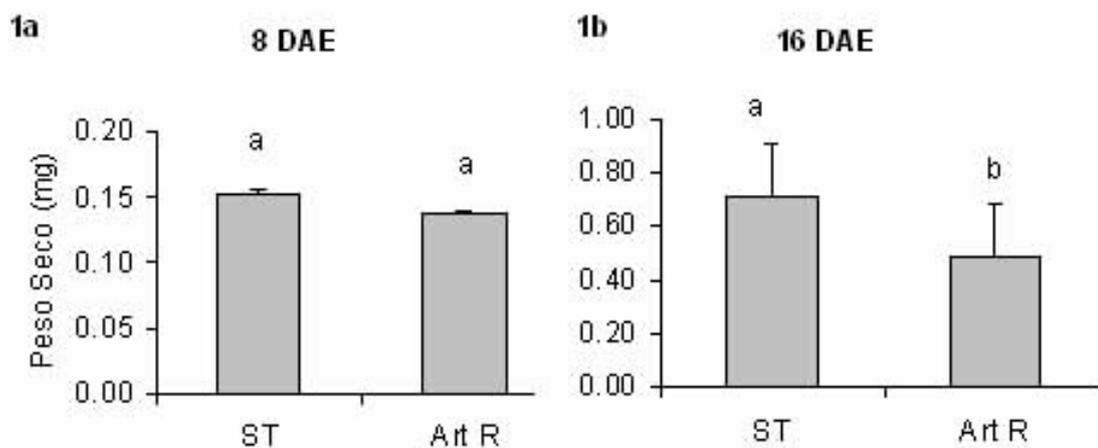
695

696

697

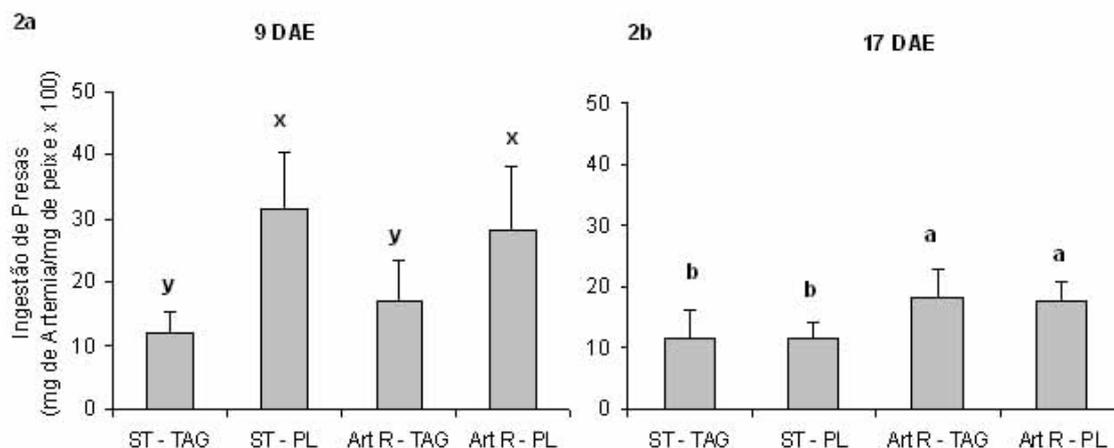
698

Rot: Rotíferos; Na AF: náuplios de Artêmia da linhagem AF; Meta EG: metanáuplios de Artêmia da linhagem EG; e Dieta Inerte: dieta Proton. Rotíferos e Artêmia foram expressos em “número de presas / volume de tanque em ml / dia; ração diária de dieta inerte foi expressa como ‘mg / tanque / dia’.



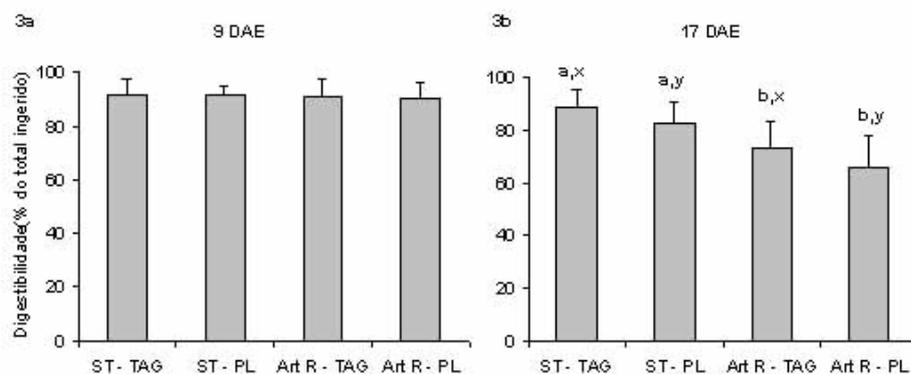
699

700 Figura 1 – Peso seco de linguado senegalense (mg) aos 9 dias após a eclosão (DAE) (1a, n = 3, amostras  
701 sortida de 30 larvas) e 16 DAE (1b, n = 15). ST – Regime alimentar padrão com alimento vivo; Art  
702 R – Substituição de Artémia por dieta inerte (com base na matéria seca) desde a abertura da boca.  
703 Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão. Diferentes letras para a mesma idade indicam diferenças  
704 estatísticas entre os tratamentos (P < 0,05, ANOVA).



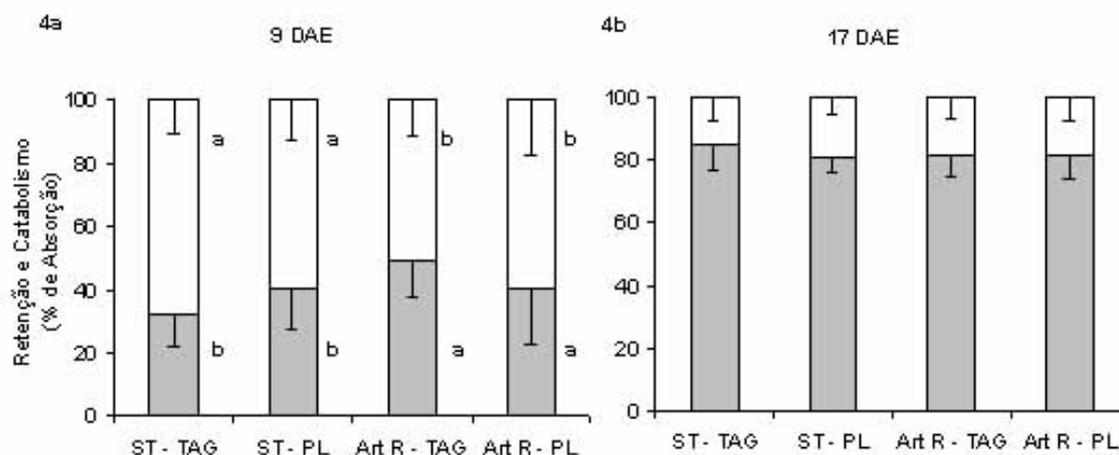
705

706 Figura 2 – Ingestão de presas por larvas de linguado aos 9 (2a) e 17 dias após a eclosão (DAE) (2b). Os  
 707 valores são médias  $\pm$  desvio padrão. ST – TAG (Regime alimentar padrão com alimento vivo +  
 708 Artêmia enriquecida com glicerol tri [1-<sup>14</sup>C] oleato - TAG); ST – PL (Regime alimentar padrão com  
 709 alimento vivo + Artêmia enriquecida com L-3-fosfatidilcolina-1,2-di-[1-<sup>14</sup>C] oleoil - PL); Art R – TAG  
 710 (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com TAG) and Art R - PL  
 711 (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com PL). Diferentes letras para a  
 712 mesma idade indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ , two way ANOVA) entre os regimes  
 713 alimentares (a, b) ou entre as fontes lipídicas (x, y).



714

715 Figura 3 – Digestibilidade determinada em larvas de linguado aos 9 (3a) e 17 dias após a eclosão DAE (3b). Os  
 716 valores são médias  $\pm$  desvio padrão. ST – TAG (Regime alimentar padrão com alimento vivo +  
 717 Artêmia enriquecida com glicerol tri [1-<sup>14</sup>C] oleato - TAG); ST – PL (Regime alimentar padrão com  
 718 alimento vivo + Artêmia enriquecida com L-3-fosfatidilcolina-1,2-di-[1-<sup>14</sup>C] oleoil - PL); Art R – TAG  
 719 (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com TAG) and Art R - PL  
 720 (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com PL). Diferentes letras para a  
 721 mesma idade indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ , two way ANOVA) entre os regimes  
 722 alimentares (a, b) ou entre as fontes lipídicas (x, y).



723

724 Figura 4 – Retenção lipídica e catabolismo determinada em larvas de linguado aos 9 (4a) e 17 dias após a  
 725 eclosão DAE (4b). Retenção (R, %) e Catabolismo (C, %) foram calculados como:  $R = [R_{\text{corpo}} / (R_{\text{corpo}} + R_{\text{CO}_2\text{armadilha}})] \times 100$ ;  
 726  $C = [R_{\text{CO}_2\text{armadilha}} / (R_{\text{corpo}} + R_{\text{CO}_2\text{armadilha}})] \times 100$ ; respectivamente, onde  $R_{\text{corpo}}$  é o  
 727 total de radioatividade no corpo do peixe (DPM) e  $R_{\text{CO}_2\text{armadilha}}$  é o total de radioatividade por  $\text{CO}_2$   
 728 armadilha (DPM). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão. ST – TAG (Regime alimentar padrão  
 729 com alimento vivo + Artêmia enriquecida com glicerol tri  $[1-^{14}\text{C}]$  oleato - TAG); ST – PL (Regime  
 730 alimentar padrão com alimento vivo + Artêmia enriquecida com L-3-fosfatidilcolina-1,2-di- $[1-^{14}\text{C}]$   
 731 oleoil - PL); Art R – TAG (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com TAG)  
 732 and Art R - PL (Substituição de Artêmia por dieta inerte + Artêmia enriquecida com PL). Diferentes  
 733 letras para a mesma idade indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ , two way ANOVA) entre os  
 734 regimes alimentares (a, b).