



**IPL**

**escola superior de turismo  
e tecnologia do mar**  
instituto politécnico de leiria

*Influência do protocolo de produção na qualidade das larvas de  
Mero*

*- Comportamento alimentar e fisiologia digestiva*

Mónica Andreia Ventura Mateus

2013





*Influência do protocolo de produção na qualidade das larvas de  
Mero*

*- Comportamento alimentar e fisiologia digestiva*

Mónica Andreia Ventura Mateus

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Raul Bernardino e co-orientação  
das Doutoradas Emília Cunha e Laura Ribeiro

2013



## Copyright

Eu Mónica Andreia Ventura Mateus, aluna de mestrado de aquacultura na Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar de Peniche, do Instituto Politécnico de Leiria, Autorizo os direitos de copyright da presente tese de mestrado, denominada “*Influência do protocolo de produção na qualidade das larvas de Mero – Comportamento alimentar e fisiologia digestiva*”.

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Este trabalho foi resultado de um conjunto de esforços, que sem os quais teria sido muito difícil a sua concretização. É neste sentido que demonstro a minha gratidão a todas as pessoas que estiveram envolvidas e disponíveis e me deram apoio e motivação.

Ao IPL, ESTM, coordenadora do mestrado Ana Violante Pombo e orientador interno Raul Bernardino.

Ao Pedro Pousão responsável pela estação de aquacultura (EPPO) do IPMA, por poder participar nos projetos a decorrer nas suas instalações.

Às minhas co-orientadoras Laura Ribeiro e Emília Cunha pela forma como me receberam, pelo entusiasmo e motivação pelo meu trabalho, pelo tempo disponível e incansável orientação.

Ao professor Paulo Gavaia e CCMar da Universidade do Algarve pela preciosa disponibilidade e orientação no trabalho relacionado com malformações esqueléticas.

À Margarida Gamboa pela amizade, ajuda e cuidado com as amostras a serem usadas neste trabalho.

À Paula Moura e Cátia Silva pela orientação no processamento histológico e enzimático.

A todos os colegas, amigos e família, especialmente a minha mãe Anabela Ventura, um muito obrigado!



**Resumo:** O mero, *Epinephelus marginatus*, é uma espécie marinha associada a recifes, referenciada como ameaçada, de acordo com a *red list of threatened species*. A sua reprodução e cultivo em cativeiro poderão contribuir para uma alteração deste estatuto. A obtenção de um grande número de indivíduos é um dos maiores problemas que esta espécie enfrenta. Para contrariar esta tendência é importante melhorar as taxas de sobrevivência associadas à fase larvar, através da melhoria do sistema de cultivo e protocolos alimentares. Este estudo teve como objetivo analisar o sistema de cultivo e a influência do protocolo alimentar na produção das larvas de mero (*E. marginatus*) tendo em conta o seu desenvolvimento e a qualidade larvar.

Para atingir este objetivo compararam-se dois sistemas de cultivo, Intensivo (1,5m<sup>3</sup>) e Semi-Intensivo (18 m<sup>3</sup>) com diferentes densidades larvares de 26.7g e 1.6 g de ovos m<sup>-3</sup> respetivamente. A adequação do protocolo de alimentação foi também analisada pela adição de copépodes (*Paracartia Grani*) ao protocolo alimentar padrão composto por rotíferos (*Brachionus plicatilis*), artémia (*Artemia spp.*) e ração comercial. Para avaliação da qualidade larvar analisou-se o comportamento alimentar, o crescimento e sobrevivência, as malformações esqueléticas, através do método de dupla coloração de osso e cartilagem, e a atividade enzimática das larvas, através da análise das enzimas amilase, tripsina, pepsina, aminopeptidase, fosfatase alcalina e fosfatase ácida, em diferentes fases do desenvolvimento.

Ao comparar o sistema Semi-Intensivo com o Intensivo observou-se que o cultivo em grandes volumes, com reduzida densidade promove o aumento da sobrevivência e a redução da ocorrência de malformações esqueléticas. A adição de copépodes à dieta resultou num desenvolvimento mais rápido das larvas, um melhor desenvolvimento do trato digestivo e maiores taxas de sobrevivência. O protocolo de produção semi-intensivo onde foram adicionados copépodes promoveu a criação de um maior número de indivíduos e de larvas de melhor qualidade sendo esta uma mais-valia para aquacultura desta espécie.

**Palavras-chave:** Mero (*Epinephelus marginatus*), mesocosmos, copépode (*Acartia grani*), Crescimento, Enzimas digestivos, Malformações esqueléticas.



**Abstract:** The dusky grouper, *Epinephelus marginatus*, is a marine reefs species, referenced as threatened according to *red list of threatened species*. Its reproduction in captivity and cultivation may contribute to change this status. Obtaining a large number of individuals is one of the biggest problems facing this species. To counteract this trend is important to improve survival rates in larval stage, by improving the rearing system and feeding protocols. The aim of this study was to analyze the rearing system and the influence of dietary protocol on dusky grouper larvae production in view of its development and quality.

To achieve this goal we compared two systems, Intensive (1.5 m<sup>3</sup>) and Semi-Intensive (18 m<sup>3</sup>) with different larval densities of 1.6 g and 26.7g eggs m<sup>-3</sup>, respectively. The suitability of the feeding protocol was also analysed by adding copepods (*Paracartia grani*) to the standard feeding protocol composed by rotifers (*Brachionus plicatilis*), brine shrimp (*Artemia spp.*) and dry feed. Larval quality was assessed by analyzing the larval feeding behavior, growth and survival, skeletal malformations, by double staining of bone and cartilage method, and enzymatic activities through the analysis of amylase, trypsin, pepsin, aminopeptidase, alkaline phosphatase and acid phosphatase.

Higher survival rates and lower incidence of skeletal malformations were observed for semi-intensive when compared with intensive systems indicating the beneficial effect of larger volumes and low rearing density on the larval quality. The addition of copepods to the diet resulted in a faster development of larvae, better development of the digestive tract and higher survival rates. The protocol of semi-intensive production and a feeding protocol including copepods promoted a larger number of individuals and better quality larvae which is an advantage for aquaculture of this species.

**Key-words:** Grouper (*Epinephelus marginatus*), mesocosm, copepods (*Acartia grani*), growth, digestive enzymes, skeletal malformation.



## Índice de matérias

<b>Índice de figuras</b> .....	xiii
<b>Índice de tabelas</b> .....	xv
1. Introdução .....	1
1.1. Espécie e importância do seu cultivo .....	1
1.2. Conservação da espécie.....	2
1.3. Desenvolvimento da espécie .....	2
1.4. Sistema de produção larvar .....	4
1.5. Alimento vivo.....	5
1.5.1. Rotíferos.....	6
1.5.2. Artémia.....	7
1.5.3. Copépodes .....	7
1.6. Qualidade Larvar.....	9
1.6.1. Desempenho larvar.....	9
1.6.2. Malformações esqueléticas .....	9
1.6.3. Fisiologia digestiva .....	11
1.7. Objetivo do estudo .....	12
2. Materiais e Métodos .....	13
2.1. Material biológico .....	13
2.2. Desenho Experimental .....	14
2.2.1. Tratamentos .....	14
2.2.2. Rotíferos.....	15
2.2.3. Artémia.....	16
2.2.4. Copépodes .....	17
2.2.5. Ração.....	17
2.3. Amostragens.....	17
2.4. Biometria.....	18
2.4.1. Comprimento total.....	18
2.4.2. Peso húmido .....	18
2.5. Malformações esqueléticas .....	18

2.5.1. Radiografia .....	18
2.5.2. Dupla coloração de osso e cartilagem .....	19
2.6. Análises enzimáticas .....	19
2.6.1. Preparação dos homogenados .....	19
2.6.2. Purificação do prato estriado intestinal .....	20
2.6.3. Enzimas digestivas .....	21
2.6.4. Expressão enzimática .....	22
2.7. Tratamento de resultados .....	23
3. Resultados .....	25
3.1. Desempenho larvar.....	25
3.1.1. Desenvolvimento.....	25
3.1.2. Crescimento.....	28
3.1.4. Sobrevivência.....	30
3.2. Malformações esqueléticas .....	31
3.2.1 Radiografia.....	31
3.2.2. Dupla coloração de osso e cartilagem .....	32
3.3. Enzimas digestivas .....	35
3.3.1. Enzimas digestivas .....	35
3.3.2. Prato estriado .....	42
4. Discussão.....	45
4.1. Desempenho larvar.....	45
4.2. Malformações esqueléticas .....	47
4.3. Enzimas digestivas .....	49
5. Conclusão.....	53
6. Referências bibliográficas .....	55

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Mapa representativo da distribuição geográfica de <i>Epinephelus marginatus</i> (Fishbase). .....	1
Figura 2.1. - Recolha de oócitos através de pressão abdominal, EPPO, IPMA. ....	13
Figura 3.1. - Gráficos representativos das curvas de crescimento larvar, em comprimento, dos diferentes tratamentos, 1- sistema Intensivo, 2- sistema Semi-Intensivo, 3- sistema Semi-Intensivo com copépodes.am) pré-metamorfose e pm) pós-metamorfose. ....	28
Figura 3.2. - Relação peso/comprimento total em <i>E. marginatus</i> , para os diferentes tratamentos entre os 25 e 62 DAE. ....	29
Figura 3.3. - Hipercalcificação das vertebrae hemais (na área do retângulo) de um mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Semi-Intensivo. ....	31
Figura 3.4. - Hipercalcificação das vertebrae hemais (na área do retângulo) de um mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Intensivo. ....	31
Figura 3.5. - Malformação das vertebrae cefálicas e pré-hemais 1-9; Fusão da vertebra da barbatana caudal e fusão de hipurais 1-2 de um Mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Intensivo. ....	32
Figura 3.6.- Malformação da mandíbula, arcos branquiais e opérculo de um mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Intensivo. ....	32
Figura 3.7.- Mero de 62 DAE sem malformações registadas, correspondente ao tratamento Semi-Intensivo com Copépodes. ....	33
Figura 3.8. - Incidência de malformações analisadas pelos dois métodos utilizados, raio-X e dupla coloração para os respetivos tratamentos. ....	33
Figura 3.9. - Incidência de malformações no método de dupla coloração para os respetivos tratamentos. ....	34
Figura 3.10. - Incidência de malformações no método de coloração para os respetivos tratamentos. ....	35
Figura 3.11. - Atividade específica da enzima amilase aos 30 e 62 DAE. ....	36
Figura 3.12. - Atividade total da enzima amilase aos 30 e 62 DAE. ....	36
Figura 3.13. - Atividade específica da enzima tripsina aos 30 e 62 DAE. ....	37
Figura 3.14. - Atividade total da enzima tripsina aos 30 e 62 DAE. ....	37
Figura 3.15. - Atividade específica da enzima pepsina aos 30 e 62 DAE. ....	38
Figura 3.16. - Atividade total da enzima pepsina aos 30 e 62 DAE. ....	38
Figura 3.17. - Atividade específica da enzima aminopeptidase aos 30 e 62 DAE. ....	39
Figura 3.18. - Atividade total da enzima aminopeptidase aos 30 e 62 DAE. ....	40
Figura 3.19. - Atividade específica da enzima fosfatase alcalina aos 30 e 62 DAE. ....	40

Figura 3.20. - Atividade total da enzima fosfatase alcalina aos 30 e 62 DAE. ....	41
Figura 3.21. – Atividade específica da enzima fosfatase ácida aos 30 e 62 DAE. ....	41
Figura 3.22. – Atividade total da enzima fosfatase ácida aos 30 e 62 DAE.....	42
Figura 3.23. – Atividade específica da enzima aminopeptidase no prato estiado, aos 62 DAE. ....	42
Figura 3.24. – Atividade total da enzima aminopeptidase no prato estiado, aos 62 DAE. ....	43
Figura 3.25. – Atividade específica da enzima Fosfatase alcalina no prato estiado, aos 62 DAE. ....	43
Figura 3.26. – Atividade total da enzima Fosfatase alcalina no prato estiado, aos 62 DAE. ....	44

## Índice de tabelas

Tabela I -	Condições experimentais de cultivo de larvas de mero ( <i>E.marginatus</i> ). .....	15
Tabela II -	Valor nutricional <i>M1 Plus</i> . .....	16
Tabela III -	Valor nutricional <i>M2 Plus</i> . .....	16
Tabela IV -	Comprimento total médio das larvas e frequência de estágios de desenvolvimento nos diversos sistemas de cultivo e dias de amostragem. (PrFx - Pré-flexão; Fx - Flexão; PoFx - Pós-Flexão; M - Metamorfose; % - frequência em percentagem; (n) – número de indivíduos; m±d.p - média e desvio padrão). .....	26
Tabela V -	Documentação fotográfica dos estágios de desenvolvimento das larvas de mero mais frequentes nos diversos tratamentos aos 20, 25 e 30 DAE. (Flexão – Fx, Pós-flexão – PoFx e Metamorfose – M). .....	27
Tabela VI -	Parâmetros das equações de crescimento larvar de <i>E. marginatus</i> nos respectivos tratamentos. ( <b>a</b> – inserção; <b>b</b> - taxa de crescimento diária; R <sub>2</sub> - coeficiente de determinação). .....	29
Tabela VII -	Tipo de relação entre o peso e o comprimento total apresentado por <i>E. marginatus</i> antes e depois da metamorfose das larvas. (R <sub>2</sub> - coeficiente de determinação; s.i. – sem informação). .....	30
Tabela VIII -	Sobrevivência nos diferentes tratamentos .....	31
Tabela IX -	Carga de malformações para os respectivos tratamentos. ....	34



## 1. Introdução

A avaliação de diferentes protocolos alimentares, sistemas de cultivo e impacto destes na qualidade larvar contribui para o conhecimento da produção em cativeiro de diversas espécies de peixes marinhos. É extremamente importante adaptar os protocolos alimentares à capacidade digestiva e de assimilação das larvas de peixe, uma vez que o alimento é a principal fonte de energia e nutrientes para o desenvolvimento e crescimento larvar. Neste trabalho realizou-se esta avaliação com base na análise do crescimento, sobrevivência, capacidade digestiva e malformações esqueléticas do mero, *Epinephelus marginatus* tendo em conta o seu desenvolvimento, dando especial importância à qualidade larvar.

### 1.1. Espécie e importância do seu cultivo

*Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), também conhecido por mero ou garoupa verdadeira, é uma espécie encontrada principalmente na costa do oceano Atlântico, ao longo da costa brasileira, africana e em todo o mar mediterrâneo, também é



Figura 1.1. - Mapa representativo da distribuição geográfica de *Epinephelus marginatus* (Fishbase).

encontrada na costa oeste do oceano indico (FishBase). Ainda segundo esta fonte, o tamanho máximo registado para esta espécie é de 150 cm de comprimento total, podendo pesar até 60 kg e atingir 50 anos de idade, sendo estes os máximos registados. Podem encontrar-se em profundidades desde os 8 aos 300m sendo o comum os 50m. Esta espécie é classificada como hermafrodita protogínica, ou seja, nascem fêmeas e quando atingem um certo nível de desenvolvimento, sofrem inversão sexual tornando-se machos.

Os métodos de aquacultura de mero têm sido desenvolvidos desde 1970, especialmente no sudeste Asiático e nas regiões ocidentais do Atlântico tropical e subtropical (Lim, 1993; Kuo, 1995; Watanabe et al., 1996) e mais recentemente, um pouco por todo mundo (Azzurro, E., 2000; Marino *et al.*, 2003; Russo, T., *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2013). No entanto existem algumas barreiras que necessitam de ser ultrapassadas para o sucesso desta espécie na aquacultura uma vez que esta espécie apresenta um crescimento lento uma maturação sexual tardia, a necessidade da recolha de machos do meio natural ou a inversão sexual artificial e a dependência de alimento vivo adequado por parte das larvas (Glamuzina *et al.*, 1998; Doi *et al.*, 1997).

## 1.2. Conservação da espécie

*Epinephelus marginatus*, para além do destaque comercial atribuído tem também um importante papel recreacional uma vez que representa um grande prémio para a pesca desportiva. Neste sentido e observando os declínios das capturas, esta espécie é referida na *red list of threatened species* da IUCN (International Union for Conservation of Nature) como ameaçada (EN A2d) desde 1996, correndo risco de extinção na natureza, devido à sobre-exploração (Zabala et al., 1997). Para a proteção desta espécie, existem alguns programas de conservação como é o caso do Decreto Legislativo Regional n.º 5/85/A de 8 de Maio de 1985 dos Açores, que proíbe a pesca desta espécie, e da Convenção de Berna relativa à conservação da vida selvagem e dos Habitats Naturais da Europa. São incentivadas medidas de gestão das pescas e dos habitats e desenvolvimento de técnicas de aquacultura a fim de aumentar e repovoar as populações em risco.

## 1.3. Desenvolvimento da espécie

O desenvolvimento larvar pode ser classificado por estágios, baseado nas características morfológicas. Considera-se estágio de saco vitelino, o primeiro estágio, até a absorção deste, o que coincide com o momento de abertura de boca. Uma alimentação inteiramente exógena e o início da formação dos espinhos dorsal e pélvicos designam o estágio de pré-flexão. O estágio de flexão inicia-se com a formação da

hipuralia e início da flexão da porção posterior do notocórdio. O estágio de pós-flexão diz respeito à completa flexão do notocórdio (45°), individualização das barbatanas ímpares, aparecimento dos espinhos da barbatana anal e raios das barbatanas peitorais. Na transformação, a cerca de 20 dias após eclosão (DAE), a estrutura de raios das barbatanas está completo. O estágio juvenil pelágico inicia-se com o aumento do comprimento corporal, início da pigmentação externa e alterações comportamentais. Cerca de 30 DAE a pigmentação externa torna-se evidente em todo o corpo e passam de pelágicas a bentónicas, sendo considerada a fase de assentamento. O estágio de juvenil demersal aparenta-se a um mero adulto e passam a estar assentes no fundo (Cunha *et al*, 2013).

O protocolo das fases descritas anteriormente, reprodução e larvicultura tem vindo a ser aprimorado (Cunha *et al*, 2013; Glamuzina, et al., 1998; Marino et al., 2001, 2003) no sentido de reduzir as altas taxas de mortalidade que coincidem principalmente com a absorção do saco vitelino e a primeira alimentação exógena. O cultivo de novas espécies como o mero tem apresentado alguns problemas pois a cada estágio larvar, estas necessitam de novas adaptações no cultivo como estratégias alimentares e conhecimento acerca da eco-morfologia larvar.

Em aquacultura, um dos aspetos mais importantes em termos de comercialização é o crescimento e correto desenvolvimento dos animais. Estes fatores estão fortemente ligados à alimentação fornecida às larvas uma vez que, uma alimentação inadequada gera reduzidas taxas de crescimento, elevado nível de malformações com consequência de elevadas mortalidades que já é um dos problemas dos estágios iniciais do desenvolvimento larvar. Para evitar o desenrolar destas situações é necessário adequar a densidade, tipo e tamanho de presa fornecida de acordo com o desenvolvimento dos órgãos sensoriais, tamanho da boca e capacidade digestiva das larvas nos diferentes estágios (Puvanendran & Brown, 1999; Planas & Cunha, 1999; Russo, T., et al, 2009).

Assim, o crescimento, inserido na qualidade larvar tem um papel bastante importante na aquacultura, quer para se obter adultos de qualidade, que apresentem um bom desenvolvimento; para serem comercializados ou mesmo para que estejam aptos em casos de repovoamento e que possam assegurar a sua sobrevivência. Neste sentido são usadas técnicas para avaliar as condições de cultivo a que as larvas foram sujeitas como é o caso da análise da estrutura esquelética dos indivíduos.

A morfologia e fisiologia digestiva das larvas de peixe são substancialmente diferentes dos peixes juvenis ou adultos. O sistema digestivo das larvas necessita sofrer um processo de maturação de tecidos e órgãos assim como uma alteração da gama de enzimas digestivas. Para entender a fisiologia nutricional das larvas e poder sincronizar a alimentação administrada e o protocolo alimentar consoante o crescimento ou estágio de desenvolvimento, mudanças alimentares e carências nutricionais é necessário estudar a diferenciação do trato digestivo das larvas (Zambonino & Cahu, 2007).

Um melhor conhecimento dos modelos de crescimento e desenvolvimento das larvas facilita a deteção de defeitos e promove o conhecimento para melhorar as técnicas de cultivo, especialmente as práticas de alimentação, criando protocolos alimentares adequados para o desenvolvimento de larvas de qualidade.

#### 1.4. Sistema de produção larvar

O avanço tecnológico e o domínio de técnicas para cultivo larvar, permitiu que a aquacultura seja produzida em grande escala. O sistema intensivo, caracterizados por uma elevada densidade de cultivo (80 - 100 larvas/litro) e um ambiente totalmente controlado (Lagos 1989; Kentouri et al., 1993; Dhert et al., 1998), mostrou ser bastante eficiente para a produção em grande escala em espécies em que o seu ciclo de vida em aquacultura é totalmente controlado como é o caso de espécies como *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Solea solea* e *Scophthalmus maximus*. No entanto este tipo de cultivo requer tecnologia mais avançada e dispendiosa e as taxas de sobrevivência e crescimento são normalmente mais baixas que os outros métodos, é comum existir também uma maior incidência de malformações e doenças, principalmente quando se trata do cultivo de novas espécies em que o seu ciclo de vida não é totalmente dominado (Divanach and Kentouri, 2000; Izquierdo et al, 2010).

O mesocosmos mostrou ser uma solução quando o conhecimento biológico de uma determinada espécie não está aprimorado (Divanach e Kentouri, 2000), como é o caso de *Pargus pargus* (Ben Khemis et al., 2006), *Hippoglossus hippoglossus* (Berg, 1997), *Diplodus puntazzo*, *Seriola dumerili* (Papandroulakis et al., 2004, 2005), *Pollachius virens*, *Ctenolabrus rupestris*, *Crenilabrus melops* (van der Meeren e Lonoy,

1998). Uma das razões é que neste sistema de produção os volumes de cultivo são grandes o suficiente e as densidades de cultivo baixas, para pequenas alterações no ambiente não afetarem as espécies cultivadas. Para além disso este ambiente assemelha-se mais ao meio natural e pode ser considerado um método empírico, fácil e eficaz onde, de forma natural pode fazer-se uma triagem das necessidades das novas espécies suprimindo estas necessidades e evoluindo as técnicas de produção para estudos posteriores (Divanach e Kentouri, 2000).

O sistema de mesocosmo é usado para a cultura de larvas de peixe, usando volumes de água que podem variar de 1 a 10.000 m<sup>3</sup>. Desenvolve-se um sistema oceânico, constituído por várias espécies. É constituído pela cadeia alimentar natural do fitoplâncton (diatomáceas, flagelados, *Nannochloris* spp., ...), de zooplâncton (tintínídeo ciliados, *Synchaeta* spp. e rotíferos *Brachionus* spp, copépodes, ...) e predadores (larvas de peixes). As condições ambientais do sistema de mesocosmo estão completamente ligadas ao clima local. (FAO, 1996).

### 1.5. Alimento vivo

O sucesso de uma aquacultura depende principalmente de taxas de natalidade, sobrevivência e crescimento dos organismos cultivados. Estas taxas estão fortemente relacionadas com a quantidade e qualidade de alimento disponível, principalmente quando se tratam de espécies marinhas, estas estão bastante dependentes da produção de presas vivas.

Um dos fatores que mais influencia o crescimento e sobrevivência das larvas é a alimentação. Esta baseia-se em alimento vivo como rotíferos, artémia e copépodes que necessitam de ser utilizados como alimento em função das necessidades larvares a cada estágio de desenvolvimento destas. Para que uma larva se alimente de determinada presa é necessário, principalmente, que esta se adapte biometricamente à boca da larva, que exista no tanque uma densidade adequada às suas necessidades e que esteja de acordo com as suas preferências comportamentais (Glamuzina et al., 1998; Doi et al., 1997). De acordo com estudos anteriores uma larva de 4 DAE apresenta uma altura e largura de boca de  $214 \pm 200 \mu\text{m}$  e  $259 \pm 6 \mu\text{m}$ , respetivamente (Russo, et al., 2009).

Alguns autores (Jancaric, 1964; Dabrowski and Glogowski, 1977) sugerem que o alimento vivo contribui com enzimas digestivas ajudando o processo de digestão, uma vez que este pode proporcionar a estimulação de secreções pancreáticas larvares, estimulando respostas endócrinas (Koven et al., 2001). Estudos anteriores mostram que os níveis de atividade enzimática são menores em larvas, comparando com juvenis (Clark et al., 1986).

O facto de o cultivo ser realizado no método de “água verde” fornece microalgas não só ao zooplâncton mas também às larvas de peixe. Algumas larvas de peixes marinhos (bacalhau, halibut e rodovalho) cultivadas neste ambiente que provavelmente afeta o comportamento alimentar e ingerindo microalgas (*Isochrysis galbana* e *Tertselmis* sp.) mostraram uma melhor sobrevivência, comportamento alimentar e crescimento, no fim do período da primeira alimentação comparando com cultivo sem microalgas (Reitan et al. 1997; Naas et al. 1992).

Estudos recentes sugerem que a disponibilidade de enzimas digestivas é a chave para larvas de peixe sobreviverem usando uma dieta formulada (Yufera et al, 2000; Kolkovski, 2001). Neste sentido, uma melhor compreensão da atuação das enzimas digestivas poderia conduzir a uma substituição bem-sucedida do alimento vivo por dietas formuladas.

#### 1.5.1. Rotíferos

Os rotíferos (*Brachionus* spp.) são considerados o melhor alimento inicial para as larvas uma vez que quando ocorre a abertura de boca, estas necessitam de alimentos vivos de pequenas dimensões e os rotíferos tem entre 120 - 300 µm que se adequam às suas necessidades. Para além das dimensões e de se deslocarem lentamente, os rotíferos apresentam também a vantagem de poderem ser facilmente cultivados e enriquecidos. As larvas necessitam uma grande quantidade e qualidade de alimento, principalmente no que diz respeito a ácidos gordos essenciais para o seu normal desenvolvimento, incluindo a manutenção estrutural e funcional das membranas celulares e produção de eicosanoides que têm uma grande importância na imunidade e resistência a doenças (Waagbø, 1994; Sargent et al., 1999). Para que as larvas adquiram todos os nutrientes

que necessitam, os rotíferos podem ser usados como vetor quando enriquecidos com microalgas, produtos comerciais ou emulsões laboratoriais com determinadas características nutritivas (Hotos, 2002).

### 1.5.2. Artémia

*Artemia* spp., é considerado ideal para larvas de peixes marinhos que se possam alimentar de presas com um tamanho superior a 500µm (Sorgeloos, P., 1987). Este alimento está bastante popularizado em aquacultura devido à elevada disponibilidade de cistos, podendo ser facilmente utilizados como náuplios após 24 horas. São também facilmente cultivados em grandes concentrações e apresentam um rápido crescimento podendo ser usados em várias fases do cultivo consoante as dimensões das larvas. Assim como os rotíferos, as artémias não são considerados o alimento natural para larvas de peixes marinhos, neste sentido, torna-se necessário a bioencapsulação com produtos que atendam às necessidades nutricionais das larvas como é o caso dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) usados como fonte de energia e constituintes dos fosfolípidos das membranas celulares (Gozalbo et al., 1987; Koven et al., 1992). Existem várias estirpes de artémia, o conhecimento das características (genotípicas e fenotípicas) de um lote pode aumentar significativamente a sua eficácia quando administradas como alimento a larvas (Lavens e Sorgeloos 1996). Normalmente são usadas as estirpes com náuplios mais pequenos, recentemente eclodidas (*instar I*), e mais ricas em HUFA (Great Salt Lake, Utah).

### 1.5.3. Copépodes

Para a maioria das larvas de peixes marinhos, os copépodes são presas do meio natural. Estes pequenos crustáceos constituem a ligação vital entre os produtores primários e os peixes (Dussart e Defaye 2001; Sazhina 2006) e são nutricionalmente adequados às larvas de peixes marinhos mesmo sem serem enriquecidos. Geralmente os copépodes apresentam um conteúdo lipídico mais baixo quando comparados com o alimento vivo tradicionalmente cultivado (rotíferos e artémias) mas contêm uma maior proporção de fosfolípidos facilmente digeríveis. As suas dimensões são também

apropriadas para servirem de alimento às pequenas larvas uma vez que os náuplios de copépodes e adultos variam de 100µm a 10mm (Mauchline, 1998). Os copépodes adultos podem constituir até 57% de lípidos totais e 63% no que diz respeito aos náuplios (van der Meeren et al. 2008).

As larvas de peixes marinhos necessitam também de elevados níveis de ácidos gordos essenciais como DAE, que são mais facilmente assimilados a partir de copépodes que náuplios de artémia (McEvoy et al. 1998). Estudos anteriores (Sargent et al. 1997; Estevez et al. 1999) documentam elevadas taxas de crescimento, sobrevivência e melhores pigmentações em larvas e juvenis que são atribuídos ao conteúdo e rácio de ácidos gordos essenciais DHA, EPA, e ARA presentes em copépodes. Outro aspeto vantajoso são os elevados níveis de enzimas digestivos bastante importantes para a nutrição das larvas e desenvolvimento do trato digestivo, uma vez que nos primeiros estágios de desenvolvimento, as larvas de peixes marinhos não apresentam um sistema digestivo desenvolvido, tornando-se uma vantagem um suplemento exógeno de enzimas, a partir do alimento vivo. Esta evidência vem a partir de um estudo Pederson (1984) que examinou a digestão das larvas na primeira alimentação e observou que os copépodes são mais facilmente digeridos pelas larvas que a artémia.

Nas teias alimentares marinhas, os ciliados como *Oxyrrhis marina* desempenham um papel importante como consumidores de pico e nanoplâncton que não são eficientemente utilizados por organismos como copépodes. Neste sentido, estudos recentes mostram que os ciliados representam uma forte ligação entre os níveis tróficos da cadeia alimentar. Outro fator importante foi revelado no estudo de Korniyenko (1971) onde o consumo de ciliados por larvas de peixe, na primeira alimentação poderia trazer um aumento na sobrevivência, o que também foi comprovado para sobrevivência e crescimento das larvas de *Lithognathus mormyrus* (Linnaeus) por kentouri e Divanach (1983). A presença de ciliados e náuplios de copépodes no tanque, no momento da primeira alimentação, aumenta significativamente a capacidade de sobrevivência das larvas de peixe, uma vez que evita a o período de fome quando se dá a abertura de boca das larvas. Os ciliados, uma vez que se alimentam de algas (elevado valor nutritivo) e apresentam dimensões apropriadas à boca das larvas com poucos dias, resultam numa melhor sobrevivência larvar (Nagano, N., et al, 2000).

## 1.6. Qualidade Larvar

### 1.6.1. Desempenho larvar

Em aquacultura, principalmente quando se tratam de novas espécies, existem algumas preocupações como a produção do número suficiente de larvas e juvenis e a criação destes com tamanho e características adequadas. Estas características vão ser influenciadas por diversos fatores, entre eles, a qualidade da água, o tipo e disponibilidade de alimento, o ambiente onde estão inseridos e até o comportamento dos peixes no tanque. Estes fatores, fora dos limites aceitáveis levam à redução das taxas crescimento assim como a uma maior incidência de doenças e mortalidades mais elevadas (Le Francois, 2010; Tucker & Hargreaves, 2008).

Este crescimento pode ser analisado pelas relações entre comprimento, peso, altura corporal, entre outras. Através destes parâmetros podemos também analisar o tipo de crescimento podendo este ser isométrico ou alométrico. A relação entre peso e comprimento difere entre espécies (de acordo com a sua forma corporal) e entre indivíduos da mesma espécie, tendo em conta a sua robustez, o que pode ser influenciado pelas condições de cultivo. Avaliando o peso e comprimento dos indivíduos chegamos a um valor teórico do crescimento isométrico – coeficiente de regressão = 3 (Underwood, 1997; Prein et al., 1993).

O estudo de alometria e o efeito das variações de tamanho relativamente à forma tem promovido o conhecimento em relação a crescimento, evolução e mudanças necessárias na dimensão das formas para manter a funcionalidade.

### 1.6.2. Malformações esqueléticas

Um dos fatores que mais afeta a larvicultura marinha em termos de qualidade larvar, são as malformações esqueléticas uma vez que mesmo em espécies com o cultivo completamente controlado como a dourada e o robalo, 50-60% dos juvenis apresenta pelo menos uma deformação esquelética grave detetável externamente. Este fator pode ter impactos na indústria da aquacultura uma vez que alguns destes peixes necessitam ser descartados ou vendidos a preços mais baixos que o normal. De um modo geral as malformações esqueléticas exercem efeitos negativos no bem-estar

animal, performance biológica, qualidade do produto final e custos de produção (Boglione et al, 2013a). Neste sentido a contribuição de estudos (Smith-Vaniz, et al., 1995; Faustino, M. e Power, D., 1998; Gavaia, et al, 2000) para a diminuição de malformações pode trazer vantagens para a produção e melhorar a imagem da aquicultura perante o consumidor (Boglione et al., 2009).

Os peixes que sofrem de anomalias esqueléticas apresentam, normalmente uma reduzida habilidade natatória, um baixo índice de conversão, menores taxas de crescimento e sobrevivência; maior suscetibilidade ao *stress*, patógenos e bactérias (Hilomen-Garcia, 1997; Koumoundouros et al., 1997; Boglione et al., 2001), estas malformações podem ser influenciadas por condições de cultivo inapropriadas como temperatura, pH, densidade de cultivo, caudal, alimentação, metais pesados presentes na água, entre outros. (Boglione et al., 2001). Ao identificar um desenvolvimento anormal da estrutura esquelética pode obter-se uma avaliação precoce da qualidade das larvas uma vez que outros parâmetros por si só, nem sempre são suficientes como indicadores de qualidade de larvas e juvenis (Boglione et al, 2013a).

Boglione et al, (2009) desenvolveram o primeiro estudo de malformações esqueléticas em larvas e juvenis de *E. marginatus* cultivados em diferentes condições. Este estudo mostrou que as malformações ocorrem maioritariamente após o início da ossificação (cerca de 30 DAE), aumentando a incidência com a idade. Em larvas com mais de 30 DAE as vertebrae caudais e barbatana são as zonas mais afetadas uma vez que estas, nesta idade já se encontram ossificadas. Foram avaliadas também diferentes densidades de cultivo, onde elevadas densidades apresentaram uma maior carga e frequência de malformações e menores taxas de sobrevivência. Esta análise mostrou-se bastante útil uma vez que também se pode avaliar os protocolos aplicados e indicar qual o mais apropriado para o cultivo larvar desta espécie (Boglione et al, 2009). As malformações podem ser resultado de fatores genéticos ou incapacidade de compensar as condições ambientais e nutricionais não apropriadas (Boglione et al, 2013b).

É possível fazer uma boa avaliação da estrutura esquelética, do seu desenvolvimento e suas possíveis anomalias usando técnicas de coloração de osso e cartilagem. Esta técnica já foi usada por diversos autores em diversas espécies como *Pagrus major* (Matsouka, 1985), *Dicentrarchus labrax* (Daoulas et al, 1991) *Sparus*

*aurata* (Kuomoundouros et al, 1997), *Solea senegalensis*, *Diplodus sp.*, *Habbatrachus didactylu* (Gavaia et al, 2000), entre outros.

### 1.6.3. Fisiologia digestiva

A ontogênese de enzimas digestivas e o desenvolvimento das características do trato digestivo de larvas e juvenis de peixes têm sido documentados em diversas espécies como robalo (Zambonino Infante e Cahu, 1994), linguado (Ribeiro et al., 1999), pregado (Hoehne-Reitan et al., 2001), entre outros. Para além de permitir avaliar a capacidade digestiva ao longo do desenvolvimento, estes estudos têm sido realizados com o intuito de sincronizar os protocolos alimentares com a fisiologia dos diferentes estados larvares e as necessidades nutricionais específicas das idades, otimizando a produção larvar (Zambonino-Infante et al., 2008).

A maturação do trato digestivo das larvas de peixe ocorre poucas semanas após a eclosão, e corresponde à transição entre uma digestão larvar pouco desenvolvida e uma digestão com total capacidade, considerada adulta (Zambonino Infante e Cahu, 2001).

Dabrowski (1984) e Person-Le Ruyet (1989) descreveram importantes alterações no trato digestivo das larvas ao longo do seu desenvolvimento. Quando eclodem, o trato digestivo é um tubo reto com a boca fechada e histologicamente indiferenciado. O trato digestivo não sofre grandes alterações desde a abertura de boca à absorção do saco vitelino mas após esta fase diferencia-se em bucofaringe, intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. O fígado e o pâncreas estão formados na eclosão e são funcionais na primeira alimentação. A digestão de nutrientes ocorre no trato gastrointestinal e é realizada pelas enzimas do estomago, pâncreas exócrino e intestino. Enquanto larvas, não tendo um estomago funcional, a digestão do alimento ingerido ocorre no intestino onde o pH permanece alcalino e enzimas como a tripsina realizam a atividade proteolítica (Walford e Lam, 1993). Após a digestão inicial das proteínas pela tripsina e outras endoproteases, exoproteases ligadas ao prato estriado da membrana dos enterócitos, degradam os péptidos em aminoácidos antes de serem absorvidos pelo lúmen do intestino (Clark et al., 1987; Rust, 2002). A digestão de proteínas por enzimas intracelulares como a fosfatase ácida ocorre em larvas de peixe, compensando a falta de um estômago funcional (Georgopoulou et al., 1985; Govoni et al., 1986; Cahu e

Zambonino Infante, 1995). O período larvar termina com o desenvolvimento do estômago com glândulas gástricas e secos pilóricos, momento em que o sistema digestivo se torna funcional. Gisbert et al (2009) resumem os principais passos para um sistema digestivo maturado, sendo o primeiro a aquisição de secreções pancreáticas, o segundo, o aparecimento de atividade enzimática no prato estriado do intestino e o terceiro, o desenvolvimento do estômago e início da digestão ácida.

O crescimento dos animais está relacionado com as capacidades do seu sistema digestivo e a utilização de nutrientes depende da atividade das enzimas digestivas presentes em vários órgãos digestivos. A produção de novas espécies, como é o caso do mero, depende fortemente da elaboração de protocolos alimentares adequados, capazes de satisfazer as necessidades nutricionais da espécie. O conhecimento do funcionamento do aparelho digestivo e das enzimas digestivas do peixe têm tido importantes implicações práticas para a nutrição destas espécies. A digestão de uma dieta depende da disponibilidade de enzimas digestivas adequadas, e a medição de atividades específicas de enzimas pode gerar informação acerca de toda a capacidade digestiva e eficiência que as espécies cultivadas apresentam na utilização dos componentes da sua dieta (Caruso et al, 2009). As atividades de enzimas digestivas em peixes são indicativos de ecologia alimentar e apresentam uma forte correlação com a dieta (Kapoor et al. 1975; Fernández et al. 2001), tornando-se uma indispensável ferramenta para a análise do desenvolvimento digestivo. No entanto esta atividade enzimática varia entre espécies e podem ser influenciadas pela idade, quantidade e composição da dieta (Peres et al. 1998). Moran e Clements (2002) estudaram peixes que sofreram mudanças alimentares e encontraram alterações nas atividades de enzimas digestivas que refletiam as mudanças na dieta dos peixes.

### 1.7. Objetivo do estudo

Este estudo tem então como objetivo analisar a influência do protocolo alimentar na produção das larvas de mero (*Epinephelus marginatus*) tendo em conta o seu desenvolvimento, dando especial importância à qualidade larvar.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material biológico

Os ovos foram obtidos a partir de reprodutores selvagens, mantidos em cativeiro na Estação de Piscicultura Piloto de Olhão (EPPO) do Instituto Português do Mar e



da Atmosfera (IPMA). Os reprodutores, foram

Figura 2.1. – Recolha de oócitos através de pressão abdominal, EPPO, IPMA.

alimentados com pota (*Loligo gahi*) e sardinha (*Sardina pilchardus*) *ad libitum* uma vez por dia. A indução da postura foi feita com 45µg *gonadotropin-releasing hormone agonist* (GnRH<sub>a</sub>)/Kg no caso das fêmeas e 2.5mg  $\alpha$ -methyltestosterone ( $\alpha$ -MT)/Kg no caso dos machos. Após 48 horas, os produtos sexuais (oócitos e sémen) foram recolhidos através de pressão abdominal (*stripping*), procedendo-se posteriormente à fertilização (Marino *et al.*, 2003; Cabrita *et al.*, 2009). Os ovos viáveis (que flutuam) foram separados dos ovos inviáveis que afundam na coluna de água.

Foi feita uma estimativa do número de ovos de mero, sendo que um grama de ovos corresponde a 2163 ovos. O diâmetro médio de ovos foi de 900 µm apresentando apenas uma gota lipídica.

Colocou-se para incubação *in situ* 26,7g de ovos m<sup>-3</sup> (~57669 ovos m<sup>-3</sup>) no tanque para avaliação do sistema intensivo e 1,6g de ovos m<sup>-3</sup> de ovos (~3604 ovos m<sup>-3</sup>) em cada um dos tanques para avaliação dos sistemas semi-intensivos (sem e com copépodes).

## 2.2. Desenho Experimental

### 2.2.1. Tratamentos

Este estudo comparou o efeito, na performance das larvas, do sistema de cultivo intensivo e semi-intensivo e o da adição de copépodes (*Acartia grani*) à dieta alimentar no início do cultivo larvar no sistema semi-intensivo.

A comparação entre os dois sistemas foi feita usando a mesma dieta alimentar e duas densidades larvares diferentes, 26.7g e 1.6 g de ovos m<sup>-3</sup>, tendo-se usado dois tanques de cultivo de volume diferente, 1.5 m<sup>3</sup> e 18 m<sup>3</sup> respectivamente. A dieta foi composta inicialmente por rotíferos (*Brachionus plicatilis*) seguida de artémia (*Artemia spp.*) 15 dias após a eclosão (DAE) e ração comercial 42 DAE.

Para a comparação do efeito da adição de copépodes no protocolo alimentar usou-se a mesma densidade larvar nos tanques de 18 m<sup>3</sup> em sistema de cultivo semi-intensivo. As dietas eram compostas por rotíferos, sendo uma enriquecida com náuplios do copépode (*Paracartia grani*) durante os primeiros 15 DAE. Após este período os dois tanques foram alimentados com artémia e 42 DAE com ração comercial. Os ensaios tiveram a duração de 62 dias.

Os tratamentos de cultivo semi-intensivo foram realizados em tanques exteriores de 18 m<sup>3</sup>, fotoperíodo natural, arejamento central e uma renovação de água inicial de 0%. Utilizou-se o método de água verde com *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*, 5 rotíferos/ ml e 1 artémia/ ml. No cultivo semi-intensivo com copépodes foram adicionados *Oxyrrhis marina* e 2 náuplios de copépode por ml.

O cultivo intensivo foi realizado num tanque de cultivo interior, fotoperíodo artificial (14 horas de luz/ 10 horas de escuridão), arejamento central e 0% de renovação de água inicial. Usou-se igualmente o método de água verde com *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*, 5 rotíferos/ ml e 1 artémia/ ml.

Tabela I. – Condições experimentais de cultivo de larvas de mero (*E. marginatus*).

<b>Sistemas de cultivo</b>	Intensivo	Semi-Intensivo sem copépodes	Semi-Intensivo com copépodes
<b>Localização</b>	Interior	Exterior	Exterior
<b>Volume (m<sup>3</sup>)</b>	1.5	18	18
<b>Oxigénio dissolvido (mg.l<sup>-1</sup>)</b>	5.5± 0.90	5.9± 1.42	5.7± 1.35
<b>Temperatura (°C)</b>	23.3 ± 0.87	22.9 ± 1.01	22.9 ± 1.01
<b>Fotoperíodo</b>	Artificial (14L/10E)	Natural (15L/9E)	Natural (15L/9E)
<b>Fitoplancton</b>	<i>Isochrysis galbana</i> + <i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Isochrysis galbana</i> + <i>Nannochloropsi s oculata</i>	<i>Isochrysis galbana</i> + <i>Nannochloropsis oculata</i> + <i>Oxyrrhis marina</i>
<b>Zooplankton (N.ml<sup>-1</sup>)</b>	5 <i>Brachionus</i> spp. + 1 <i>Artemia</i> spp.	5 <i>Brachionus</i> spp. + 1 <i>Artemia</i> spp.	5 <i>Brachionus</i> spp. + 1 <i>Artemia</i> spp. + 2 <i>Acartia grani</i>
<b>Densidade larvar (g de ovos .m<sup>-3</sup>)</b>	26.7	1.6	1.6

### 2.2.2. Rotíferos

Os rotíferos (*Brachionus plicatilis*) administrados às larvas de mero foram enriquecidos com emulsões comerciais (*M1 PLUS - DHA Microencapsulated Diet Plus Freeze-Dried Chlorella*), com um tamanho de partículas de 5-20 µm, e (*M2 Plus – DHA Microencapsulated Diet for Rotifer & Artemia Enrichment with natural Bacteriostatics*), com partículas de 5-10 µm e dados como alimento aos meros do dia 1 ao 15 após eclosão numa densidade de 5 rotíferos.mL<sup>-1</sup>.

O seu cultivo foi realizado em grande escala de acordo com Pousão, P. (2009), com uma densidade de cultivo entre 500 e 2000 rotíferos.mL<sup>-1</sup>, a produção iniciou-se a partir de uma cultura inóculo fez-se crescer em volumes sucessivamente maiores. A cultura é influenciada pela densidade, qualidade da água, temperatura, salinidade,

oxigénio dissolvido, amónia, pH e a disponibilidade e qualidade de alimento. Para que correspondessem às necessidades nutricionais das larvas, principalmente em ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa – HUFA (20:5n-3 e 22:6n-3), os rotíferos foram enriquecidos geralmente 24 horas antes de serem administrados como alimento vivo às larvas.

Tabela II – Valor nutricional *M1 Plus*

Proteína:	10%
Lípidos:	45%
Hidratos de carbono:	35%
Minerais:	5%
Humidade:	5%
EPA:	40 mg/g DW
DHA:	50 mg/g DW
ARA:	5 mg/g DW
$\Sigma(n-3)$ HUFAS:	100 mg/g DW

Tabela III – Valor nutricional *M2 Plus*

Proteína:	20%
Lípidos:	35%
Hidratos de carbono:	35%
Minerais:	5%
Humidade:	5%
EPA:	40 mg/g DW
DHA:	100 mg/g DW
ARA:	5 mg/g DW
$\Sigma(n-3)$ HUFAS:	150 mg/g DW

### 2.2.3. Artémia

Os náuplios de artémia, administrada às larvas de mero, após a eclosão foram enriquecidos 24 horas com uma emulsão comercial (*M2 Plus – DHA Microencapsulated Diet for Rotifer & Artemia Enrichment with natural Bacteriostatics*), com partículas de 5-10  $\mu\text{m}$  e um valor nutricional referido na tabela III. Foi administrada 1 artémia.mL<sup>-1</sup> às larvas de mero do dia 9 ao 42 após eclosão.

A artémia foi adquirida em cistos desidratados, em diapausa, que ao serem colocados novamente em água doce, reidrataram e os cistos (córion) romperam-se libertando os náuplios de artémia, consequência da ação física do sistema hiperosmótico trealose-glicerol (Narciso, 2000). Para suprimir as necessidades das larvas foram necessárias produções em grande escala de acordo com Pousão, P. (2009), e para tal foi importante assegurar a máxima taxa de eclosão. Uma temperatura, luminosidade, salinidade, pH, arejamento e densidade adequadas asseguraram uma boa taxa de eclosão. Após a eclosão foram então adicionados os produtos de enriquecimento como alimento para os náuplios.

#### 2.2.4. Copépodes

Os copépodes (*Acartia grani*) foram obtidos a partir de adultos de uma população alimentada com uma mistura de *Rhodomonas salina* e *Oxyrrhis marina* e administrados às larvas a partir do dia 1 após eclosão, numa densidade de 1 copépode.mL<sup>-1</sup>. *Acartia grani* foi isolada a partir do plâncton do meio natural e cultivados em tanques sob condições ideais para a espécie (Cunha et al, 2007). A água foi filtrada, foram alimentados com *Rhodomonas salina* e *Oxyrrhis marina*, a uma temperatura mantida entre os 16-18°C e foi fornecido arejamento leve. Os ovos gerados pelas fêmeas, em cerca de 20 dias, foram coletados para dar continuidade à população, colocados em tanques e após 24-48 horas eclodiram.

#### 2.2.5. Ração

A ração comercial (LSB Primer 1, 2, 3) foi administrada aos meros, *ad libitum*, do dia 42 ao 62 (fim da experiência) após eclosão.

### 2.3. Amostragens

Ao longo do período experimental foram realizadas amostragens periódicas, para os diferentes tratamentos. Aos 2, 6, 11, 16, 20, 25, 30 e 62 dias após a eclosão (DAE) foram recolhidas larvas para determinação do comprimento total. O peso húmido foi determinado individualmente a partir dos 25 DAE e até ao final do ensaio. Recolheram-se ainda amostras para determinação de enzimas digestivas aos 30 e 62 DAE, as quais foram lavadas com água destilada e congeladas de imediato em azoto líquido onde ficaram armazenadas até à análise. Para malformações esqueléticas recolheram-se larvas aos 62 DAE, as quais foram de imediato fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, pH 7.2 e mantidas a 4°C até processamento.

## 2.4. Biometria

### 2.4.1. Comprimento total

As medições de comprimento total das larvas até aos 30 DAE foram feitas à lupa (ZEISS Stemi 2000-C). Dos 11 aos 25 DAE foram medidas cerca de 10 larvas e aos 30 DAE 25 larvas. Aos 62 DAE mediram-se cerca de 60 larvas por tratamento, a olho nu. Dos 16 aos 30 DAE foram recolhidas e fotografadas larvas para determinação do estágio larvar, e mediu-se o seu comprimento total para cada estágio através do *software* ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, National institutes of Health, USA).

### 2.4.2. Peso húmido

O peso foi medido individualmente em cada peixe numa balança (Mettler AE100) a partir de 25 DAE. Foram pesadas 10 larvas aos 25 DAE, 25 larvas aos 30 DAE e cerca de 60 larvas aos 62 DAE.

## 2.5. Malformações esqueléticas

As amostras de 30 indivíduos por tratamento, fixadas em paraformaldeído foram lavadas num banho de tampão fosfato-salino (PBS) por 30 minutos e colocadas em etanol a 70% sendo posteriormente utilizados para a radiografia e coloração de osso e cartilagem.

### 2.5.1. Radiografia

Os peixes utilizados nas radiografias foram hidratados, passando progressivamente por uma sequência decrescente de álcoois de 70% para 50%, para 25% e finalizando em H<sub>2</sub>O, em banhos com uma duração de 1 hora e 30 minutos. Os meros foram radiografados com o auxílio de um aparelho de raio-X Kodak DXS 4000, com um *software* para a captação das imagens, Carestream DXS.

## 2.5.2. Dupla coloração de osso e cartilagem

Para uma observação mais precisa da estrutura esquelética dos peixes e dos estados de desenvolvimento ósseo foi usada uma técnica de coloração de osso e cartilagem descrita para peixes marinhos (Gavaia et al, 1999).

Após a hidratação as amostras foram colocadas numa solução de azul alcão (10 mg de azul alcão 8GX, 70 ml de etanol absoluto, 30 ml de ácido acético glacial, pH  $\leq$  1.0) para a coloração da cartilagem, durante 3 horas. Seguidamente as amostras foram neutralizadas com uma solução de 1% KOH em etanol absoluto, colocadas novamente em banhos progressivos de 1 hora e 30 minutos com 80, 70, 50 e 25% de etanol até H<sub>2</sub>O destilada. Após este processo os peixes foram incubados numa solução de vermelho de alizarina (0,01g vermelho de alizarina em 100 ml de KOH 0,5%) durante 1 dia. Para acelerar o processo de digestão química dos tecidos, os peixes foram deixados numa solução de hidróxido de potássio (KOH 2,5%) durante 5 dias e após este período transferidos para KOH a 1% durante 30 a 40 dias. Para manter a integridade dos peixes a solução anterior foi substituída por uma solução 0,5% KOH + Glicerol, aumentando as proporções de 3:1, 1:1, 1:3 até ser possível a visualização do esqueleto devido à digestão química dos tecidos.

## 2.6. Análises enzimáticas

### 2.6.1. Preparação dos homogenados

Aos 30 DAE foram retiradas 15 larvas por tratamento, tendo sido agrupadas em grupos de 5 indivíduos (*pool*) por cada tratamento (n=3). Aos 62 DAE foram recolhidas 6 larvas para cada tratamento.

No momento da determinação da atividade enzimática as larvas, foram transferidas do azoto líquido para um congelador a -20°C, para evitar alterações bruscas na temperatura no processo de descongelamento. Nas amostras de 30 DAE utilizou-se a região da cavidade abdominal, descartando a cabeça e a cauda. O tamanho das larvas de 62 DAE permitiu que se recolhesse individualmente o trato digestivo e órgãos anexos de cada uma das larvas. Durante todo o processo de dissecação foram mantidas sobre gelo.

As amostras de 30 DAE foram homogeneizadas com água desionizada Milli-Q numa proporção de 1:15 com o auxílio do ULTRA-TURRAX® durante 1 minuto, neste processo, as amostras foram mantidas em gelo. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 5000 x g durante 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante recolhido para tubos os quais, foram sujeitas a ultra-sons durante 10 segundos e armazenadas a -20°C.

#### 2.6.2. Purificação do prato estriado intestinal

Nos tratos digestivos dos meros de 62 DAE, procedeu-se à purificação do prato estriado (PE), em que os tecidos foram homogeneizados com tampão de homogeneização (Manitol 50mM + Tris 2mM) a pH 7, 30 vezes o volume da amostra, maceradas com o auxílio do ULTRA-TURRAX® durante 1 minuto.

Retirou-se 1ml para BB e adicionou-se a este, uma solução de cloreto de cálcio (0.1M) para estabilizar as membranas. O restante homogenado dividiu-se em microtubos e centrifugou-se a 5000x g durante 15 minutos a 4°C, como realizado para as amostras de 30 DAE.

Os homogenados para análise do BB foram centrifugadas a 9000 x g durante 10 minutos a 4°C. Em seguida recolheu-se o sobrenadante e centrifugou-se a 34000 x g durante 20 minutos a 4°C. Depois de centrifugar, eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado, que continha as membranas do prato estriado com 1 ml de uma solução tampão contendo Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). Todo o procedimento foi desenvolvido segundo o método de Crane et al (1979) adaptado para larvas de peixe por Cahu e Zambonino (1994).

### 2.6.3. Enzimas digestivas

#### Amilase

A amilase (E.C.3.2.1.1) é uma enzima pancreática, a atividade desta enzima determinou-se, de acordo com Métails e Bieth (1968), colocando cada alíquota (50 µl) nos tubos de reação, adicionou-se 100 µl de solução de amido deixando reagir por 30 minutos num banho a 37°C, a reação foi parada com 20 µl de HCl (1M). Em seguida colocou-se 50 µl de amostra no tubo de reação do controlo (branco), 400 µl de água desionizada e 2 ml de solução de iodo. As amostras foram colocadas numa microplaca e lidas no espectrofotómetro a 580 nm.

#### Tripsina

A atividade da enzima tripsina (E.C.3.4.21.4), que é uma enzima pancreática, foi medida usando o substrato específico *N*<sub>α</sub>-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) para avaliar a atividade da tripsina (Holm et al, 1988). Este foi diluído em tampão Tris-HCl 50 mM, 20mM CaCl<sub>2</sub> com um pH 8,5. Colocou-se em microplaca 15 µl de amostra e 200 µl de substrato e leu-se a 407 nm em intervalos de 1 minuto a 25°C, durante 15 minutos.

#### Pepsina

A atividade da pepsina, enzima que é produzida nas glândulas gástricas do estômago, foi medida colocando em tubos de reação 500 µl de substrato hemoglobina bovina (Anson, 1938), aquecido previamente 5 minutos a 37°C e 100 µl de amostra, 20 minutos em banho a 37°C. Após este tempo, adicionou-se TCA a 5% nos tubos de reação e por fim a amostra nos tubos da reação controlo (branco). Centrifugou-se as amostras a 4000 x g durante 6 minutos a 4°C e leu-se a 280 nm.

#### Aminopectidase

A atividade da aminopectidase (E.C.3.4.11.2), enzima intestinal, foi medida utilizando o substrato L-leucina p-nitroanilina (2mM) dissolvido em tampão Tris-HCl 100mM com um pH 8,8 (Maroux et al., 1973). Numa microplaca colocou-se 50 µl de

amostra e 250 µl de substrato e leu-se a 407 nm a 25°C em intervalos de 1 minuto. Esta análise enzimática realizou-se quer para os homogenados de 30 e 62 DAE quer para análise da atividade do prato estriado (62 DAE).

#### Fosfatase alcalina

Para medir a atividade da enzima intestinal fosfatase alcalina (E.C.3.1.3.1), usou-se o substrato p-Nitrophenylphosphate (pNPP) MgCl<sub>2</sub> (Bessey et al, 1946). Colocou-se em microplaca 10 µl de amostra e 250 µl de substrato e leu-se a 407 nm em intervalos de 1 minuto a 37°C, durante 15 minutos. Esta análise enzimática realizou-se quer para os homogenados de 30 e 62 DAE quer para análise da atividade do prato estriado (62 DAE).

#### Fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida (E.C.3.1.3.2), enzima encontrada no intestino, mediu-se usando como substrato p-nitrofenilfosfato (PNPP) em tampão Tris citrato de sódio (1M) segundo Terra et al. (1979). Colocou-se em microplaca 250 µl de substrato e 10 µl de amostra e leu-se a 407 nm em intervalos de 1 minuto a 37°C, durante 15 minutos.

#### 2.6.4. Expressão enzimática

A proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford et al. (1976). Preparou-se o reagente de Bradford usando 50 mg de *Coumassie Blue*, 25 ml de etanol 95%, 50 ml de ácido ortofosfórico 85% e 500 ml de H<sub>2</sub>O. A curva padrão da proteína foi feita utilizando albumina de origem bovina (1 mg/ ml) a diferentes concentrações. Na microplaca colocou-se 10 µl de amostra e 200 µl de reagente de Bradford, deixou-se repousar por 5 minutos e leu-se a 595 nm.

As atividades enzimáticas foram expressas por a atividade específica (U/mg de proteína) e a atividade total (U/ intestino).

## 2.7. Tratamento de resultados

A comparação estatística das medidas do comprimento e peso totais foi feita usando ANOVA de fator único, comparando valores entre tratamentos, através do pacote disponível no Excel 2007 Microsoft Office. Verificou-se homogeneidade de variâncias dos dados, tendo sido normalizados através de logaritmo neperiano, quando necessário e comparados usando análise de variância (ANOVA), com um nível de significância de  $P < 0,05$ .

Relativamente à análise estatística da incidência de malformações esqueléticas foi usado o teste estatístico qui-quadrado com um grau de liberdade.

A análise dos resultados relativos à atividade enzimática cumpriram os pressupostos de normalidade na distribuição dos dados, homogeneidade das variâncias e foram analisados em SPSS através de ANOVA de um fator. Os dados foram analisados separadamente 30 e 62 DAE uma vez que nas análises foram usados *pool* de 5 indivíduos para os 30 dias e apenas as cavidades abdominais individualmente para os 62 dias.



### **3. Resultados**

#### 3.1. Desempenho larvar

##### 3.1.1. Desenvolvimento

Na Tabela IV apresenta-se o comprimento médio das larvas a diferentes idades, as percentagens e comprimento médio dos diferentes estádios larvares (pré-flexão, flexão, pós-flexão e metamorfose) aos respetivos DAE e na Tabela V ilustram-se os estádios de desenvolvimento mais frequentes presentes nos diversos sistemas de cultivo nas diferentes amostragens efetuada aos 16, 25 e 30 DAE. O tratamento Semi-Intensivo com Copépodes apresentou durante os primeiros 25 DAE comprimentos médios superiores aos dos outros tratamentos (Tabela IV) sendo significativamente superior aos 11 e 25 DAE. Neste tratamento as larvas apresentaram um desenvolvimento mais rápido encontrando-se 100% das larvas em metamorfose aos 25 DAE. Seguiu-se-lhe o sistema Intensivo que apresentou 55% das larvas em metamorfose aos 25 DAE enquanto no sistema Semi-Intensivo sem copépodes a maioria das larvas ainda se encontrava em pós-flexão. A metamorfose para a totalidade das larvas só aconteceu aos 30 DAE nestes dois últimos sistemas. A esta idade os tratamentos Semi-Intensivos (com e sem copépodes) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre eles e passaram a apresentar um comprimento total estatisticamente maior que o tratamento Intensivo. Aos 62 DAE existem diferenças significativas no comprimento total relativamente aos diferentes tratamentos sendo que o sistema Semi-Intensivo sem copépodes registou o maior comprimento médio. Embora superior o sistema Semi-Intensivo com Copépodes não apresentou um comprimento médio significativamente diferente ao sistema Intensivo.








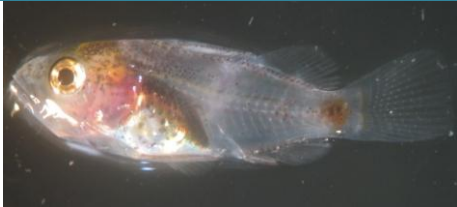
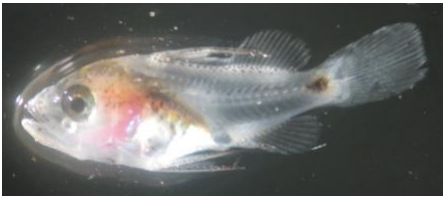
Observou-se até aos 30 DAE um ligeiro atraso de desenvolvimento das larvas do tratamento Semi-Intensivo sem copépodes pois levaram mais dias para atingir os estágios de pós-flexão e metamorfose que os restantes tratamentos.

Tabela IV – Comprimento total médio das larvas e frequência de estágios de desenvolvimento nos diversos sistemas de cultivo e dias de amostragem. (PrFx - Pré-flexão; Fx - Flexão; PoFx - Pós-Flexão; M - Metamorfose; % - frequência em percentagem; (n) – número de indivíduos; m±d.p - média e desvio padrão).

	DAE	Intensivo				Semi-intensivo				Semi-intensivo com cop					
		CT		Estágio		CT		Estágio		CT		Estágio			
		PrFx	Fx	PoFx	M	PrFx	Fx	PoFx	M	PrFx	Fx	PoFx	M		
(n) m±d.p	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.	(n) m±d.p	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.	(n) m±d.p	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.	% (n) m±d.p.		
11	(12) 3.9±0.8 <sup>b</sup>	100 (10) 3.9±0.8	-	-	-	(10) 3.9±0.6 <sup>b</sup>	100 (10) 3.9±0.6	-	-	-	(10) 5.7±0.5 <sup>a</sup>	100 (10) 5.7±0.5	-	-	
16	(10) 6.5±0.6 <sup>b</sup>	100 (10) 6.5±0.6	-	-	-	(10) 5.4±0.6 <sup>a</sup>	100 (10) 5.4±0.6	-	-	-	(10) 6.9±0.7 <sup>b</sup>	60 (3) 7.0±0.7	40 (2) 7.0±0.6	-	
20	(9) 7.2±0.9 <sup>b</sup>	-	14 (1) 5,4	86 (6) 7.9±1.2	-	(9) 6.1±0.7 <sup>a</sup>	17 (2) 5,4±0,9	83 (10) 5,9±0,7	-	-	(9) 7.8±0.8 <sup>b</sup>	-	-	100 (10) 9.8±0.8	
25	(10) 11.2±3.1 <sup>b</sup>	-	35 (7) 6.5±1.1	10 (2) 8.0±0.3	55 (11) 12.2±1,4	(10) 8.7±2.5 <sup>b</sup>	-	36 (4) 6.0±0.4	64 (7) 9.8±1.8	-	(10) 13.5±1.6 <sup>a</sup>	-	-	-	100 (11) 13.5±1.0
30	(25) 14.5±1.7 <sup>a</sup>	-	-	-	100 (5) 13.5±0.8	(25) 16.8±3.5 <sup>b</sup>	-	-	-	-	100 (5) 16.5±1.8	(24) 16.8±2.3 <sup>b</sup>	-	-	100 (6) 12.7±1.0
62	(60) 42.2±5.5 <sup>b</sup>	-	-	-	-	(56) 50.4±5.8 <sup>a</sup>	-	-	-	-	(59) 46.1±7.9 <sup>b</sup>	-	-	-	-

Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas para P<0,05.

Tabela V- Documentação fotográfica dos estágios de desenvolvimento das larvas de mero mais frequentes nos diversos tratamentos aos 20, 25 e 30 DAE. (Flexão – Fx, Pós-flexão – PoFx e Metamorfose – M).

DAE	Intensivo	Semi-Intensivo sem copépodes	Semi-Intensivo com Copépodes
20	 <div data-bbox="801 502 907 558" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">PoFx</div>	 <div data-bbox="1451 502 1529 558" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">Fx</div>	 <div data-bbox="2024 502 2128 558" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">PoFx</div>
25	 <div data-bbox="840 821 907 877" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">M</div>	 <div data-bbox="1429 821 1529 877" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">PoFx</div>	 <div data-bbox="2063 821 2128 877" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">M</div>
30	 <div data-bbox="840 1098 907 1153" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">M</div>	 <div data-bbox="1467 1098 1529 1153" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">M</div>	 <div data-bbox="2063 1098 2128 1153" style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">M</div>

### 3.1.2. Crescimento

As curvas de crescimento dos 2 aos 62 dias após a eclosão (DAE) das larvas de mero nos três tratamentos, avaliado através do comprimento total, estão representados na Figura 3.1. e os parâmetros das diferentes equações são representadas na Tabela VI. As curvas que melhor se adaptaram ao crescimento foram do tipo exponencial tendo-se observado duas fases com taxas de crescimento diferente. O limite temporal acontece aos 25 DAE no caso dos sistemas Intensivo (1) e Semi-Intensivo com copépodes (2), aos 30 DAE para o sistema Semi-Intensivo sem copépodes (2) da figura 3.1. De acordo com a frequência dos estádios de desenvolvimento presentes nas diversas idades amostradas (Tabela IV) a primeira fase de crescimento (**am** na Fig. 3.1) correspondeu ao período de pré- metamorfose sendo a segunda fase do crescimento a de pós-metamorfose (**pm**).

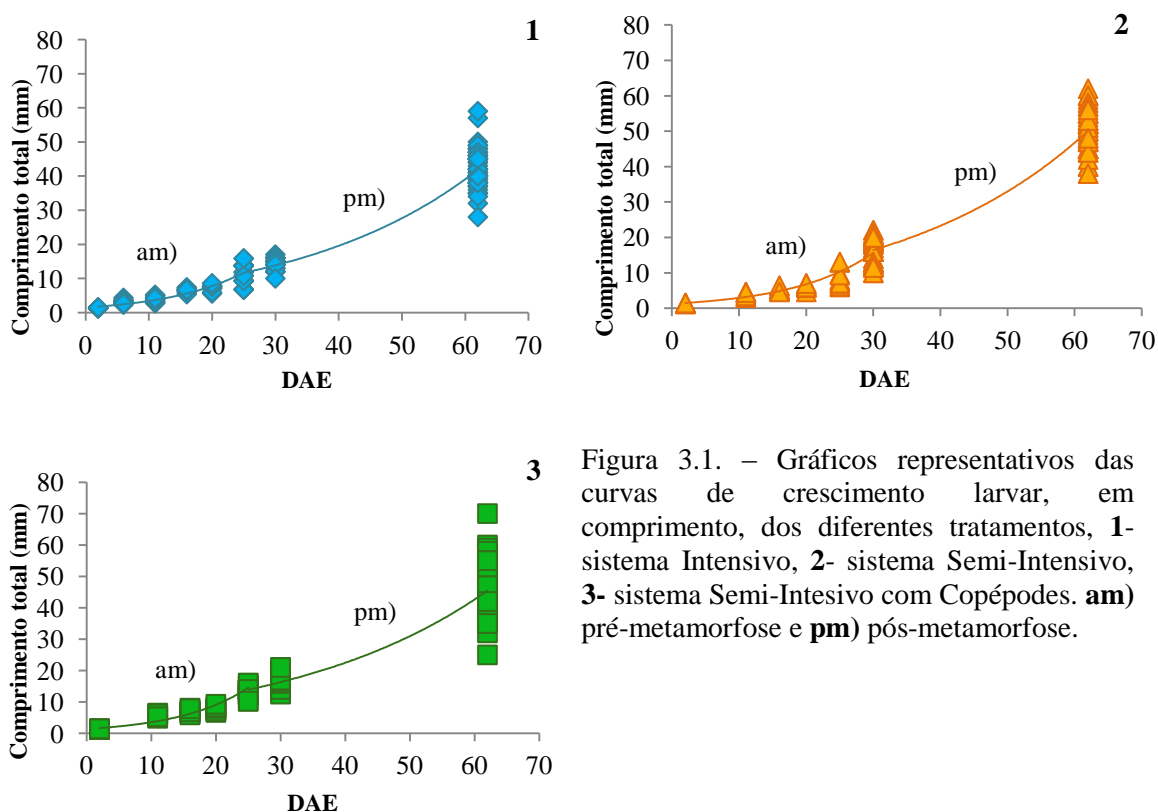


Figura 3.1. – Gráficos representativos das curvas de crescimento larvar, em comprimento, dos diferentes tratamentos, **1**- sistema Intensivo, **2**- sistema Semi-Intensivo, **3**- sistema Semi-Intensivo com Copépodes. **am**) pré-metamorfose e **pm**) pós-metamorfose.

As equações das curvas de crescimento (Tabela VI) dão informação sobre o crescimento nos tratamentos aplicados. Pode observar-se que, durante a pré-metamorfose as larvas dos tratamentos Intensivo e Semi-Intensivo sem copépodes apresentaram uma taxa de crescimento diária inferior aos do tratamento Semi-Intensivo com Copépodes. Após a metamorfose os juvenis do tratamento Semi-Intensivo com

Copépodes partem de um comprimento total maior que os restantes tratamentos. A taxa de crescimento diária mostrou-se similar entre tratamentos.

Tabela VI. – Parâmetros das equações de crescimento larvar de *E. marginatus* nos respetivos tratamentos. (**a** – inserção; **b** - taxa de crescimento diária;  $R^2$  - coeficiente de determinação).

Tratamento	Pré-metamorfose				Pós-metamorfose			
	n	$R^2$	a	b	n	$R^2$	a	b
Intensivo	61	0,877	1,49	0,083	95	0,928	4,91	0,035
Semi-Int - Cop	64	0,932	1,28	0,084	81	0,916	5,78	0,035
Semi-Int + Cop	64	0,911	1,40	0,094	93	0,912	6,25	0,032

As relações entre as diversas dimensões corporais dos peixes podem dar informação sobre o tipo de crescimento de um determinado conjunto de indivíduos. Na figura 3.2. pode observar-se que em termos de peso as larvas dos diferentes tratamentos apresentam uma relação com o comprimento semelhante e que foi melhor descrita por uma equação potencial do tipo  $y = kx^a$  onde  $a$  é o expoente de escala. Quando, em relações peso/comprimento, este expoente é igual a 3 o crescimento é isométrico. Sendo menor diz-se alométrico negativo e sendo maior é alométrico positivo.

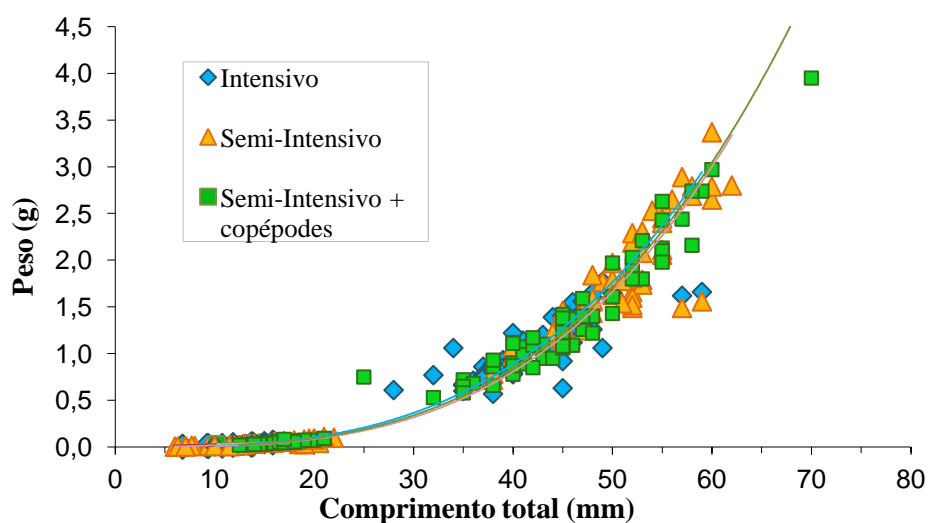


Figura 3.2. – Relação peso/comprimento total em *E. marginatus*, para os diferentes tratamentos entre os 25 e 62 DAE.

Na tabela VII apresentam-se os parâmetros das equações da relação peso comprimento. Dado só existir informação sobre o peso e comprimento após os 25 DAE as equações foram calculadas após esta idade. No caso dos tratamentos dos sistemas Intensivo e Semi-Intensivo sem copépodes as larvas só atingiram a metamorfose após os 30 DAE pelo que a informação aos 25 DAE foi calculada separadamente. Não se determinou este coeficiente aos 25 DAE para o tratamento Semi-Intensivo com Copépodes uma vez que nesta idade as larvas já tinham realizado a metamorfose. A relação ente peso e comprimento total no decorrer dos tratamentos apresentou um coeficiente alométrico negativo antes da metamorfose (25 DAE) e alométrico positivo depois da metamorfose.

Tabela VII – Tipo de relação entre o peso e o comprimento total apresentado por *E. marginatus* antes e depois da metamorfose das larvas. ( $R^2$  - coeficiente de determinação; s.i. – sem informação).

Tratamento	Pré-metamorfose				Pós-metamorfose			
	n	$R^2$	Coefficiente de Regressão	Relação	n	$R^2$	Coefficiente de Regressão	Relação
Intensivo	10	0,978	2,83	Alométrico negativo	85	0,980	3,09	Alométrico positivo
Semi-Int - Cop	10	0,942	2,39	Alométrico negativo	81	0,983	3,24	Alométrico positivo
Semi-Int + Cop	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	83	0,981	3,07	Alométrico positivo

#### 3.1.4. Sobrevivência

A sobrevivência foi calculada para os diferentes tratamentos assumindo que a taxa de eclosão dos ovos foi de 5%. O tratamento que apresentou uma maior sobrevivência foi o Semi-Intensivo com Copépodes sendo esta de 10% seguido do tratamento Semi-Intensivo sem copépodes 5 % e o tratamento Intensivo com uma sobrevivência de 4% no final da experiência (62 DAE).

Tabela VIII – Sobrevivência nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Ovos (n)	Larvas eclodidas (n)	Juvenis aos 62 DAE	Sobrevivência (%)
Intensivo	86520	4326	175	4
Semi-Int - cop	64890	3245	170	5
Semi-Int + Cop	64890	3245	310	10

### 3.2. Malformações esqueléticas

#### 3.2.1 Radiografia

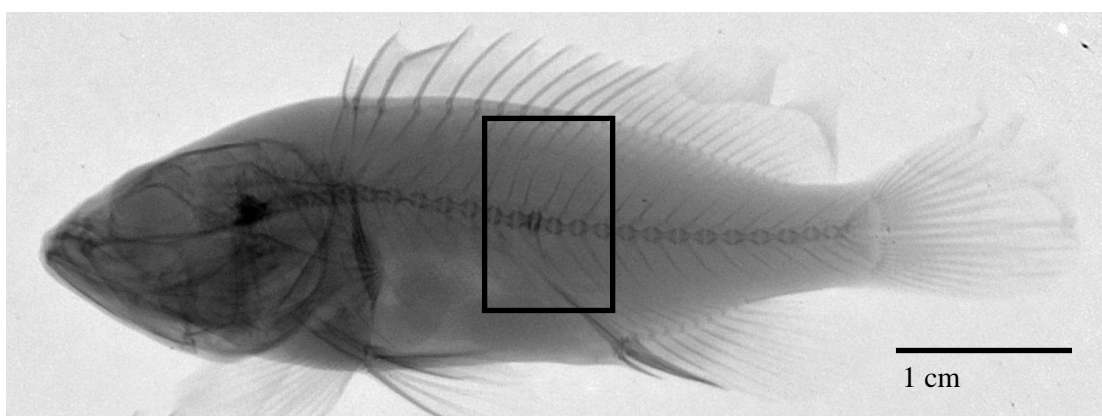


Figura 3.3. – Hipercalcificação das vertebrae hemais (na área do retângulo) de um Mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Semi-Intensivo.

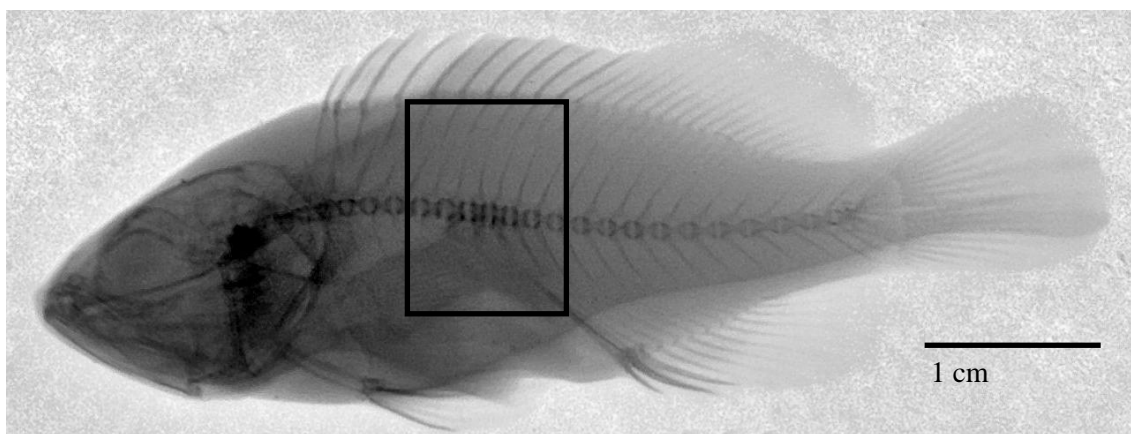


Figura 3.4. – Hipercalcificação das vertebrae hemais (na área do retângulo) de um Mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Intensivo.

### 3.2.2. Dupla coloração de osso e cartilagem

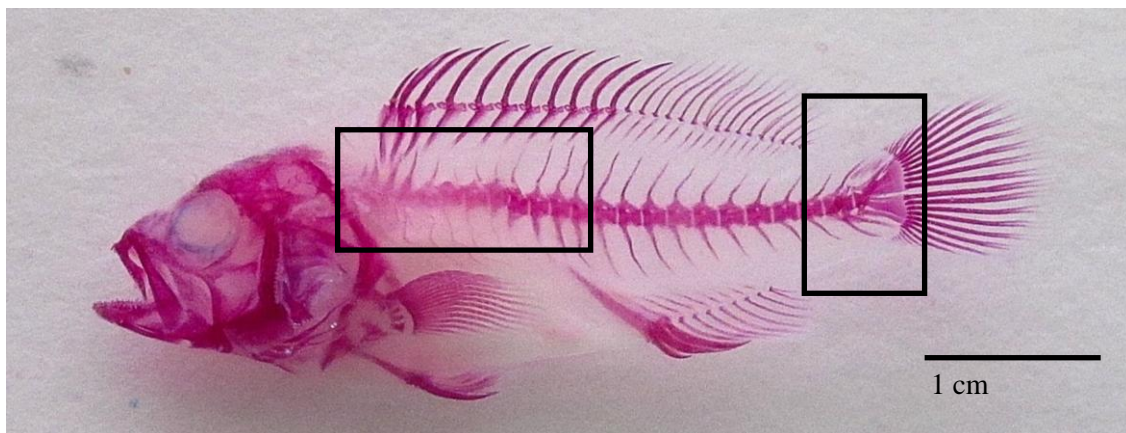


Figura 3.5. – Malformação das vertebrae cefálicas e pré-hemais 1-9; Fusão das vertebrae da barbatana caudal e fusão de hipurais 1-2 de um Mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Intensivo.

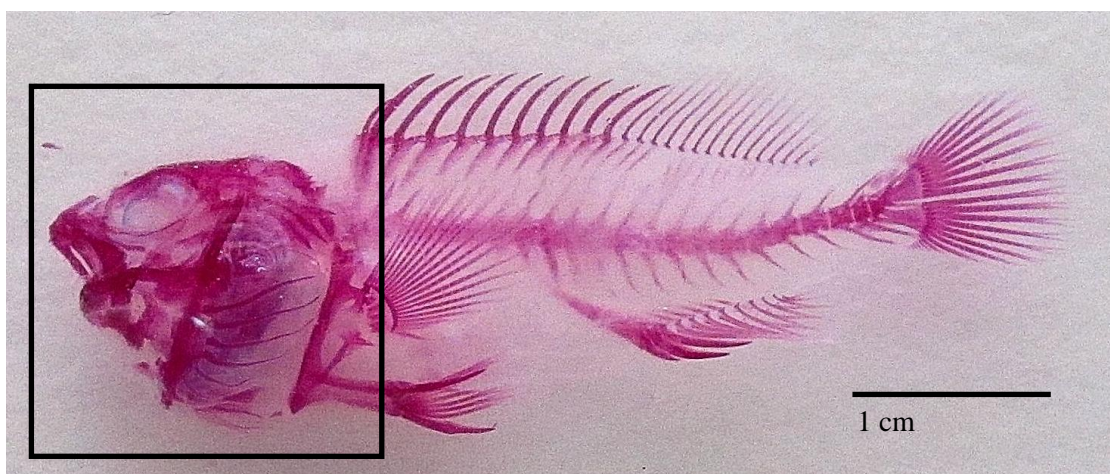


Figura 3.6. – Malformação grave da mandíbula, arcos branquiais e opérculo de um Mero de 62 DAE, correspondente ao tratamento Intensivo.



Figura 3.7. – Mero de 62 DAE sem malformações registadas, correspondente ao tratamento Semi-Intensivo com Copépodes.

A utilização de diferentes métodos de análise de malformações esqueléticas pode dar origem a diferentes resultados uma vez que leva a diferentes perceções dos indivíduos analisados. No entanto alguns métodos podem revelar-se mais eficientes.

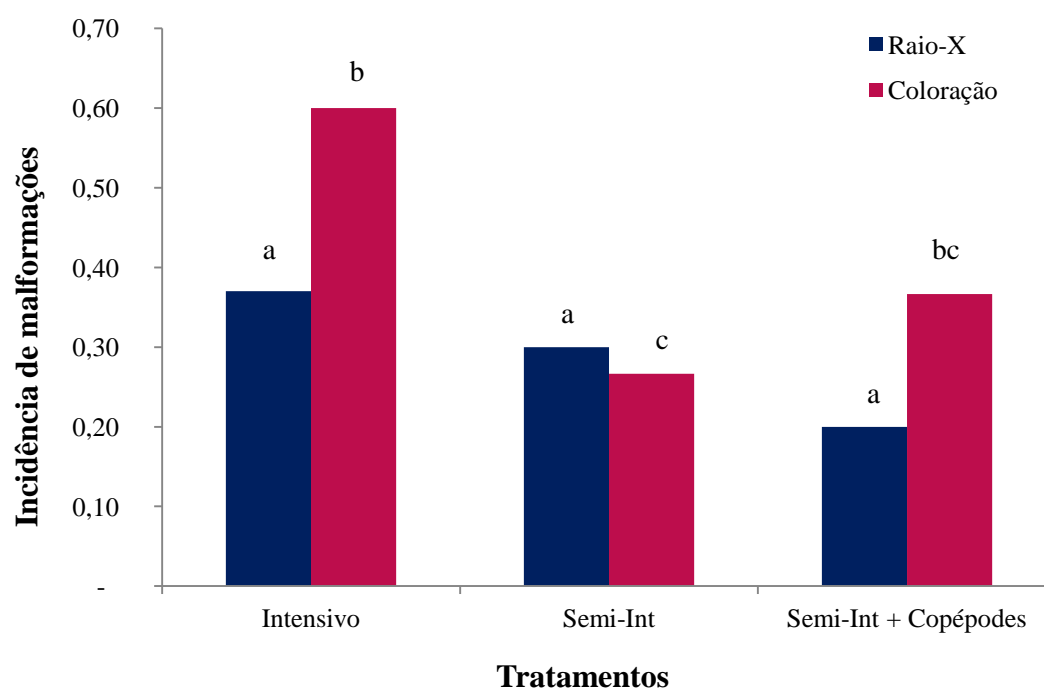


Figura 3.8. – Incidência de malformações analisadas pelos dois métodos utilizados, Raio-x e dupla coloração para os respetivos tratamentos.

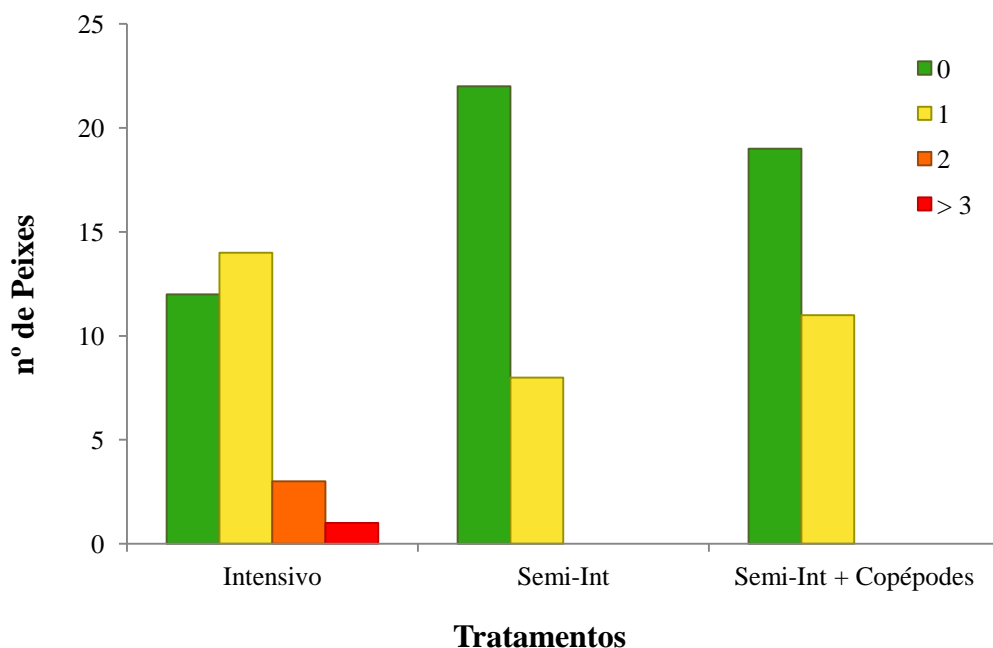


Figura 3.9. – Incidência de malformações no método de dupla coloração para os respectivos tratamentos.

Ao analisar os resultados referentes ao método de dupla coloração pode avaliar-se a incidência de malformações nos respectivos tratamentos. A incidência total refere-se ao número de malformações presentes no respetivo tratamento. Pode também avaliar-se a carga total de malformações (Tabela IX) por tratamento onde se verificou ser mais elevada no tratamento Intensivo. Neste caso pode dizer-se que o tratamento Intensivo apresenta maior probabilidade de existirem peixes com múltiplas malformações, ou seja, para no tratamento Intensivo cada peixe apresenta em média 1,28 malformações por indivíduo malformado.

Tabela IX - Carga de malformações para os respetivos tratamentos.

Tratamentos	Carga de malformações
<b>Intensivo</b>	1,28
<b>Semi-Int - Cop</b>	0,88
<b>Semi-Int + Cop</b>	1,00

A figura 3.11. representa a incidência de malformações nas zonas corporais dos peixes afetados. Pode dizer-se que o tratamento Intensivo é o que apresenta maior incidência de malformações, principalmente na zona caudal e barbatana dorsal.

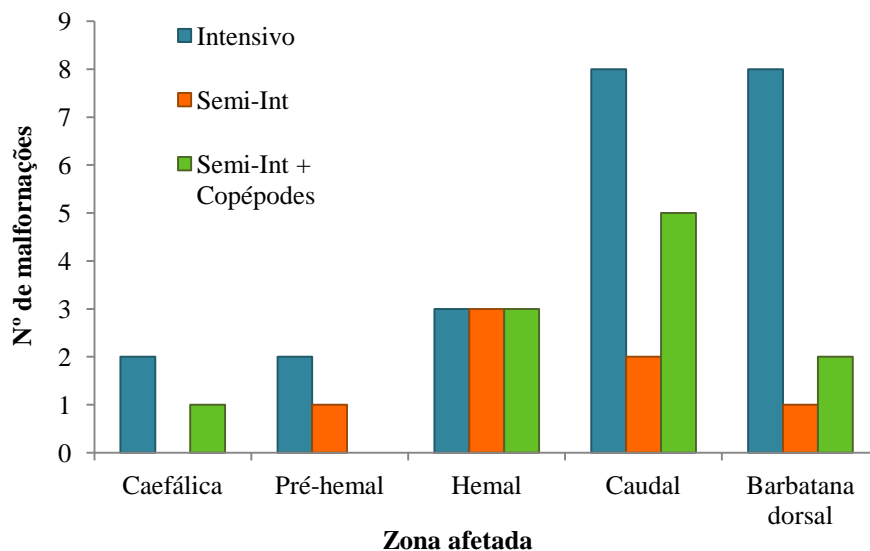


Figura 3.10. – Incidência de malformações no método de coloração para os respetivos tratamentos.

### 3.3. Enzimas digestivas

#### 3.3.1. Enzimas digestivas

Devido ao reduzido tamanho das larvas do sistema Intensivo aos 30 DAE, o volume de amostra não foi suficiente para analisar a atividade do amilase neste tratamento, motivo pelo qual não apresenta valores de atividade enzimática.

A atividade específica da amilase não apresentou diferenças estatisticamente significativas aos 30 e aos 62 DAE, quando comparados os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Observando a figura 3.12 e comparando quer tratamentos quer idade (30 e 62 DAE), a atividade específica do amilase não sofreu grandes alterações mantendo-se relativamente constante em cerca de 1,5 U/mg de proteína.

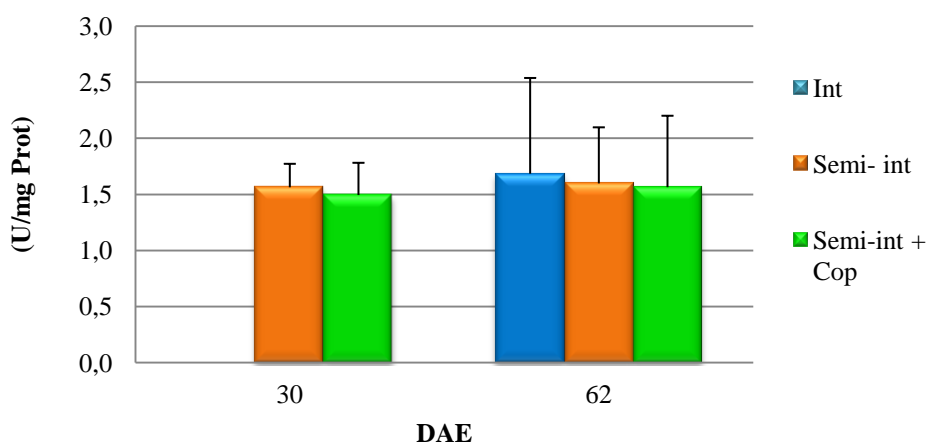


Figura 3.11. – Atividade específica da enzima amilase aos 30 e 62 DAE.

Relativamente a atividade total da amilase (apesar de não existirem valores referentes ao sistema Intensivo, aos 30 DAE), não existem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos ( $P > 0,05$ ), aos 30 e 62 DAE. No entanto, no gráfico da figura - 3.12 é de notar o aumento de atividade total dos 30 para os 62 DAE com o desenvolvimento das larvas, como esperado.

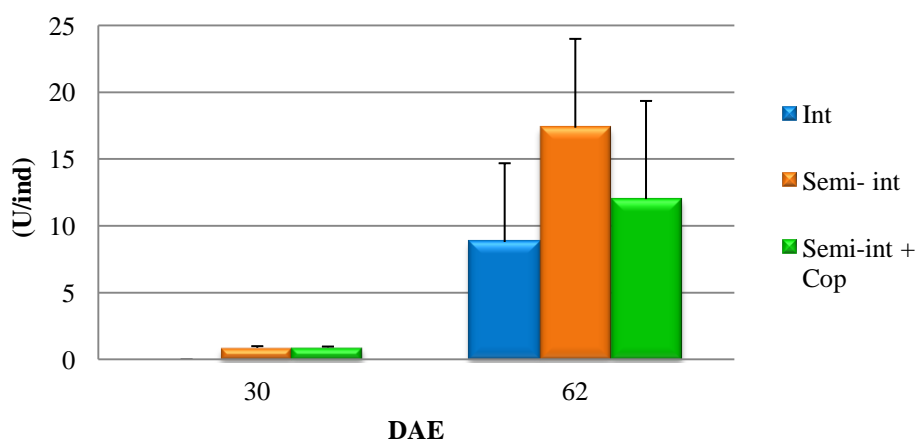


Figura 3.12. – Atividade total da enzima amilase aos 30 e 62 DAE.

A atividade específica da tripsina (Figura – 3.13.), aos 30 dias, apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre o tratamento Semi-Intensivo (2,35 mU/mg Proteína) e os tratamentos Intensivo (0,09 mU/mg Proteína) e Semi-Intensivo com Copépodes (0,67 mU/mg Proteína). Aos 62 DAE não se registam diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. No entanto

quando comparadas as idades (estados de desenvolvimento) é de notar o decréscimo de atividade específica aos 62 DAE principalmente no tratamento Semi-Intensivo (0,09 mU/ mg Proteína), o mesmo não acontece com o tratamento Intensivo.

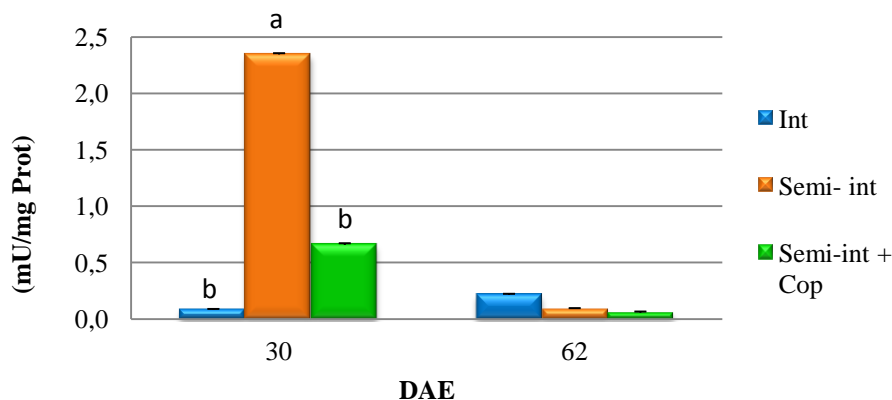


Figura 3.13. – Atividade específica da enzima tripsina aos 30 e 62 DAE.

Existem diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente à atividade total da tripsina (Figura – 3.14.), entre o tratamento Semi-Intensivo (1,24 mU/ indivíduo) e os tratamentos Intensivo e Semi-Intensivo com copépodos (0,04 e 0,39 mU/ indivíduo, respetivamente), aos 30 DAE. Aos 62 DAE não existem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Comparando o desenvolvimento das larvas, dos 30 para os 62 DAE, o tratamento Intensivo é o que se destaca mais, mostrando um grande aumento sendo que passa a ter um valor de atividade total de 1,18 mU/ indivíduo. Os restantes tratamentos, pelo contrário, apresentam um ligeiro decréscimo de atividade.

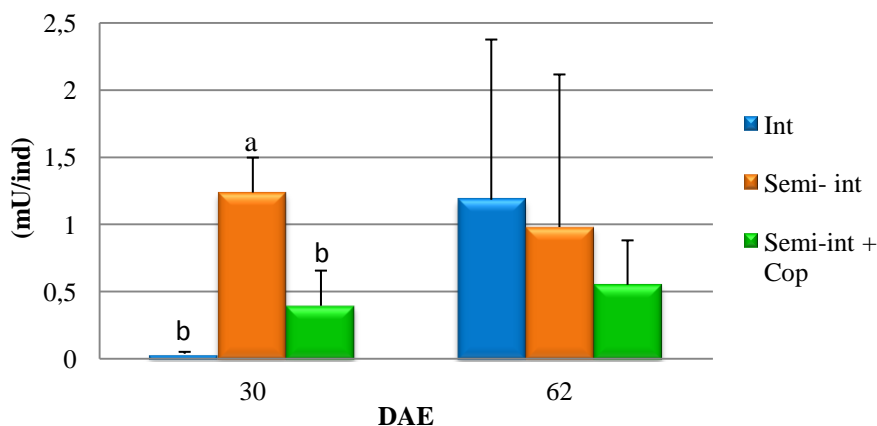


Figura 3.14. – Atividade total da enzima tripsina aos 30 e 62 DAE.

Apesar do tratamento Semi-Intensivo apresentar menores valores de atividade da enzima (Figura 3.15.), não existem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) para ambas as idades 30 e 62 DAE, relativamente à atividade específica da pepsina. No entanto é de notar que existe um aumento da atividade específica dos 30 ( $<0,3$  mU/mg Proteína) para os 62 DAE ( $>1,2$  mU/mg Proteína).

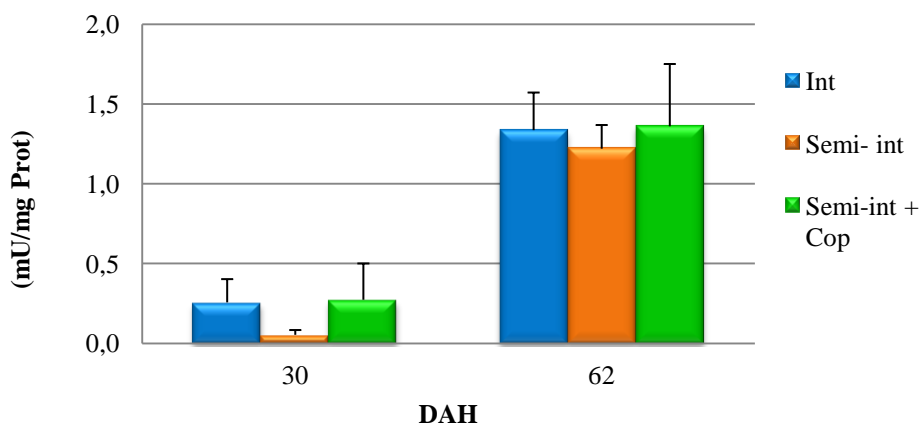


Figura 3.15. – Atividade específica da enzima Pepsina aos 30 e 62 DAE.

Relativamente à atividade total da pepsina, não existem diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para ambas as idades, 30 e 65 dias após eclosão. No entanto, observando a figura 3.16 é de notar o aumento de atividade total dos 30 ( $<0,2$  mU/ individuo) para os 62 DAE ( $>6,9$  mU/ individuo) com o desenvolvimento larvar.

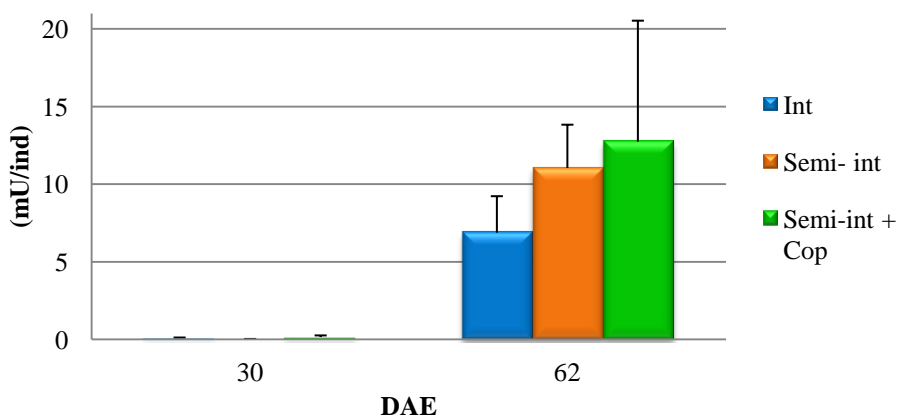


Figura 3.16. – Atividade total da enzima pepsina aos 30 e 62 DAE.

Aos 30 DAE existem diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre a atividade específica da enzima aminopeptidase dos tratamentos Semi-Intensivo (0,042 U/mg Proteína) e Intensivo (0,014 U/mg Proteína) no entanto, o mesmo não acontece entre o tratamento Semi-Intensivo com copépodes (0,029 U/mg Proteína) e os restantes tratamentos (Figura 3.17). Relativamente aos 62 DAE não se registam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) para a atividade específica do aminopeptidase. Quando comparados os valores de 30 e 62 DAE não se revelam grandes discrepâncias entre os valores mostrando um aumento de atividade proporcional ao desenvolvimento das larvas.

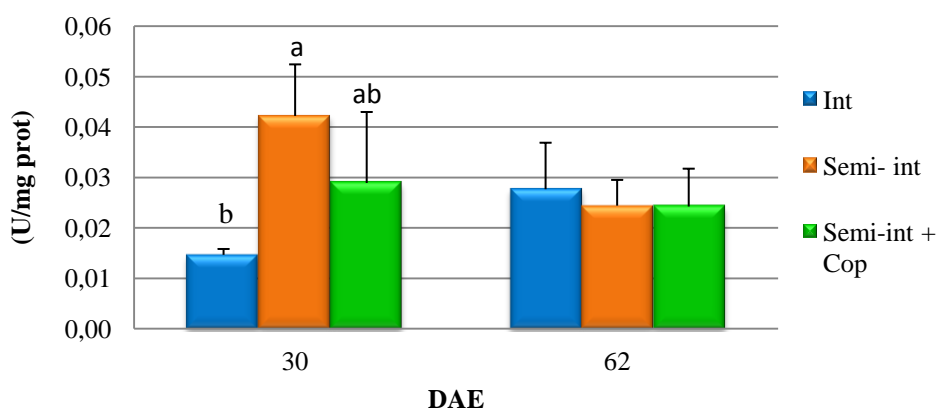


Figura 3.17. – Atividade específica da enzima aminopeptidase aos 30 e 62 DAE.

Aos 30 DAE, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) e os valores de atividade total da enzima aminopeptidase são relativamente baixos ( $< 0,02$  U/ indivíduo) quando comparados com os valores de larvas mais desenvolvidas (62 DAE) sendo que os valores apresentados são superiores a 0,14 U/ indivíduo (Figura 3.18). No entanto aos 62 DAE existem diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre o tratamento Intensivo e Semi-Intensivo, o mesmo não acontece entre o tratamento Semi-Intensivo com copépodes e os restantes tratamentos no que diz respeito à atividade total do enzima aminopeptidase.

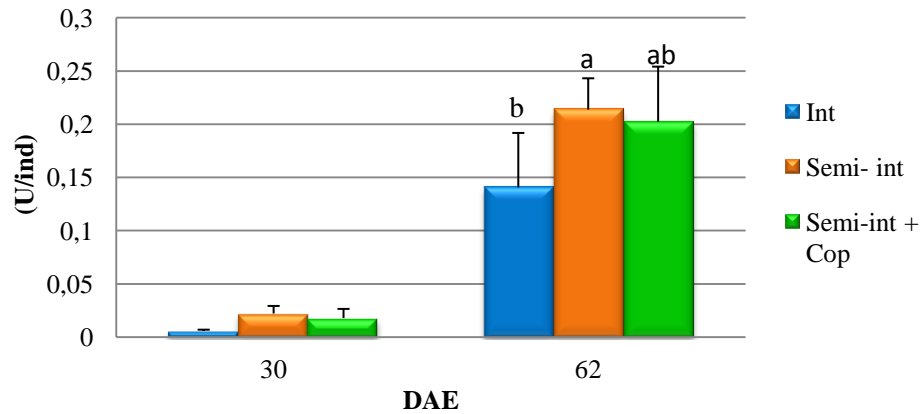


Figura 3.18. – Atividade total da enzima aminopeptidase aos 30 e 62 DAE.

No que diz respeito à atividade específica do fosfatase alcalina (Figura 3.19), existem diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos Semi-Intensivos com e sem copéodes (0,125 e 0,104 U/mg Proteína, respetivamente) e o tratamento Intensivo (0,045 U/mg Proteína), aos 30 DAE. Aos 62 DAE não existem diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Comparando a atividade específica desta enzima entre idades (30 e 62 DAE) é de notar um ligeiro aumento.

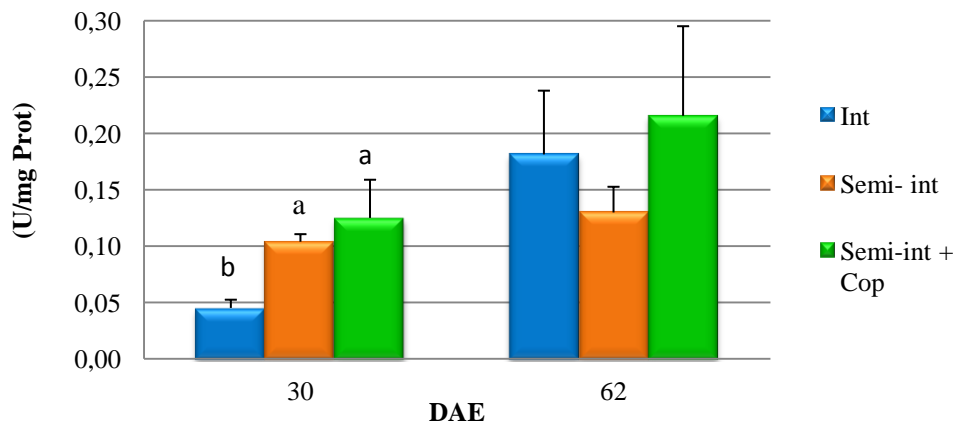


Figura 3.19. – Atividade específica da enzima fosfatase alcalina aos 30 e 62 DAE.

Aos 30 DAE existem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) Semi-Intensivos com e sem copéodes (0,08 e 0,05 U/indivíduo, respetivamente) e Intensivo (0,02 U/indivíduo), no que diz respeito à atividade total da enzima fosfatase alcalina (Figura 3.20). Relativamente às larvas de 62 DAE não se registam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Comparando as atividade totais, observa-se um aumento proporcional ao desenvolvimento das larvas, dos 30 para 62 DAE.

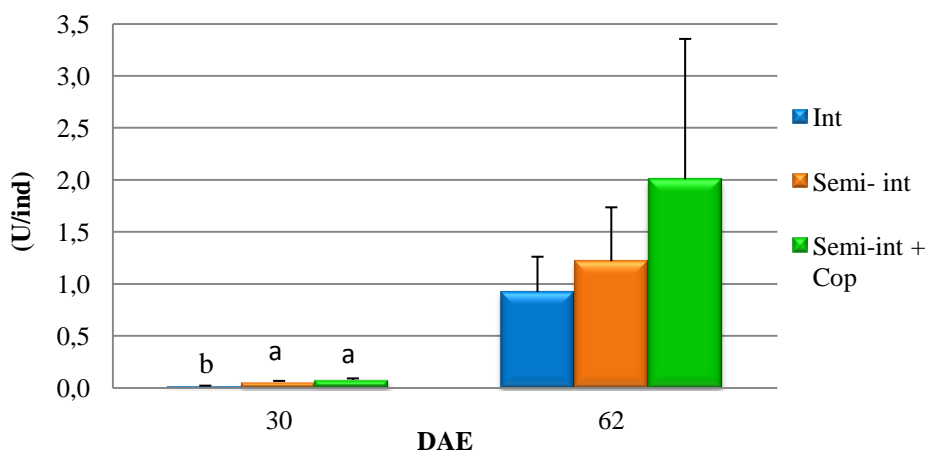


Figura 3.20. – Atividade total da enzima fosfatase alcalina aos 30 e 62 DAE.

Relativamente à atividade específica da fosfatase ácida (Figura 3.21), não se registam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos, aos 30 ou 62 DAE. Tendo em conta o desenvolvimento das larvas (30 e 62 DAE) é de notar um ligeiro aumento de atividade específica nos tratamentos com exceção do tratamento Intensivo que apresenta um ligeiro decréscimo (de 1,40 para 1,01 mU/mg Proteína).

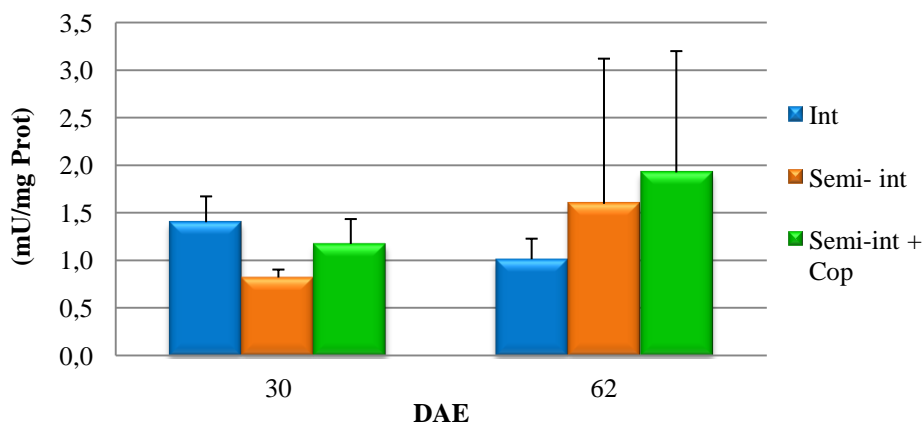


Figura 3.21. – Atividade específica da enzima fosfatase ácida aos 30 e 62 DAE.

Não existem diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos, aos 30 e 62 DAE, relativamente à atividade total da fosfatase ácida (Figura 3.22.). Dos 30 para os 62 DAE há um aumento de atividade total desta enzima com o

desenvolvimento larvar, como era esperado, principalmente no tratamento Semi-Intensivo com copépodes (de 0,75 para 19,33 mU/ indivíduo).

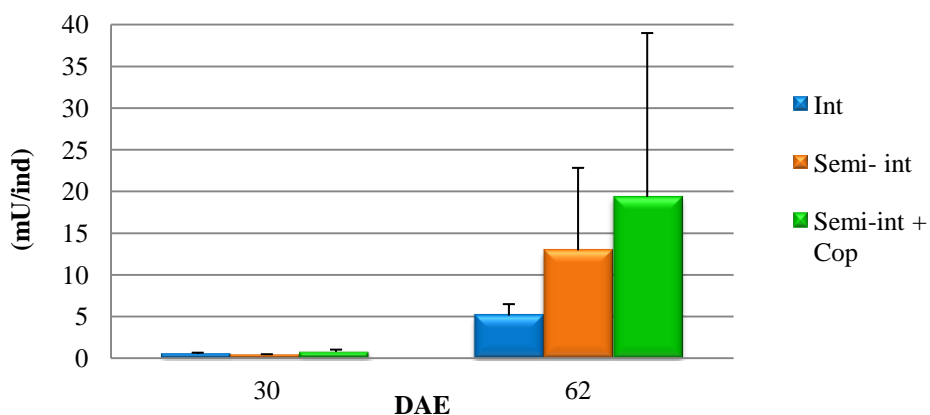


Figura 3.22. – Atividade total da enzima fosfatase ácida aos 30 e 62 DAE.

### 3.3.2. Prato estiado

Para análise de prato estiado só se avaliou a atividade enzimática das larvas de 62 DAE. Relativamente à atividade específica e total, estes apresentam homogeneidade das variâncias.

Relativamente á atividade enzimática específica do aminopeptidase no prato estiado (Figura 3.23.) não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), aos 62 DAE.

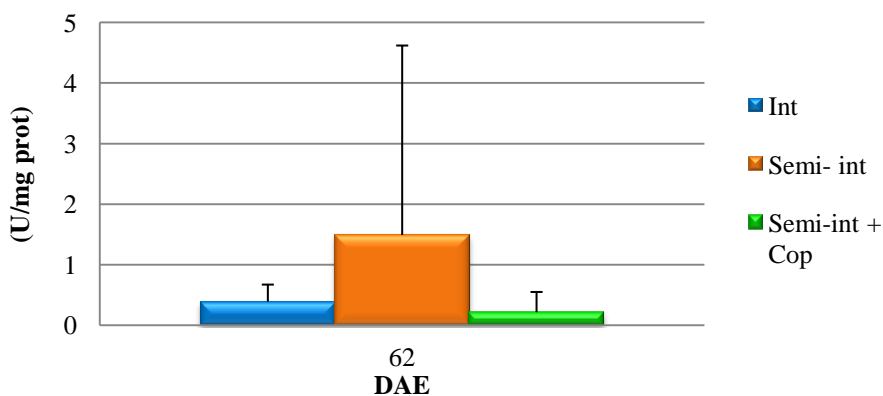


Figura 3.23. – Atividade específica da enzima aminopeptidase no prato estiado, aos 62 DAE.

Aos 62 DAE existem diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos Intensivo (0,03 U/ Indivíduo) e Semi-Intensivo (0,05 U/ Indivíduo) para a atividade total da aminopeptidase no prato estriado (Figura 3.24).

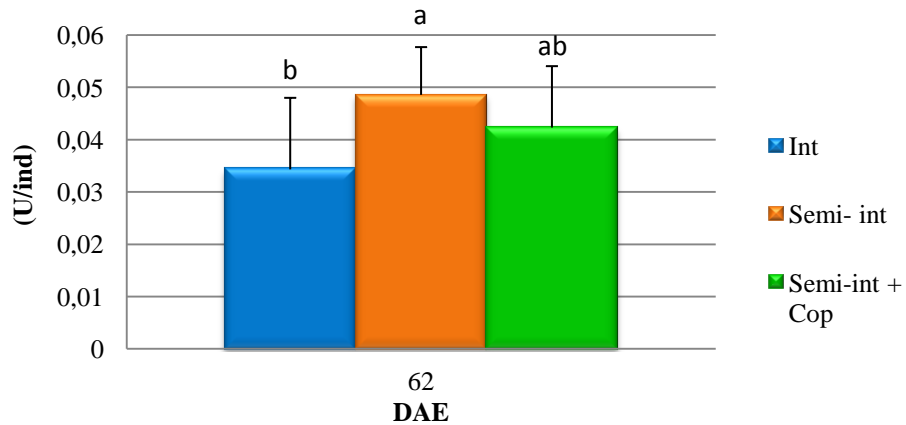


Figura 3.24. – Atividade total da enzima aminopeptidase no prato estriado, aos 62 DAE.

A atividade específica da fosfatase alcalina no prato estriado (Figura 3.25) não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), aos 62 DAE.

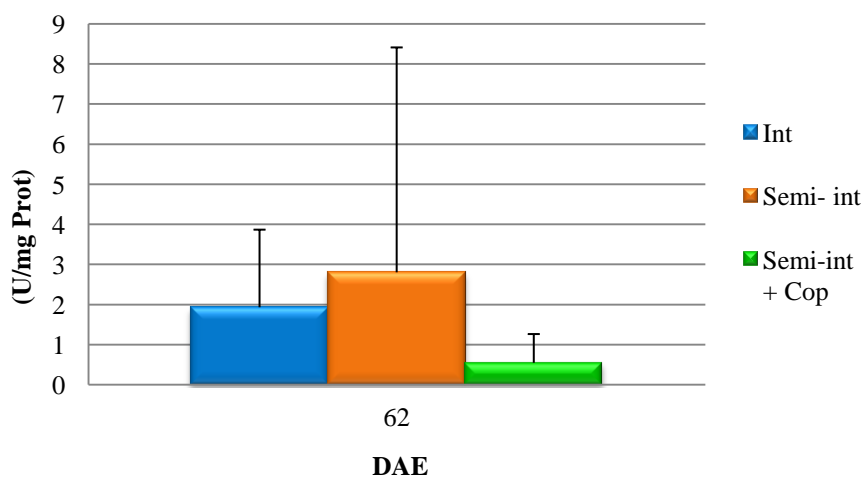


Figura 3.25. – Atividade específica da enzima Fosfatase alcalina no prato estriado, aos 62 DAE.

Não se registam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ), aos 62 DAE, no que diz respeito à atividade total da fosfatase alcalina no prato estriado (Figura 3.26).

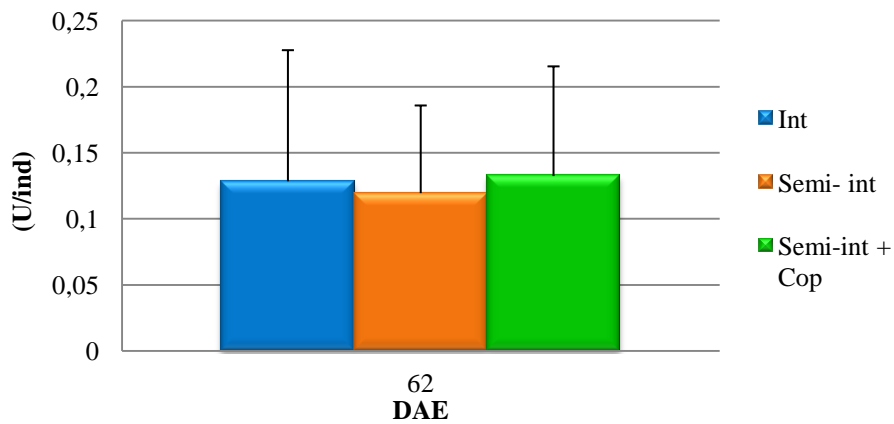


Figura 3.26. – Atividade total da enzima Fosfatase alcalina no prato estriado, aos 62 DAE.

## 4. Discussão

### 4.1. Desempenho larvar

No trabalho realizado do ponto de vista de sistemas de cultivo, o Semi-Intensivo, com e sem copépodes apresentaram uma maior sobrevivência que o sistema Intensivo no final do experimento (62DAE). Estes resultados eram de se esperar uma vez que as espécies se adaptam melhor em ambientes o mais semelhante possível ao seu habitat natural. Os sistemas semi-intensivos apresentaram também vantagens em termos de malformações esqueléticas uma vez que apresentaram uma ocorrência de malformações menor que o tratamento Intensivo. Estes resultados estão de acordo com Duray *et al*, 1997, onde afirmam que a sobrevivência das larvas de mero aumenta usando grandes tanques de cultivo, de um modo geral com uma aproximação Semi-Intensiva.

Para além do tipo de cultivo avaliou-se também a alimentação atribuída sendo o elemento chave os copépodes (*Acartia grani*) que apenas se administraram a um dos sistemas Semi-Intensivos. Aos 20 DAE todas as larvas do tratamento Semi-Intensivo com Copépodes já estavam no estágio de pós-flexão enquanto no tratamento Semi-intensivo sem copépodes este estágio é atingido aos 25 DAE apenas por 64% das larvas. Para o estágio de metamorfose registou-se o mesmo padrão de desenvolvimento sendo que este estágio é atingido pela totalidade das larvas do Semi-Intensivo com Copépodes aos 25 DAE sendo atingido pelas larvas do Semi-intensivo sem copépodes apenas aos 30 DAE. Este resultado mostra que numa fase inicial os copépodes têm um papel bastante importante, não só pelas suas adequadas dimensões para as larvas de mero numa primeira alimentação mas também em termos nutritivos levando as larvas que os consomem a apresentarem um maior desenvolvimento como sugerido por outros autores. Stottruo & Norsker, 1997 e Evjemo *et al*, 2003, observaram em larvas que a primeira alimentação pode ser estabelecida unicamente por náuplios de copépodes. Estes podem aumentar as taxas de alimentação resultando em maiores taxas de crescimento e sobrevivência quando usados numa dieta com mistura de rotíferos e copépodes, comparando com dietas que misturam rotíferos e artémia ou apenas copépodes. Como descrito por van der Meeren e Mæss (1993) as larvas de peixe necessitam de náuplios de copépodes para o início do seu crescimento. Uma vez que os

copépodes apresentam um elevado valor nutricional, em particular n-3 HUFA, aminoácidos e vitaminas indispensáveis para o crescimento e sobrevivência de larvas de peixes marinhos.

Apesar do tratamento Semi-intensivo com Copépodes apresentar um maior desenvolvimento larvar e maior taxa de sobrevivência, aos 62 DAE os meros deste tratamento foram significativamente menores que os meros do tratamento Semi-Intensivo onde os copépodes não foram adicionados ( $P < 0,05$ ). Neste tratamento apresentaram comprimentos totais até aos 30 DAE sempre inferiores aos restantes tratamentos, passando este comprimento a ser superior apenas na amostragem seguinte a esta idade (62 DAE). Acredita-se que o maior crescimento nas larvas do sistema Semi-Intensivo sem copépodes se deve à menor densidade larvar deste tanque, uma vez que dos tratamentos Semi-Intensivos foi o que apresentou menor sobrevivência. A redução da densidade criou uma maior disponibilidade de alimento e menor competição por este, o que pode ter levado o tratamento Semi-Intensivo sem copépodes a apresentar um comprimento médio aos 62 DAE maior que os restantes tratamentos. K. M. Liu e W. B. Chan, 1992, consideram a densidade, um dos importantes fatores que afetam o crescimento e desenvolvimento dos peixes, utilização alimentar e rendimento bruto de peixe.

No seu desenvolvimento inicial os peixes tipicamente passam por distintas fases larvares, onde ocorrem mudanças abruptas na sua estrutura ou fisiologia, a fase larvar. A transição para juvenil denomina-se metamorfose. No presente trabalho esta ocorreu aos 25 DAE no tratamento Semi-Intensivo com Copépodes e 30 DAE no tratamento Semi-Intensivo sem copépodes. A diferença temporal na metamorfose entre estes dois sistemas não parece estar ligado a diferentes temperaturas de cultivo uma vez que estes tratamentos estavam expostos às mesmas condições ambientais pelo que esta diferença deverá estar ligada à alimentação inicial que contou com a dição de copépodes.

As curvas de crescimento da fase larvar e juvenil do mero foram bem definidas e apresentaram diferentes taxas de crescimento e relações entre peso e comprimento o que acontece com a maioria dos peixes como descrito por Vanetsov, (1953). A relação entre peso e comprimento total no decorrer dos tratamentos apresentou um coeficiente alométrico negativo antes da metamorfose (25 DAE) e alométrico positivo depois da

metamorfose. A existência de uma alometria negativa na fase larvar, indica um aumento em comprimento dos indivíduos, enquanto que a alometria positiva na fase de juvenil uma aumento em peso.

O cultivo em grandes volumes e a adição de copépodes à dieta durante o início da fase larvar do mero proporcionou um melhor crescimento e desenvolvimento, e uma maior taxa de sobrevivência aos 62 DAE.

#### 4.2. Malformações esqueléticas

Existem várias condicionantes dos tratamentos que podem estar relacionados com o aparecimento de malformações, como as condições normalmente presentes no tipo cultivo intensivo (Boglione et al, 2013b). Neste tipo de cultivo, todos os parâmetros se tornam facilmente limitantes devido às elevadas densidades, estas geram grande competitividade por alimento e espaço, menor qualidade da água ou necessidade de maior renovação desta e grande dependência de operadores humanos ou tecnologia adequada. Quando o fornecimento técnico não corresponde totalmente à demanda biológica, os parâmetros descontrolam-se facilmente levando as larvas a adaptações bruscas ou à morte das mesmas. As larvas, quando pressionadas para se adaptarem às condições ambientais não favoráveis como turbulência na coluna de água, deficiências nutritivas, temperatura, qualidade da água, entre outros, sofrem alterações como malformações esqueléticas, baixas taxas de crescimento, canibalismo e alterações comportamentais. Estes são os problemas mais frequentemente observados no sistema intensivo, principalmente no que diz respeito a espécies onde o seu cultivo não é totalmente dominado (Divanach e Kentouri, 2000).

Neste trabalho foram realizados dois métodos para observação de malformações esqueléticas nos meros de 62 DAE, o raio-X e a dupla coloração. Este último método mostrou-se muito mais eficaz na detecção de malformações em larvas uma vez permite uma observação muito mais pormenorizada. Existem diferentes métodos de diagnóstico de malformações esqueléticas com diferentes níveis de precisão, sendo normalmente aplicados de acordo com o estágio larvar ou desenvolvimento das estruturas esqueléticas (Boglione et al, 3013b). Neste sentido, e apresentando o método de dupla

coloração, diferenças estatisticamente significativas quando avaliado o tipo de cultivo, foi o método escolhido para avaliar o desenvolvimento das estruturas esqueléticas nos tratamentos aplicados.

Através do método de dupla coloração observou-se que o tratamento Intensivo foi o que registou uma maior incidência (60%), carga de malformações (1,28 anomalias/individuo malformado) e foi o único dos três tratamentos aplicados onde se observou indivíduos com malformações graves (13% de incidência). Comparando com estudos anteriores na mesma espécie (Boglione et al, 2009), pode dizer-se que mesmo em sistema de cultivo intensivo, e com maior densidade larvar (40 larvas/l), onde se observaram piores resultados, estes apontam para uma maior qualidade larvar que em Boglione et al, (2009). Uma vez que neste estudo, meros cultivados a elevadas densidades (28 larvas/l) revelaram uma maior frequência de malformações (75,8%), com uma maior carga de malformações (5,5 anomalias/individuo malformado), maior gama de tipologia de malformações (38) e maior incidência de indivíduos com pelo menos uma anomalia grave (30,9%).

As malformações em larvicultura são frequentes e podem ser graves quando afetam a qualidade do peixe, necessitando este ser descartado ou leves, quando não são morfológicamente observadas e não influenciam no normal desenvolvimento do peixe. Estas malformações graves podem diminuir a eficiência das larvas, afetando a sua alimentação, habilidade natatória, crescimento, entre outros, como descrito em Boglione et al, (2001) e pode ser usado como indicador de eficiência da produção. No tratamento Intensivo observou-se uma malformação grave da mandíbula, arcos branquiais e opérculo. Este tipo de malformações além de dificultar a alimentação por deformação da mandíbula deixa os arcos branquiais mais expostos a lesões ou parasitas comprometendo a sobrevivência de indivíduos com este tipo de malformações. Neste sentido e como demonstrado em estudos anteriores o sistema Intensivo mostrou-se o mais propício a deformações graves quando comparado com sistemas Semi-Intensivos (Boglione et al, 2013b).

Estes resultados estão também de acordo com Koumoundouros et al (1997) que indica o mesocosmos como o tipo de cultivo onde existe maiores probabilidades de as larvas apresentarem um desenvolvimento normal uma vez que este tipo de cultivo se assemelha mais ao seu ambiente natural. O mesmo aconteceu nos tratamentos Semi-

Intensivos uma vez que estes adotaram uma filosofia de mesocosmos. A atual solução para malformações esqueléticas passa pela determinação das causas e subsequente aplicação de práticas de cultivo mais apropriadas (Boglione et al, 2013b).

#### 4.3. Enzimas digestivas

O estado de desenvolvimento do sistema digestivo das larvas na primeira alimentação determina a possibilidade das larvas digerirem bem ou não os alimentos ingeridos. Grande parte das larvas de peixe, como é o caso do mero, necessita de um alimento inicial facilmente digerível (grande quantidade de aminoácidos livres e de oligopéptidos em vez de moléculas complexas), com sistemas enzimáticos que permitam autólise e nutrientes essenciais em abundância que suprimam as carências alimentares das larvas como é o caso do alimento vivo (Dabrowski, 1984). Neste estudo foram usados rotíferos, artémia e copépodes, os quais de acordo com alguns autores (Jancaric, 1964; Dabrowski e Glogowski, 1977) sugerem que o alimento vivo contribui com enzimas digestivas ajudando o processo de digestão. O fornecimento de fatores, através do alimento vivo, que estimulam secreções pancreáticas, respostas endócrinas (Zambonino-Infante, 2001), promovem o processo digestivo pela contribuição com hormonas gástricas que levam a ativação gástrica (Chan e Hale, 1992; Kolkovski et al, 1995) têm um papel bastante importante no desenvolvimento das larvas.

Relativamente ao alimento atribuído neste estudo, foram testadas duas dietas, uma composta por rotíferos e artémia (5 e 1/ml respetivamente) e outra composta pelos mesmos componentes e adição de copépodes (2/ml). Neste sentido, o tratamento Semi-Intensivo com copépodes apresentou uma maior disponibilidade de alimento comparado com os restantes tratamentos. Apesar de o mero ter a capacidade de escolher os organismos de que se alimenta, em estágios iniciais a eficiência alimentar é afetada pela disponibilidade de presas (Russo *et al*, 2009). Neste sentido o tratamento Semi-Intensivo com copépodes apresentou vantagem em termos de diversidade e densidade de alimento, podendo este fator ter uma influência positiva no desenvolvimento das larvas.

A avaliação básica do estado funcional do trato digestivo das larvas de peixe, representa o passo inicial para a definição das melhores condições de cultivo desta

espécie. No processo de maturação do trato digestivo das larvas de peixe existem dois passos cruciais, secreções pancreáticas funcionais e o aparecimento de enzimas no trato estriado do intestino delgado. A ausência de um estômago distinto e funcional é uma característica comum da maior parte das larvas de peixes marinhos e a secreção ácida ou digestão pela pepsina não ocorre antes de este se desenvolver (Govoni et al, 1986). A digestão das proteínas é então mediada pela tripsina em pH alcalino (Zambonino Infante e Cahu, 2001). Observou-se aos 30 DAE, uma elevada atividade específica da tripsina no tratamento Semi-Intensivo (sem copépodes), simultaneamente com menores valores de atividade de pepsina, quando comparado com os restantes tratamentos, o que pode significar um ligeiro atraso no desenvolvimento do estômago e das glândulas gástricas. Embora este último não seja um resultado estatisticamente significativo, sugere que aos 30 DAE as glândulas gástricas já se encontram diferenciadas e com alguma atividade, uma vez que estas são responsáveis pela secreção da pepsina e se desenvolvem ao longo dos estágios larvares (Govoni et al, 1986). Sánchez-Amaya et al. (2007), pontam o aparecimento e proliferação das glândulas gástricas para *Pagros auriga* dos 16 aos 30 DAE, sendo que estas estão completamente desenvolvidas a cerca de 30 DAE, assegurando o desenvolvimento da digestão gástrica. Segundo este autor este facto também acontece a esta altura em espécies como *D. sargus*, *D. dentex*, *P. pagrus*, *P. erythrinus*.

De acordo com Govoni (1986), a pepsina está associada ao processo de metamorfose. Neste caso, os tratamentos que apresentam maiores atividades enzimáticas de pepsina são o sistema Intensivo e o Semi-Intensivo com Copépodes onde efetivamente se observam, relativamente aos estágios de desenvolvimento larvar, um avanço quando comparado com o tratamento Semi-Intensivo (sem copépodes). O facto de o tratamento Intensivo, onde foi aplicada a mesma dieta que o tratamento Semi-Intensivo (sem copépodes), apresentar um desenvolvimento mais avançado que este, pode não estar diretamente relacionado com o fator dieta mas com questões relacionadas com a densidade e disponibilidade de alimento, uma vez que neste tratamento (Intensivo) as taxas de mortalidade foram muito superiores aos restantes tratamentos. Com a maturação do trato digestivo a pepsina começa a ser secretada melhorando a capacidade de digerir diferentes tipos de proteínas caminhando para um trato digestivo completo e funcional. O avanço na maturação do estômago, pâncreas e

intestino promove um aumento de sobrevivência, como demonstrado por Cahu e Zambonino-Infante (2001).

A fosfatase alcalina é uma enzima envolvida na absorção de nutrientes. O aumento da atividade desta enzima sugere um melhoramento da capacidade digestiva do intestino no desenvolvimento larvar (Guerreiro et al, 2010). Aos 30 DAE, a atividade desta enzima é estatisticamente maior nos tratamentos Semi-Intensivos (com o sem copépodes) quando comparados com o tratamento Intensivo. Neste sentido, pode dizer-se que o tipo de sistema selecionado para o cultivo desta espécie tem influência no desenvolvimento da capacidade digestiva das larvas de mero (Duray et al, 1997). Um cultivo onde sejam aplicadas elevadas densidades pode prejudicar não só as larvas como também a própria aquacultura em termos económicos, uma vez que o aproveitamento do alimento atribuído não é maximizado, devido à maturação do intestino das larvas do sistema Intensivo não estar tão desenvolvido.

Segundo Cahu e Zambonino-Infante (2001), os peixes atingem uma digestão intestinal adulta quando a hidrólise dos componentes da dieta é maioritariamente realizada por enzimas localizadas no prato estiado dos enterócitos. A aminopeptidase segue o mesmo padrão de variação entre os tratamentos que o homogenado intestinal aos 62 DAE mas em maior magnitude (purificação adequada das membranas do prato estiado). O tratamento Intensivo apresentou uma atividade de aminopeptidase no prato estiado significativamente menor que o tratamento Semi-Intensivo, sugerindo mais uma vez, que as larvas do tratamento Intensivo não apresentam uma digestão intestinal tão desenvolvida como as larvas dos restantes tratamentos. Este resultado pode ter tipo implicações a longo prazo uma vez que no final da experiência, este tratamento foi o que apresentou menor crescimento quando comparado com os restantes tratamentos.

Estudos anteriores mostram que os níveis de atividade enzimática são menores em larvas, comparando com juvenis ou adultos (Clark et al., 1986). Analisando os resultados, observa-se que as atividades específicas da maior parte das enzimas digestivas avaliadas (exceto a tripsina e pepsina) tornam-se relativamente constantes enquanto as atividades enzimáticas totais aumentam gradualmente com a idade, indicando que as larvas melhoram a sua capacidade digestiva à medida que se desenvolvem (Ribeiro et al., 1999, 2008; Lazo et al., 2007; Suzer et al., 2007).

Assim caracterizando e quantificando a atividade das enzimas digestivas podemos avaliar o desenvolvimento e o processo digestivo das larvas com o intuito de sincronizar os protocolos alimentares otimizando a produção larvar (Zambonino-Infante et al., 2008). Com este estudo pode afirmar-se que a adição de copépodes à dieta das larvas de mero pode trazer vantagens a longo prazo, como demonstrado para *Epiniphelus coioides* (Doi et al, 1997). A contribuição deste tipo de alimento vivo nos estágios iniciais promove o aumento da capacidade digestiva das larvas devido a uma maturação antecipada do trato digestivo, provavelmente devido aos copépodes apresentarem uma grande quantidade de aminoácidos livres facilmente digeríveis pelas larvas quando comparados com artémias e rotíferos (Naess et al, 1995). A secreção da pepsina e o surgimento de uma digestão ácida concede a capacidade das larvas digerirem alimentos mais complexos. Uma vez que um dos objetivos da aquacultura é a completa substituição do alimento vivo por rações comerciais, como acontece com o robalo (Zambonino-Infante et al., 2008), torna-se vantajoso que a transição para o alimento inerte seja feita o mais cedo possível, sendo adequado para esta espécie o início da co-alimentação aos 30 DAE contribuindo para a redução do período de alimentação por alimento vivo.

## 5. Conclusão

Este estudo mostrou que o uso de uma dieta inicial com rotíferos e copépodes melhoram as taxas de crescimento, desenvolvimento larvar e sobrevivência. Melhores resultados na sobrevivência e malformações esqueléticas desta espécie são também associados a cultivos em grandes volumes. O sistema Semi-Intensivo com Copépodes mostrou ser o sistema mais adequado para o cultivo de larvas de mero uma vez que apresenta uma maior taxa de sobrevivência, uma reduzida percentagem de malformações e um bom desenvolvimento do trato digestivo das larvas. A maturação antecipada da fisiologia digestiva proporciona um aumento da qualidade das larvas cultivadas e menos gastos em termos de cultivo, uma vez que, quanto mais cedo as larvas se desenvolverem, menor serão os gastos em alimento vivo, podendo este ser substituído por ração.

Através deste estudo conclui-se que um protocolo de produção onde sejam aplicados grandes volumes, baixas densidades e a adição de copépodes à dieta inicial promove a melhoria da qualidade das larvas de mero trazendo inúmeras vantagens à aquicultura.



## 6. Referências bibliográficas

- Allain G, Petitgas P, Grellier P, Lazure P, 2003. The selection process from larval to juvenile stages of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Bay of Biscay investigated by Lagrangian simulations and comparative otolith growth. *Fish Oceanogr* 12:407–418.
- Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79–89.
- Azzurro E., Finoia M. G., Mandich A., Marino, G., Massari, A., Messina, M. T., 2000. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification*. Zaragoza: CIHEAM, pp. 215-225 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 47)
- Baras, E., Ndao, M., Maxi, M.Y.J., Jeandrain, D., Thomé, J.P., Vandewall, P., Mélard, C., 2000. Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions: I. Ontogeny, dynamics, bioenergetics of cannibalism and prey selectivity. *J. Fish Biol.* 57, 1001-1020.
- Baras, E., Kestemont, P., Mélard, C., 2003. Effect of stocking density on the dynamics of cannibalism in sibling larvae of *Perca fluviatilis* under controlled conditions. *Aquaculture* 219, 241–255.
- Ben Khemis, I., Zouiten D., Besbes, R., Kamoun, F., 2006. Larval rearing and weaning of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) in mesocosm with semi-extensive technology. *Aquaculture*, 259, 190–201.
- Berg, L., 1997. Commercial feasibility of semi-intensive larviculture of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) *Aquaculture*, 155, pp. 333-340.
- Bessey, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimetres of serum *J. Biol. Chem.*, 164, 321–329.
- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M., Cataudella, S., 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* 192, 1–22.
- Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., Marzi, P., Cataudella S., 2009. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture* 291, 48-60.
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S. e Witten, E., 2013a. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Reviews in Aquaculture*, 5, S99–S120.

- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, E., Moren, M., Fontagné, S. e Koumoundouros, G., 2013b. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, 5, S121–S167.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cabrita, E., S. Engrola, L.E.C. Conceição, P. Pousão-Ferreira and M.T. Dinis., 2009. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, 287: 152-157.
- Cahu, C., Zambonino Infante J. L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109: 213-222.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic and intestinal peptidases. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 209-214.
- Chan, C.B. and Hale, E., 1992. Effect of somatostatin on intragastric pressure and smooth muscle contractility of the rainbow trout walbaum. *J. Fish Biol.*, 40: 545-556.
- Clark, J., Murray, K.R. and Stark, J.R., 1986. Protease development in Dover sole (*Solea solea*) *Aquaculture* 53: 253–262.
- Clark, J., Macdonald, N.L., Stark, J.R., 1987. Leucine aminopeptidase in the digestive track of Dover sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 61, 231-239.
- Crane, R. K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of prato estiado membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*) *Biochim. Biophys. Acta*, 554 (1979), pp. 264-267.
- Caruso, G., Denaro, M.G., Genovese, L., 2009. Digestive Enzymes in Some Teleost Species of Interest for Mediterranean Aquaculture. *The Open Fish Science Journal*, 2009, 2, 74-86.
- Cunha E., Plirú A., Pousão-Ferreira P., 2007 Intensive cultivation and use of *Acartia grani* SARS for rearing marine fish larvae. *Aquaculture Europe 2007*, October, 24-27, 2007, Istanbul, Turkey, Books of Abstracts pp.128-129.
- Cunha, M. E., Quental, H., Barradas, A., Pousão-Ferreira, P., Cabrita, E. and Engrola, S., 2009. Rearing larvae of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), (Pisces: Serranidae) in a semi-extensive mesocosmo. *Scientia Marina* 73SI, Barcelona (Spain).

- Cunha, M. E., Ré, P., Quental-Ferreira, H., Gavaia, P. J. and Pousão-Ferreira, P., 2013. Larval and juvenile development of dusky grouper *Epinephelus marginatus* reared in mesocosms. *Journal of Fish Biology*, doi:10.1111/jfb.12180
- Dabrowski, K., 1984. Ontogenetic development of cyprinid-like type of digestive tract. *Reprod. Nutr. Develop.* 24: 807-819.
- Dabrowski, K. and Glogowski, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54: 129-134.
- Daoulas, Ch., Economou, N. A., and Bantavas, I., 1991, Osteological abnormalities in laboratory reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture* 97: 169-180.
- Dhert, P., Divanach, P., Kentouri, M. and Sorgeloos, P., 1998. Rearing techniques for difficult marine fish larvae. *World Aquaculture*, March: 48-55.
- Divanach P., Kentouri M., 2000. Hatchery techniques for specific diversification in Mediterranean fin fish larviculture. *Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification*. Zaragoza : CIHEAM, pp. 75-87 (Cahiers Options Méditerranéennes; n . 47)
- Doi, M., Toledo, J. D., Golez, M. S. N., de los Santos, M. & Ohno, A., 1997. Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiologia* 358, 259-263.
- Duray, M. N., Estudillo, C. B. & Alpasan, L. G., 1997. Larval rearing of the grouper *Epinephelus suillus* under laboratory Conditions. *Aquaculture* 150, 63-76.
- Dussart, B. H., and Defaye, D. (eds.), 2001. *Introduction to the Copepoda*. Backhuys, Leiden.
- Estevez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G. and Sargent, J. R., 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180: 321-343.
- Evjemo, J. O., Reitan, K.I. & Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227, 191-210.
- FAO, 2012. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*, Rome, 209 pp.
- FAO, 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, Fisheries and Aquaculture Department, Edited by Patrick Lavens and Patrick Sorgeloos, Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, University of Ghent, Ghent, Belgium

- Faustino, M. and Power, D. M., 1998. Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex, *Journal of Fish Biology* 52, 11–22.
- Fernández I., F.J. Moyano, M. Díaz, and T. Martínez. 2001. Characterization of a amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *J Exp Mar Biol Ecol* 262:1–12.
- Gavaia, P.J., Sarasquete, C., Cancela, M.L., 1999. *Detection of mineralized structures in early stages* of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Biotechnic & Histochemistry*.
- Gavaia, P., Sarasquete, C. and Cancela, M., 2000. Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Center for Marine Sciences, University of Algarve, Faro, Portugal. , Mar; 75(2):79-84.*
- Georgopoulou, U., Sire, M.F., Vernier, J.M., 1985. Macromolecular absorption of proteins by epithelial cells of the posterior intestinal segment and their intracellular digestion in rainbow trout.
- Glamuzina, B., N. Glavic´, V. Koz´ul and B. Skaramuca., 1998. Induced sex reversal of the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Aquac. Res.*, 29(8): 563-568.
- Giles, N., Wright, R.M. and Nord, M.E., 1986. Cannibalism in pike fry, *Esox lucius* L.: some experiments with fry densities. *J. Fish Biol* 29, 107-13.
- Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287, 381–387.
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16, 59–77.
- Gozalbo, A., Amart, F., Hontoria, F., Navarro, J. C. y Varro, I., 1987. Composicion bioquímica de artemia alimentada com diferentes dietas. “Cuad.Marismq. Publ. Tec. 12 (35): 585-590.
- Guerreiro, I., de Vareilles, M., Pousão-Ferreira, P., Rodrigues, V., Dinis, M. T., Ribeiro, L., 2010. Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*), *Aquaculture* 300, 194–205.
- Halpern, B.S., Warner, R.R., 2002. Marine reserves have rapid and lasting effects. *Ecol. Lett.* 270, 361–366.
- Halpern, B.S., Warner, R.R., 2003. Matching marine reserve design to reserve objectives. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 270 (1527), 1871–1878.

- Hecht, T., Pienaar, A.G., 1993. A review of cannibalism and its implications in fish larviculture. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 246-261.
- Hilomen-Garcia, G.V., 1997. Morphological abnormalities in hatchery-bred milkfish (*Chanos chanos Forsskal*) fry and juveniles. *Aquaculture* 152, 155–166.
- Hoehne-Reitan, K., Kjorsvik, E., Gjellesvik, D.R., 2001. Development of bile salt-dependent lipase in larval turbot. *J. Fish Biol.* 58, 737–745.
- Hotos, G. N., 2002. Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algal species with various cell volumes and cell densities. *Aquaculture Research* 33 (12): 949 – 957.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J. Nutr.* 118, 515–520.
- Hseu, J.-R., Chang, H.-F., Ting, Y.-Y., 2003. Morphometric prediction of cannibalism in larviculture of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*., *Aquaculture* 218, 203-207.
- Infante, J. L. Z., & Cahu, C. L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 477–487.
- Izquierdo M. S., Socorro J. & Roo J., 2010. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 320–326.
- Jancaric, A., 1964. Die Verdauung der Hauptnaehrstoffe beim Karpfen. *Z. Fisch* 12: 602-684.
- Kapoor B.G., H. Smit, and I.A. Verighina. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv Mar Biol* 13:109–239.
- K. M. Liu and W. B. Chang, 1992. “Bioenergetic modeling of effect of fertilization, stocking density, and spawning on growth of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)”. *Aquaculture and Fisheries Management*, vol. 23, pp. 291-301.
- Kentouri, M., Divanach, P., 1983. The influence of initial trophic Conditions on oil globule resorption, growth and survival of gilt head sea bream *Sparus aurata*, larvae in extensive breeding. *Aquaculture*, 35, 43-55.
- Kentouri, M., Divanach, P., Papandroulakis, N. and Stefanakis, S., 1993. Biological performance of intensively reared sea bream (*Sparus aurata*) larvae in a pilot closed system. In: *Proceeding of the World Aquaculture '93*. EAS Special Publication, 19: 396.
- Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., Kentouri, M., 1997. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* fry. *Aquaculture* 149, 215–226.

- Kolkovski, S. and Tandler, A., 1995. Why microdiets are still inadequate as viable alternative to live zooplankters for developing marine fish larvae. In: P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelants (Editors), Lark 95' Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Spec. Publ. no. 24, European Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp. 265-266.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in larvae and juvenile - implications and application to formulated diets. Aquaculture, in press.
- Korniyenko, G. S., 1971. The role of infusoria in the food of larvae of phytophagous fishes. J. Ichthyol. 11: 241-246.
- Koven, W. M., Tandler, A., Kissil, G. W. & Sklan, D., 1992. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. Aquaculture 104 (12):91-104.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. Aquaculture 194, 107-121.
- Kuo Ching-Ming., 1995. The Groupers in World Animal Sciences. In Production of Aquatic Animals: Fishes, Nash CE, Novotny AJ (eds). Elsevier: Amsterdam; 305-317.
- Lagos, P.J., 1989. An integrated marine fish farm in Cephalonia, Greece. II. An analysis and evaluation of economic performance. In: Aquaculture – A Biotechnology in Progress, De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H. and Wilkins, N. (eds). European Aquaculture Society, Bredene (Belgium), pp. 1175-1181.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 361, pp. 252-295.
- Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., Arnold, C.R., 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 256, 194-205.
- Le Cren, E.D., 1951. Length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and Conditions in the perch (*Perca fluviatilis*). J. Anim. Ecol., 20: 201-239.
- Le Francois, N.R., Jobling, M., Carter, C. & Blier, P.U., 2010. *Finfish Aquaculture Diversification*. CABI, Wallingford.
- Levin, S.L., Grimes, C.B., 2002. Reef fish ecology and grouper conservation and management. In: Sale, P. (Ed.), Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem. Wiley, New York, pp. 377-389.
- Lim, L.C., 1993. Larviculture of the greasy grouper *Epinephelus tauvina* F. and the brown-marbled grouper *E. fuscoguttatus* F. in Singapore. Journal of the World Aquaculture Society 24, 262-274.

- Ma, H., Cahu, C., Zambonino, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M.M., Mai, K., 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 245, 239–248.
- Marino G, E Azzurro, A Massari, MG Finoia and A Mandich, 2001. Reproduction in the dusky grouper from the southern Mediterranean. *J Fish Biol*, 58: 909-927.
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M.G. Finoia, Y. Zohar and C.C. Mylonas., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH $\alpha$  implant. *Aquaculture*, 219: 841-858.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282–295.
- Martínez, I., Moyano, F. J., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 21, 317–323.
- Matsouka, M., 1985. Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. *Jpn. J. Ichthyol.*32:35-51.
- Mauchline, J., 1998. The Biology of Calanoid Copepods. *Adv. Mar. Biol.* 33: 1-710.
- McEvoy, L., Næss, T., Bell, J. G. and Lie, O., 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods . *Aquaculture* 163: 235-248.
- Mélard, C., Kestemont, P. & Grignard, J. C., 1996. Intensive ongrowing of juvenile perch (*Perca fluviatilis*): zootechnical parameters and growth. *J. Appl. Ichthyol.* (In press).
- Métais, P. and Bieth, J., 1968. Détermination de l'a-amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Clin.* 26(1–2): 133–142.
- Moran D. and K.D. Clements., 2002. Diet and endogenous carbohydrases in the temperate marine herbivorous fish *Kyphosus sydneyanus* (Perciformes: Kyphosidae). *J Fish Biol* 60: 1190–1203.
- Naas, K.E., Næss, T. and Harboe, T., 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture* 105: 143-156.
- Naess, T., Germain-Henry, M., Naas, K.E., 1995. First feeding of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* using different combinations of *Artemia* and wild plankton. *Aquaculture* 130, 235–250.

- Nagano, N., Iwatsuki, Y., Kamiyama, T., Nakata, H., 2000. Effects of marine ciliates on survivability of the first-feeding larval surgeonfish, *Paracanthurus hepatus*: laboratory rearing experiments, *Hydrobiologia* 432: 149-157.
- Narciso, L., 2000. Biologia e cultivo de *Artemia* sp. (*Crustácea, Branchiopoda*): Sua utilização em aquacultura. Câmara Municipal de Cascais, “Prémio do mar Rei D. Carlos 1998”, 94 pp.
- Papandroulakis, N., Kentouri, M., Maingot, E., Divanach, P., 2004. Mesocosm: a reliable technology for larval rearing of *Diplodus puntazzo* and *Diplodus sargus sargus*, *Aquaculture International* 12: 345–355
- Papandroulakis, N., Mylonas, C.C., Maingot, E., Divanach, P., 2005. First results of greater amberjack (*Seriola dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture* 250, 155–161.
- Parazo, M. M., Avila, E. M., Reyes Jr., D.M., 1991. Size- and weight-dependent cannibalism in hatchery-bred sea bass (*Lates calcarifer* Bloch.). *J. Appl. Ichthyol.* 7, 1-7.
- Pederson, B. H., 1984. The intestinal evacuation rates of larval herring (*Clupe harengus* L.) predating on wild zooplankton. *Dana*, 3: 21-30.
- Peres A., J.L. Zambonino Infante, and C. Cahu. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 19:145–152.
- Person-Le Ruyet, J., 1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti. Feb. 20–March 4, 1989. IFREMER, Actes de Colloque Brest France. 9, 625–642.
- Pierre, P., Gaillard, S. & Pre, N., 2007. Grouper aquaculture : Asian success and Mediterranean trials. *Wiley InterScience*. doi:10.1002/aqc
- Pierre, S., S. Gaillard, N. Prévot-D’Alvise, J. Aubert, O. Rostaing-Capaillon, D. Leung-Tack and J. P. Grillasca., 2008. Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aquatic. Conser: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 18: 297-308.
- Planas, M. & Cunha, I., 1999. Larviculture of marine fish: Problems and Perspectives. *Aquaculture* 177, 171-190.
- Pousão, P., 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para larvicultura de peixes marinhos, Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P., IPIMAR.
- Prein, M., G. Hulata and D. Pauly, editors., 1993. Multivariate methods in aquaculture research: case studies of tilapias in experimental and comercial systems. *JCLARM Stud. Rer.* 20, 15 pp.

- Puvanendran, V. & Brown, J. A., 1999. Live food and feeding ecology of larval snapper (*Pagrus auratus*). Hatchery Feeds: Proceedings of a workshop held in Cairns, 63-68.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J.R., Oie, G. and Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155:207-221.
- Ribeiro, L., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465–473.
- Ribeiro, L., Couto, A., Olmedo, M., Álvarez-Blázquez, B., Linares, F., Valente, L.M.P., 2008. Digestive enzyme activity at different developmental stages of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Aquacult. Res.* 39, 339–346.
- Russo, T., Pulcini, D., Bruner, E., Cataudella, S., 2009. Shape and size variation: Growth and Development of Dusky Gouper (*Epinephelus marginatus* Lowe, 1834), *Journal of morphology*, 270:83-96.
- Russo, T., Boglione, C., De Marzi, P., Cataudella, S., 2009. Feeding preferences of the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*, Lowe 1834) larvae reared in semi intensive conditions: A contribution addressing the domestication of this species, *Aquaculture* 289, 289–296.
- Russ, G.R., 2002. Yet another review of marine reserves as reef fishery management tools. In: Sale, P. (Ed.), *Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem*. Wiley, New York, pp. 421–443.
- Russ, G.R., Stockwell, B., Alcalá, A.C., 2005. Inferring versus measuring rates of recovery in no-take marine reserves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 292, 1–12.
- Rust, M.B., 2002. Nutritional Physiology in Fish Nutrition. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Academic Press, California, U.S.A.*, pp. 367–452.
- Sánchez-Amaya, M. I., Ortiz-Delgado, J. B., García-López, Á., Cárdenas, S., Sarasquete, C., 2007. Larval ontogeny of redbanded seabream *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach, *Aquaculture* 263, 259–279.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A. and Bell, J. G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155 : 117-127.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191–199.
- Sazhina, L.I. (ed.), 2006. *Breeding Growth Rates, and Production of Marine Copepods*. Universities Press, Andhra Pradesh, India.
- Shaw, G. W., Pankhurst, P. M. & Purser, G. J., 2003. Prey selection by greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther) larvae. *Aquaculture* 228, 249-265.

- Smith, C., 1989. An investigation into the problem of conspecific predation among the fry of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) in an intensive culture system. MSc thesis, Plymouth Polytechnic. 134 pp.
- Smith-Vaniz, W. F., Kaufman, L. S., Glowacki, J., 1995. Species-specific patterns of hyperostosis in marine teleost fishes, *Marine Biology* 121: 573-580.
- Sorgeloos, P., Léger, P., Lavens, P. & Tackaert, W., 1987. Increased yields of marine fish and shrimp production through application of innovative techniques with *Artemia*. *Aquac. Et development-Cahiers Ethol. Appliqué*, 7: 43-50.
- Stottrup, J. G. & Norsker, N. H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231-247.
- Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, Ş., Firat, K., Alpbaz, A., 2007. Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 470-477.
- Tarby, M. J., 1974. Characteristics of yellow perch cannibalism in Oneida Lake and the relation to first year survival. *Trans. Am. Fish Soc.* 103
- Teng, S. K., Akatsu, S., Al-Abdul-Elah, K. M., El-Zahr, C. R., Downing, N., Al-Marzouk, A. And Chazal, N, 1982. Spawning, fingerling production and market-size culture of sobaity (*Acanthopagrus cuvieri*) in Kuwait. *A. Res. Rep. Kuwait Inst. Sci. Res.* 1981, 66-70.
- Terra, W.R., Ferreira, C., De Bianchi, A.G., 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25, 487-494.
- Tseng, J. H., Grendell, S. S., Rothman, 1982. Food, duodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. *Am. J. Physiol.*, 243pp.
- Tucker, C.S. & Hargreaves, J.A., 2008. *Environmental Best Management Practices for Aquaculture*. Blackwell Publishing Ltd., Ames, IA, USA.
- Underwood, A. J., 1997. *Experiments in Ecology: their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance*. Cambridge: Cambridge University Press.
- van der Meeren, T., and Næss, T, 1993. How does cod (*Gadus morhua* L.) cope with variability of feeding Conditions during early larval stages? *Mar. Biol.*, 116: 637-647.
- van der Meeren, T. and Lonoy, T., 1998. Use of mesocosms in larval rearing of saithe [*Pollachius virens* (L.)], goldsinny [*Ctenolabrus rupestris* (L.)], and corkwing [*Crenilabrus melops* (L.)], *Aquacultural Engineering* 17:253-260.
- van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre, K. and Fyhn, H. J., 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture* 274: 375-397.

- Vasnetsov, V. V. (1953). Developmental stages of bony fishes. In: Ocherki po obschim Voprosam Ikhtiologii. Akademya Nauk Press, Moscow.
- Waagbo, R., 1994. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquacult. Fish. Manage.* 25, 175–197.
- Walford, J., Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass *Lates calcarifer* larvae and juveniles. *Aquaculture* 109, 187–205.
- Watanabe, W.O., Ellis, S.C., Ellis, E.P., Lopez, V.G., Bass, P., Ginoza, J. and Moriwake, A., 1996. Evaluation of first-feeding regimens for larval Nassau grouper *Epinephelus striatus* and preliminary pilot-scale culture through metamorphosis. *Journal of the World Aquaculture Society* 27, 323-331.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Pascuala, E., Sarasquete, M. C., Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcon, F. J., García-Gallego, M. and Parra, G., 2000. Towards and inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 143-152.
- Zabala, M., Loisy, P., Garcia-Rubes, A. and Gracia, V., 1997. Social-behavioral context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, 61, 79-89.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 399-408.
- Zambonino Infante, J. L., & Cahu, C. L., 2001. Review: Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish Larvae, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130, 477-487.
- Zambonino Infante, J. L. & Cahu, C. L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268(1-4), 98–105.doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.03
- Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and Digestive Functions of Fish*. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277–344.

## Referências eletrônicas

- Fishbase, 2012. *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Disponível em <http://www.fishbase.org/summary/6470> (consultado a 12 de junho de 2013).