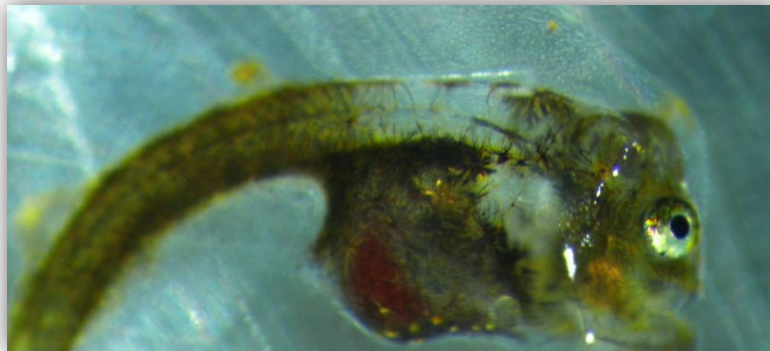


INSTITUTO POLITÉCNICO DE LEIRIA
ESCOLA SUPERIOR DE TURISMO E TECNOLOGIA DO MAR



**Desenvolvimento de um novo protocolo alimentar para Linguado,
Solea senegalensis, à base de copépodes congelados**



Mafalda de Sousa Rocha

2015

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LEIRIA
ESCOLA SUPERIOR DE TURISMO E TECNOLOGIA DO MAR



**Desenvolvimento de um novo protocolo alimentar para Linguado,
Solea senegalensis, à base de copépodes congelados**

Mafalda de Sousa Rocha

Dissertação para a obtenção do Grau de Meste em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a Orientação de:

Doutora Laura Ribeiro

Doutora Alexandra Teodósio

Especialista Teresa Baptista

2015

Desenvolvimento de um novo protocolo alimentar para Linguado, *Solea senegalensis*, à base de copépodes congelados

Copyright © Mafalda de Sousa Rocha

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

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 este trabalho 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 o 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

Ao Doutor Pedro Pousão-Ferreira, responsável da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) por me ter permitido e proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese.

À Doutora Laura Ribeiro obrigada pela disponibilidade para orientar este trabalho, pela exigência de método e rigor, pela cedência e indicação de bibliografia relevante, pela acessibilidade, mesmo quando cheia de trabalho, pela simpatia e confiança. Foi um enorme privilégio, muito obrigada.

À Doutora Alexandra Teodósio pela atenção e apoio da elaboração desta tese, pela disponibilidade e, principalmente, pela ajuda na Universidade, que foi crucial para a elaboração desta tese, no qual me ajudou sempre que algum problema surgia, mesmo estando cheia de trabalho.

À Professora Teresa Baptista muito obrigada por ter aceitado orientar este trabalho, pela revisão crítica do texto, pelos comentários, esclarecimentos e sugestões, pela preocupação e disponibilidade. Mas, principalmente, OBRIGADA por me ter aturado e ajudado nestes cinco anos de vida académica.

O meu imenso OBRIGADA à Marta Santos, que sem a ajuda dela este trabalho seria muito mais difícil. Obrigada por me teres acompanhado durante todas as atividades, por me forneceres informações importantes, pela aprendizagem, por acreditares em mim e no meu trabalho, pela constante disponibilidade, muita paciência e muitas risadas, e por toda a ajuda.

Agradeço a toda a equipa da EPPO pela companhia, aprendizagem e muitos bons momentos, sempre com um sorriso na cara. Tiveram um papel muito importante neste trabalho e sempre me ajudaram, principalmente à Marisa Barata, Lurdes Palma, a minha Paulinha, Ana Medeiros, Ana Nogueira, Sara Castanho, Tânia Raimundo, Tânia Lourenço e Márcio Moreira. Foi um prazer conhecer-vos.

A todos os meus amigos, de infância e universitários, pela ajuda e paciência que tiveram comigo e por acreditarem sempre em mim a ser a melhor. Vocês são os maiores e os melhores. OBRIGADA Joana Inês, Vanessa, Sérgio, Francisco, Ana, Renato, Mauro, Hélio, Ophélie, Inês Paulo, Nina, Luís, Soraia e Maria.

Um agradecimento especial ao Ricardo, pela paciência que teve comigo desde o início, por me levantar a cabeça e dizer “Tu consegues”, mesmo estando longe. Sem ti, era mais difícil.

A toda a minha família, em especial aos meus avós por me apoiarem sempre e por acreditarem em mim. Sou e serei sempre a “neta preferida”, Obrigada.

Por fim, aos meus pais, pelos inúmeros sacrifícios suportados, pelo constante encorajamento, por me apoiarem incondicionalmente independentemente de tudo e de todos. Por me ensinarem a ser feliz e a lutar por o que mais gosto. Ao meu mano pelo apoio incondicional, amizade e amor. Obrigada a vocês.

Obrigada a todos, que me ajudaram, direta e indiretamente, para a realização desta tese, sem todos vocês era muita mais difícil.

Resumo

A qualidade do alimento é essencial para que as larvas obtenham os nutrientes necessários para um desenvolvimento normal. Como as larvas de peixes marinhos têm um elevado potencial de crescimento, têm igualmente necessidades nutritivas específicas e elevadas.

Copépodes são considerados o melhor alimento para a maioria das larvas marinhos, uma vez que o perfil nutricional preenche os requisitos das larvas de peixes. Os copépodes são uma excelente fonte de ácidos gordos insaturados (HUFAs) e poliinsaturados (PUFAs), não necessitando de enriquecimento, como a *Artemia spp.*. A utilização de copépodes congelados (Planktonic AS, Noruega) é uma nova e vantajosa alternativa para a aquacultura, no qual estão disponíveis durante todo o ano e mantêm a composição bioquímica ao longo do ano.

Inicialmente estudou-se o comportamento alimentar do linguado face a este novo produto, pois o mesmo não apresenta movimento. Foi desenvolvido um protocolo para a coloração dos copépodes congelados. Taxa de ingestão e/ou comportamento alimentar foram avaliados quando as larvas foram alimentadas com copépodes corados, não corados e artémia. Observou-se que a coloração aumenta a ingestão de copépodes congelados pelas larvas de peixe, embora a uma taxa inferior quando comparado com a artémia.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo alimentar à base de copépodes congelados, em substituição das presas habitualmente utilizadas (rotíferos e artémia), durante o período larvar do linguado, *Solea senegalensis*. Foram testados 2 protocolos alimentares, 50:50 e Agressivo, com a substituição de 50% e 90%, respectivamente, de presas vivas do protocolo alimentar para linguado habitualmente utilizado na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), sendo este considerado Controlo.

O ensaio larvar decorreu desde a abertura de boca até aos 40 dias após a eclosão (DAE). As amostras foram recolhidas periodicamente para avaliar o crescimento, sobrevivência e a condição nutricional das larvas, através da determinação do índice ARN:ADN e da proteína total. Para avaliar a condição das pós-larvas, peixes de todos os tratamentos foram sujeitos a um desmame aos 40 DAE, com uma dieta inerte com incorporação de 10% de copépodes. O desempenho dos peixes foi seguido até aos 50 DAE.

As larvas do tratamento Controlo apresentaram maior crescimento e uma maior taxa de ingestão de presas vivas, no entanto as larvas do protocolo 50:50 apresentaram um melhor índice de ARN:ADN. Estes dados sugerem que para o linguado, os copépodes podem substituir quase 50% das presas vivas.

Palavras-chave: Cultivo larvar, *Solea senegalensis*, copépodes congelados, protocolo alimentar, comportamento alimentar, taxa de ingestão, crescimento, condição nutricional, ARN:ADN.

Abstract

The quality of food is essential for larvae to obtain the necessary nutrients for normal development. As marine fish larvae have a high growth potential, they also have specific and high nutritional requirements.

Copepods are considered the best food for the majority of marine fish larvae, since the nutritional profile fulfills fish larvae requirements. In fact copepods are an excellent source of unsaturated fatty acids (HUFAs) and polyunsaturated (PUFA), not requiring enrichment, as *Artemia spp.* The use of frozen copepods (Planktonic AS, Norway) is a new and advantageous alternative to fish farms, available throughout the year and maintaining the biochemical composition throughout the year.

Sole feeding behavior towards this product was initially studied, since frozen copepods had no movement. A protocol was developed to stain frozen copepods. Ingestion rates and/or feeding behavior were assessed when sole larvae was fed stained copepods, non-stained and *Artemia*. It was observed that staining copepods enhanced copepods ingestion by fish larvae, though at lower rate when compared to *artemia*.

The aim of this study was to develop a feeding protocol based in frozen copepods, by replacing the prey commonly used (rotifers and *Artemia*) during the larval period of Senegalese Sole, *Solea senegalensis*. Two feeding protocols were tested, 50:50 and Aggressive, respectively with a replacement of 50% and 90% of live prey on the standart feeding protocol for sole of IPMA's aquaculture research station (EPPO), considered the Control protocol.

Larval rearing ran from the mouth opening until 40 days after hatching (DAH). Samples were collected periodically to assess growth, survival and nutritional condition of larvae, through RNA:DNA index and total protein determination. To further evaluate post-larvae condition, fish from all treatments were sudden weaned 40 DAH with an inert diet incorporating 10 % of copepods. Fish performance was followed until 50 DAH.

Control treatment showed higher growth and higher ingestion rates of live prey, however larvae from of 50:50 protocol showed better RNA:DNA ratio. These data suggest that for sole copepods might replace almost 50% of the live prey.

Key words: Larval rearing, *Solea senegalensis*, frozen copepods, feeding protocol, feeding behavior, ingestion rate, growth, nutritional condition, RNA:DNA.

Índice

1	– Introdução	1
1.1	– Cultivo larvar	1
1.1.1	– Desempenho larvar	5
1.2	– Copépodes	7
1.3	– Protocolos alimentares	9
1.4	– <i>Solea senegalensis</i>	10
2	– Objetivo	13
3	– Materiais e Métodos	15
3.1	– Avaliação do comportamento alimentar	15
3.1.1	– Coloração dos copépodes congelados	15
3.1.2	– Observação da ingestão de partículas	16
3.1.3	– Observação do comportamento alimentar das larvas de liguado a diferentes alimentos.....	16
3.2	– Ensaio larvar	17
3.2.1	– Material biológico	17
3.2.2	– Cultivo larvar	17
3.2.3	– Protocolos alimentares	19
3.2.4	– Preparação dos copépodes congelados	21
3.2.5	– Preparação do alimento vivo	22
3.2.6	– Amostragens	22
3.3	– Componente analítica	23
3.3.1	– Biometria	23
3.3.2	– Técnica de ARN/ADN	26
3.3.3	– Determinação e quantificação colométrica da Proteína Total	27
3.4	– Análise estatística	28
4	– Resultados	29
4.1	– Avaliação do comportamento alimentar	29
4.1.1	– Coloração dos copépodes congelados	29

4.1.2	– Observação da ingestão de partículas	30
4.1.3	– Observação do comportamento alimentar das larvas de linguado a diferentes alimentos	31
4.2	– Análise do crescimento e condição larvar	32
4.2.1	– Crescimento	32
4.2.2	– Índice de Metamorfose	39
4.2.3	– Sobrevivência	40
4.2.4	– Quantificação dos ácidos nucleicos e índice ARN/ADN	42
4.2.5	– Proteína Total	44
5	– Discussão	47
5.1	– Análise do comportamento alimentar	47
5.2	– Análise do crescimento e condição larvar	48
6	– Conclusão	57
7	– Referências	59

Índice de figuras

Figura 3.1 – Esquema dos testes de coloração dos copépodes congelados.....	15
Figura 3.2 – Corante alimentar vermelho utilizado.....	15
Figura 3.3 – Tabuleiro utilizado para o teste de observação do comportamento, com a divisória.....	17
Figura 3.4 – Tanques cilíndricos 200L utilizados para a fase pelágica	18
Figura 3.5 – Tanques retangulares azuis 35L utilizados para a fase bentónica.....	18
Figura 3.6 – Protocolos alimentares do ensaio larvar: a) protocolo Controlo; b) protocolo 50:50; c) protocolo Agressivo.....	20
Figura 3.7 - Esquema representativo das amostragens realizadas ao longo do ensaio ao longo dos dias após eclosão (DAE).....	23
Figura 3.8 – Lupa ocular micrométrica Zeiss Stemi 200-C e Cannon PowerShot GS, respetivamente.....	23
Figura 3.9 - Sistema de lavagem utilizado durante as amostragens.....	24
Figura 4.1 – Fotografias dos copépodes congelados nos diferentes ensaios de coloração: A – 5gotas/5min; B – 10gotas/5min; C – 5gotas/10min.....	30
Figura 4.2 - Fotografias de larvas de linguado com diferentes presas no tracto digestivo: A e B – Copépodes congelados corados; C – Copépodes congelados não corados; D – <i>Artemia spp.</i>	31
Figura 4.3 – Variação do comprimento total (mm), das larvas de linguado, <i>Solea senegalensis</i> durante a fase larvar (22 DAE), para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20) As letras indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.....	33
Figura 4.4 – Variação do peso seco (µg) das larvas de linguado, <i>Solea senegalensis</i> , até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.....	33
Figura 4.5 - Variação da taxa de crescimento relativa (%) das larvas de linguado, <i>Solea senegalensis</i> , até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.....	34
Figura 4.6 - Variação do Índice de Condição das larvas de linguado, <i>Solea senegalensis</i> , até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.....	35
Figura 4.7 - Variação do comprimento total (cm) das pós-larvas de linguado, <i>Solea senegalensis</i> , até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob	

a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.....36

Figura 4.8- Variação do peso húmido (mg) das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.....36

Figura 4.9 - Variação do peso seco (mg) das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.....37

Figura 4.10 - Variação do Índice de Condição das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.....38

Figura 4.11 - Variação dos Índices de metamorfose (%) no linguado (*Solea senegalensis*) durante o ensaio experimental, dos diferentes protocolos alimentares (n=20). Estágios de metamorfose: A – Estágio 0; B- Estágio 1; C- Estágio 2; D- Estágio 3 e E – Estágio 4.....39

Figura 4.12 - Variação da sobrevivência (%) das larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos40

Figura 4.13 - Variação da sobrevivência (%) das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.....41

Figura 4.14 - Variação do conteúdo de ADN/mg (A) e do ARN/mg (B) nas larvas e pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, durante o ensaio, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.....42

Figura 4.15 - Variação do ARN:ADN nas larvas e pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, durante o ensaio, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas entre os tratamentos.....44

Figura 4.16 - Variação da proteína (mg/ml) nas larvas e pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, durante o ensaio, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.....44

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Resumo dos testes de ingestão realizados, tanto para os copos de 500mL como para as incubadoras 200L, com os diferentes parâmetros.....	16
Tabela 3.2 - Índice de Metamorfose descrito por Fernández-Díaz <i>et al.</i> (2001).....	25
Tabela 3.3 – Tabela com a Concentração ($\mu\text{g/ml}$) e volumes (μl) de BSA e de Solução diluente utilizados neste ensaio.....	28
Tabela 4.1 - Resultados de coloração dos copépodes congelados obtidos, após a observação à lupa.....	29
Tabela 4.2 - Resultados da ingestão de partículas pelas larvas de linguado, após a observação à lupa.....	30
Tabela 4.3 - Resultados obtidos após a observação do comportamento das larvas a dois diferentes alimentos.....	32

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

DAE – Dias após eclosão

ARN – Ácido ribonucleico

ADN – Ácido desoxirribonucleico

TCR – Taxa de crescimento relativa

IC – Índice de condição

BSA – bovine serum albumine

1 - Introdução

Atualmente a captura dos produtos provenientes da pesca encontra-se próxima ou ultrapassa já o seu limite sustentável, levando a que a aquacultura seja considerada por muitos como a solução para a escassez iminente dos recursos marinhos (Kaiser *et al.*, 2011; Videler, 2011; FAO, 2012). A produção em aquacultura aumentou com o crescimento da população humana, aumentando a procura de proteína. O peixe é uma fonte de proteína nutricionalmente equilibrada, apresentando uma crescente importância para a nutrição humana. O aumento da procura de peixes marinhos implica que haja produção de larvas e juvenis de peixes marinhos em cativeiro (Uribe *et al.*, 2011), saudáveis e de elevada qualidade (Conceição *et al.*, 2009).

A fase larvar representa uma das fases críticas na aquacultura de muitas espécies de peixes. Os desequilíbrios nutricionais do alimento vivo normalmente usados nas maternidades têm sido apontados como uma das principais razões para uma baixa produção. O alimento tradicionalmente usado são os rotíferos (*Brachionus spp.*) e a artémia (*Artemia spp.*), mas nos últimos anos tem havido uma diminuição na disponibilidade de *Artemia spp.* e também na qualidade dos cistos, sendo necessário estudar novas alternativas de alimento. Os copépodes representam a presa natural da maioria das espécies de larvas de peixes marinhos. A possibilidade de preservar copépodes recolhidos quando têm o maior valor nutricional, sendo posteriormente processado (Planktonic AS, Noruega) para ser armazenado e facilmente utilizado por maternidades ao longo do ano é uma boa alternativa, para diminuir a dependência do alimento tradicional desde que proporcione taxas de crescimento e sobrevivência larvares semelhantes.

Neste ensaio avaliou-se o potencial de utilização de copépodes congelados a diferentes níveis de substituição do alimento vivo habitual, em protocolos alimentares para larvas e pós-larvas de linguado (*Solea senegalensis*).

1.1 - Cultivo Larvar

A fase larvar representa uma das fases críticas na aquacultura de muitas espécies de peixes (Sargent *et al.*, 1997), pois é o período de desenvolvimento com a maior mudança de processos dependentes do tamanho (Reglero *et al.*, 2014). Neste contexto, conseguir manter um

cultivo larvar com sucesso representa um passo fundamental para melhorar a produção e a qualidade dos peixes (Cara *et al.*, 2005).

Um dos fatores decisivos no sucesso de obtenção de larvas está associado ao desenvolvimento de alimento que seja capaz de suprir as necessidades nutricionais da espécie em questão, tanto qualitativa como quantitativamente (Santos, 2005; Yúfera *et al.*, 2005; Almeida, 2006). A nutrição desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de uma aquicultura sustentável, no qual o bem-estar e a saúde dos peixes é o mais importante (Piccinetti *et al.*, 2012), pois afecta diretamente a sobrevivência e o tempo de desenvolvimento larval (Thomaz *et al.*, 2004). Má nutrição é considerado um dos fatores de stress, no qual os ácidos gordos essenciais e micronutrientes necessários para o óptimo desenvolvimento das larvas e crescimento são de grande relevância (Cahu *et al.*, 2003).

Existem inúmeros fatores que influenciam a seleção de presas pelas larvas, tais como as características das presas, tamanho adequado ao tamanho da boca da larva, valor nutritivo compatível, densidade, facilidade de cultivo em grande escala, disponível durante todo o ano, (Lavens *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2003), fácil digestibilidade, o seu movimento/comportamento e cor para atrair a larva, mas também características das larvas, sensoriais, habilidade motora e dimensão da boca e do corpo (Cox *et al.*, 2000; Olivotto *et al.*, 2010b). Para além das características da presa e larva, os fatores ambientais também são importantes, como a intensidade da luz e espectro, turbidez da água e temperatura (Cobcroft *et al.*, 2001; Olivotto *et al.*, 2010b).

A relação entre o tamanho da boca do predador e o tamanho da presa é considerado como um dos fatores decisivos na qualidade das larvas de peixe, no qual o tamanho da boca determina, em grande parte, o tamanho máximo e ideal a ser ingerido pelas larvas (Cunha *et al.*, 1999). Yasuda *et al.* (1960) sugeriram que a altura da boca desempenha um papel importante da captura da presa enquanto que a largura da boca limita o tamanho da presa.

A deteção do alimento e a sua posterior ingestão é desencadeada por estímulos visuais, químicos e mecânicos (Ronnestad *et al.*, 2013). Em geral, a alimentação mostra uma sequência de comportamentos: estimulação (olfato e visão), procura (depende da estratégia de alimentação da espécie), absorção do alimento e ingestão (estímulos químicos) (Barata *et al.*, 2009).

Durante a primeira alimentação, os peixes dependem da visão para a detecção das presas e o sucesso da captura das presas depende da idade das larvas, o seu tamanho, capacidade natatória e fisiológica (Blaxter, 1986; Rocha *et al.*, 2008). Para além disso, a larva depende do movimento da presa para induzir uma resposta de alimentação (Langdon, 2003; Rasdi *et al.*, 2014). Para isso é necessário criar uma pequena turbidez no tanque para variar o movimento das partículas e assim estimular o movimento das larvas (Langdon, 2003). Existem poucos estudos sobre o efeito dos copépodes no comportamento dos peixes, particularmente em relação à alimentação e ao comportamento natatório dos mesmos (Hunt von Herbing *et al.*, 2000). As observações comportamentais, testes de comportamento, têm sido úteis na compreensão de padrões de seleção das presas (Grageda *et al.*, 2008).

No geral, a visão desempenha o papel mais importante na detecção de presas, no qual a cor do alimento é essencial para a ingestão (Cahu *et al.*, 2001; Ronnestad *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Para além da cor do alimento, a intensidade da luz e a cor do tanque também são factores importantes para a ingestão (Cahu *et al.*, 2001), no qual vai aumentar a estimulação visual para a detecção da presa (Langdon, 2003). No caso dos peixes planos, principalmente *Sole sp.*, o sistema olfativo também é importante para a detecção de presas (Geffen *et al.*, 2007).

A disponibilidade de alimento também é um fator importante nos primeiros estágios. Um aumento na densidade de presas afeta diretamente a ingestão (Yúfera *et al.*, 2007). Encontram-se larvas maiores e mais ativas quando a densidade de presas é baixa, havendo uma maior digestão, mas, por outro lado, quando existe uma elevada densidade de presas, existe um maior ingestão, mas a digestão é pouco eficiente e conseqüentemente existe uma menor mortalidade (Parra *et al.*, 2000).

A ingestão é iniciada com a abertura da boca. No início da alimentação, o tamanho da presa é um dos factores mais importantes, no qual preferem presas com tamanhos menores, apesar de ingerirem presas com tamanho semelhante ao tamanho da boca (Yúfera *et al.*, 2007). Durante os primeiros dias de alimentação, as larvas podem ingerir acima de 100% do seu próprio peso (Darias, 2005). Depois, a ingestão tende a diminuir com o desenvolvimento, ocorrendo uma digestão mais eficiente (Yúfera *et al.*, 2007).

É particularmente fácil verificar a ingestão de partículas pelas larvas através da observação do estômago e trato digestivo ao microscópio ótico (Cahu *et al.*, 2001). Yufera *et al.*

(1995) propuseram um método com base no número de partículas encontradas no estômago e trato digestivo, para quantificar a taxa de ingestão das larvas.

As larvas de peixes marinhos apresentam geralmente uma capacidade de digerir baixa e/ou absorvem nutrientes mais complexos e apresentam taxas de crescimento elevadas, normalmente de 10 a 20%/dia (Conceição *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2008b). Como as larvas têm um elevado potencial de crescimento, apresentam elevados requisitos de proteínas e aminoácidos essenciais (Meeren *et al.*, 2007), alimentando-se de forma contínua e, por conseguinte, a ingestão de nutrientes é elevada (Hamre *et al.*, 2013). Para além disso, na maioria dos peixes marinhos, o alimento deve ser rico em ácidos gordos insaturados (HUFA), principalmente EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico) que são considerados essenciais às larvas de peixes marinhos e devem estar presentes na dieta para garantir o seu crescimento e desenvolvimento normais (Takeuchi, 2001; Santos, 2005; Olivotto *et al.*, 2010a). Baixos valores de ácidos gordos, principalmente poliinsaturado n-3, resultam na diminuição da saúde da larva em geral, provocando problemas no crescimento (Furuita *et al.*, 1999; Copeman *et al.*, 2002; Olivotto *et al.*, 2010b), no desenvolvimento do sistema nervoso central e visual (Sargent *et al.*, 1999), na pigmentação (Copeman *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2003) na natação e actividade de alimentação (Benitez-Santana *et al.*, 2007).

Os principais organismos utilizados como alimento vivo no cultivo larvar de peixes marinhos são os rotíferos e artémia (Mckinnon *et al.*, 2003). Isto deve-se à facilidade de produção destes organismos com uma elevada biomassa (Almeida, 2006; Piccinetti *et al.*, 2014a) e permanecem vivos e acessíveis durante mais tempo (Slembrouck *et al.*, 2009). No entanto, estes organismos não possuem todos os requisitos nutricionais essenciais às larvas, sendo necessário o seu enriquecimento com microalgas e emulsões (Bell *et al.*, 2003) e, para além disso, são caros de produzir (Slembrouck *et al.*, 2009).

Nos últimos anos o uso de *Artemia spp.* tem causado algumas perturbações à aquacultura, devido à reduzida disponibilidade de cistos, em função da limitação de locais para a sua produção e processamento (Thomaz *et al.*, 2004) que contribuem para a queda de produção, tornando os preços mais elevados, conforme a procura (Lavens *et al.*, 2000). Além disso, existe uma considerável variação na qualidade dos cistos quanto à taxa de eclosão e ao valor nutricional do náuplio eclodido (Sorgeloos *et al.*, 1992). Por outro lado, o declínio de cistos de *Artemia spp.* no Great Salt Lake (Utah) está a tornar-se numa preocupação

(Piccinetti *et al.*, 2012), resulta numa escassez de cistos e o aumento do preço dos mesmos, fenómeno conhecido por A Crise da Artémia (Sorgeloos, 2000). Por estas razões, têm sido realizados vários estudos para encontrar um alimento vivo, que seja ilimitado e que apresente as características necessárias para as larvas de peixes marinhos, podendo mesmo melhorar a qualidade das espécies cultivadas (Piccinetti *et al.*, 2012).

1.1.1 - Desempenho larvar

O comportamento alimentar dos peixes é complexo e tem sido extensivamente estudado na aquacultura (Ronnestad *et al.*, 2013). As várias respostas comportamentais têm sido associadas aos métodos de alimentação, hábitos de alimentação, frequência de alimentação, os mecanismos de deteção de alimentos e preferências alimentares (Millot *et al.*, 2009). Para além destes fatores, os ambientais também têm uma elevada importância, tais como a luz, fotoperíodo, velocidade da água, predação e também perturbações provocadas pelo Homem (Lall *et al.*, 2009).

O comprimento e o peso da larva são as primeiras características externas que permitem aferir sobre o estado nutricional das larvas. A mortalidade e o crescimento das larvas estão intimamente relacionados para determinar a sobrevivência (Dou *et al.*, 2003). A condição nutricional das larvas é um dos principais fatores que afeta a sobrevivência e o crescimento (Tanaka *et al.*, 2008). Tudo depende de uma alimentação adequada e equilibrada nas fases iniciais do desenvolvimento do peixe (Slembrouck *et al.*, 2009). Larvas com uma má condição nutricional são mais vulneráveis à predação, doenças, condições ambientais desfavoráveis e, também, são menos eficientes na procura de alimento (Tanaka *et al.*, 2008).

A análise do ARN e ADN fornece vários índices úteis para estimar o tamanho, e estado das larvas de peixes (Buckley *et al.*, 1999; Caldarone *et al.*, 2001; Gwak *et al.*, 2003a; Tanaka *et al.*, 2008), podendo ser utilizado como um índice de crescimento dos peixes. Três dos índices mais utilizados são a concentração de ADN/mg, a relação de ARN/ADN e índice residual de ARN (Caldarone *et al.*, 2001). A relação ARN/ADN é um dos índices bioquímicos mais utilizados em estudos de crescimento e condição larvar (Silva *et al.*, 2014).

Os ácidos nucleicos desempenham um papel importante no crescimento e desenvolvimento do organismo. A quantidade de ADN, ácido desoxiribonucleico, principal constituinte do núcleo, é um índice do número de células ou da biomassa, permanece normalmente estável nas células somáticas, independentemente da situação alimentar e ambiental. Por outro lado, a quantidade de ARN, ácido ribonucleico, principalmente o ribossômico, está intimamente relacionado com a taxa de síntese de proteínas (Gwak *et al.*, 2003a e b), que varia de acordo com a disponibilidade de alimento (Chícharo *et al.*, 2007), pelo que a quantificação deste parâmetro permite avaliar a capacidade do organismo em sintetizar proteína, logo estimar o crescimento. Tecidos com uma elevada taxa de crescimento exibem elevadas concentrações de ARN (Chícharo *et al.*, 2007).

Organismos em boas condições e com um crescimento ótimo tendem a ter índices de ARN/ADN mais elevados do que os organismos que se desenvolvem mais lentamente e que apresentam más condições (Chícharo *et al.*, 2007), logo baixa síntese proteica (Vieira *et al.*, 2014). Os organismos em boas condições nutricionais apresentam melhores habilidades natatórias e maior capacidade de resposta à predação (Silva *et al.*, 2014).

Existem vários métodos para quantificar os níveis de ácidos nucleicos nas larvas de peixes, mas o mais recente é o método fluorométrico, usando corantes fluorescentes (Caldarone *et al.*, 2001), como o Gel Red. São efetuadas duas leituras, uma com o Gel Red que permite medir a fluorescência total dos ácidos nucleicos e na segunda leitura, é utilizado a ARNase que mede a fluorescência do ADN. A fluorescência do ARN é calculada a partir da diferença das duas leituras (Chícharo *et al.*, 2007). O método espectrofluorométrico exige a construção de retas padrão para calcular as concentrações de ADN e ARN. Este método apresenta várias vantagens, incluindo a capacidade de analisar larvas de pequenas dimensões (Caldarone *et al.*, 2001).

ADN/peso seco (mg) é outro índice derivado dos ácidos nucleicos que tem sido utilizado para avaliar o estado nutricional, uma vez que o peso das células diminuem enquanto a concentração de ADN se mantém constante durante uma redução na condição nutricional (Bergeron, 1997). O índice de ADN/peso seco aumenta quando a condição diminui, uma vez que há mais células para o mesmo tecido (Silva *et al.*, 2014).

Vários estudos defendem que haja uma certa precaução na utilização destes dois índices, devido à sua dependência do tamanho da larva. Aconselham a remover o efeito alométrico, usando um índice residual baseado a partir do conteúdo de ARN e uma variável independente

como o comprimento ou peso seco (Índice residual ARN) (Chícharo *et al.*, 1998, 2008; Silva *et al.*, 2014).

1.2 – Copépodes

Os Copepoda constituem o grupo mais diversificado de pequenos crustáceos sendo, possivelmente, a classe de crustáceos com maior número de indivíduos na biosfera. Colonizam todos os habitats aquáticos e integram uma fracção importante da biomassa zooplânctónica contribuindo com aproximadamente 50% da biomassa total, tanto nas águas oceânicas como nas epicontinentais. A representatividade deste grupo torna-os muito importantes nas cadeias alimentares e nas relações ecológicas (Okumura, 2011).

Segundo Bell *et al.* (2003), os copépodes são considerados o melhor alimento para as larvas de várias espécies marinhas, especialmente de linguado. Os copépodes predominam no zooplâncton em termos de abundância e biomassa (Das *et al.*, 2012) e constituem a ligação vital entre os produtores primários e os peixes. No entanto, para desenvolver um protocolo alimentar à base de copépodes é necessário conhecer a biologia do organismo, para assegurar um cultivo larvar de sucesso (Rasdi *et al.*, 2014).

Sob o ponto de vista nutricional, uma dieta à base de rotíferos e artémia pode ser totalmente substituída, ou complementada com o uso de copépodes vivos (Almeida, 2006), uma vez que em relação ao perfil de ácidos gordos, estes organismos apresentam níveis adequados às necessidades das larvas de peixes e, são uma excelente fonte de ácidos gordos Insaturados (HUFAs) e Poliinsaturados (PUFAs) (McKinnon *et al.*, 2003; Evjemo *et al.*, 2003; Ajiboye *et al.*, 2011; Piccinetti *et al.*, 2014a), principalmente DHA, que influencia a resistência ao stress nas larvas (Molejón *et al.*, 2003), quando comparados com os rotíferos e artémia (Grageda *et al.*, 2008). Para além disso, são uma excelente fonte de enzimas digestivas desempenhando um papel importante na atividade digestiva das larvas (Gopakumar *et al.*, 2009) e oferece uma variedade de tamanhos, espécies e qualidades (Molejón *et al.*, 2003).

O bom desempenho dos copépodes como alimento vivo, está relacionado com vários fatores: são facilmente digeridos (Luizi *et al.*, 1999), no qual o tempo de retenção no intestino é maior quando comparados com as artémias (Pedersen *et al.*, 1989; Olivotto *et al.*, 2010b), isto

reflete o que ocorre no meio natural, no qual os copépodes são os mais importantes conectores entre os produtores primários e os consumidores nas cadeias tróficas marinhas (Calliari *et al.*, 2008; Gopakumar *et al.*, 2009); reduzidas dimensões, adequado ao tamanho da boca das larvas (Gopakumar *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2012; Vu *et al.*, 2014), pois em muitas espécies de peixes os rotíferos tipo S são grandes para a boca da larva (Cahu *et al.*, 2001; Molejón *et al.*, 2003).

Estudos recentes demonstraram que a utilização de copépodes na dieta de larvas de várias espécies de peixes, pode melhorar a sobrevivência larvar, o crescimento (Evjemo *et al.*, 1997; Molejón *et al.*, 2003; Støttrup *et al.*, 2003; Piccinetti *et al.*, 2012; Piccinetti *et al.*, 2014a; Rasdi *et al.*, 2014), a pigmentação, reduzir o tempo de metamorfose (Evjemo *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2010b; Piccinetti *et al.*, 2012), melhorar a qualidade dos ovos e larvas (Mazorra *et al.*, 2003; Grageda *et al.*, 2008) e a natação e actividade alimentar (Olivotto *et al.*, 2008a), havendo um interesse crescente no cultivo intensivo de copépodes com intuito da sua utilização em aquicultura, nomeadamente sob a forma de alimento vivo para o cultivo larvar (Buttino *et al.*, 2012; Rasdi *et al.*, 2014).

A utilização de copépodes na alimentação larvar é uma alternativa viável, porém o seu uso é bastante restrito (Bell *et al.*, 2003; Almeida, 2006). Actualmente, a maioria dos copépodes utilizados são provenientes de cultivos semi-intensivos ou diretamente da natureza (Almeida, 2006), por isso a disponibilidade destes organismos é restrita em determinados períodos do ano (Evjemo *et al.*, 1997). Porém, estas formas de obtenção podem prejudicar o cultivo larvar, uma vez que não existe controlo sobre as espécies de zooplâncton introduzidas nos cultivos, logo não há seleção do perfil nutricional (Almeida, 2006) e também pode existir risco de introdução de vectores de doenças e predadores (Knuckey *et al.*, 2005).

Uma solução para este problema, é a utilização de copépodes preservados e congelados, um novo produto que permite manter a composição bioquímica ao longo do tempo (Piccinetti *et al.*, 2012). Os copépodes são recolhidos quando apresentam o maior valor nutricional, sendo posteriormente processados (Planktonic AS, Noruega), armazenados e facilmente utilizados pelas maternidades ao longo do ano, aumentando o crescimento e a sobrevivência larvar. Para além de poderem ser fornecidos diretamente às larvas, também podem ser utilizados como ingredientes de microdietas. Por outro lado, apresentam desvantagens, pois os copépodes preservados/congelados são partículas inertes, não apresentando movimento.

1.3 - Protocolos alimentares

A avaliação de diferentes protocolos alimentares e impacto destes na qualidade larvar contribui para aumentar o conhecimento da produção em aquacultura de diferentes 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 para o desenvolvimento e crescimento larvar.

A otimização de protocolos alimentares com base em presas vivas para larvas de peixes marinhos requer um bom conhecimento sobre o comportamento alimentar e os fatores de detecção, aquisição e processamento do alimento (Ronnestad *et al.*, 2013), que irá melhorar as taxas de crescimento e a sobrevivência (Ronnestad *et al.*, 2013) e assim melhorar a qualidade larvar e juvenil. É necessário ter um bom conhecimento dos requisitos nutricionais das larvas ao longo do seu desenvolvimento, para otimizar os protocolos alimentares, mas é difícil identificar as exigências nutricionais, visto que durante o seu desenvolvimento, as larvas apresentam diferentes exigências (Hamre *et al.*, 2013). Identificar a sequência temporal ótima dos diferentes tipos de presa (normalmente rotíferos, náuplios de artémia e metanáuplios de artémia) durante o desenvolvimento, comportamento alimentar, tem sido o aspeto mais estudado (Ronnestad *et al.*, 2013). Também tem sido muito estudado a quantidade de alimento que deve de ser administrado e quantas vezes por dia.

Boujard *et al.* (1992) sugeriram que os ritmos de alimentação podem melhorar a eficiência da produção. A frequência de alimentação e o número de refeições diárias afetam a absorção e assimilação de nutrientes e, portanto, o crescimento das larvas de peixe (Navarro-Guillén *et al.*, 2015). Para além disso, a utilização de estratégias de alimentação adequadas é crucial durante a fase larvar, quando a alimentação é inferior ao ideal, vai ter um impacto não só no crescimento, mas também sobre a sobrevivência (Slembrouck *et al.*, 2009). Para evitar um mau crescimento e elevadas mortalidades, é necessário adequar a densidade, tipo e tamanho de presa fornecida de acordo com o desenvolvimento das larvas, principalmente ao nível dos órgãos sensoriais, tamanho da boca e capacidade digestiva (Planas *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 2009).

O início da alimentação exógena é uma fase crítica num cultivo larvar, estando associado a elevada mortalidade. Uma vez que as reservas vitelinas acabaram, a privação de alimento ou

alimentos com má qualidade podem causar uma grave redução na sobrevivência das larvas (Ma *et al.*, 2013; Piccinetti *et al.*, 2014b; Rasdi *et al.*, 2014). Por outro lado, ao administrar uma elevada densidade de presas não é benéfico para um cultivo larvar, pois pode estimular uma ingestão de alimentos excessiva e reduzir a eficiência digestiva (Ma *et al.*, 2013).

São várias as dificuldades na criação de dietas artificiais para os primeiros estágios larvares, devido a vários fatores, mas principalmente porque o sistema digestivo das larvas não está totalmente desenvolvido e pode não possuir enzimas digestivas suficientes para a digestão da dieta (Cahu *et al.*, 2001; Langdon, 2003). Para além disso, no início da alimentação exógena, a capacidade natatória na procura de alimento não está totalmente desenvolvida, portanto, a disponibilidade de alimento é fundamental para a sobrevivência (Papandroulakis *et al.*, 2002).

Não é possível obter as necessidades nutricionais a partir de análises/testes a juvenis, pois durante o desenvolvimento larvar ocorre uma alteração nos mecanismos de digestão e absorção, logo os requisitos nutricionais também mudam (Cahu *et al.*, 2001). Em particular, as larvas requerem uma dieta com elevados níveis de energia, rica em fosfolípidos, enquanto que os juvenis não necessitam, isto deve-se ao facto de o sistema digestivo nas larvas apresentarem uma elevada capacidade de assimilação de ácidos gordos (Piccinetti *et al.*, 2014b). Por isso, uma dieta formulada para sustentar um bom crescimento em juvenis induz a uma taxa de crescimento e de sobrevivência menor nas larvas (Cahu *et al.*, 2001).

Primeiro é necessário conhecer a fisiologia digestiva e como esta pode ser afetada, antes de substituir parcialmente o alimento vivo por dietas inertes, desde a primeira alimentação (Ribeiro *et al.*, 2008; Mai *et al.*, 2009). A alimentação de uma dieta inerte se não for controlada pode diminuir a qualidade da água e, por sua vez, contribuir para uma mortalidade elevada e um baixo crescimento (Rosenlund *et al.*, 1997; Slembrouck *et al.*, 2009).

1.4 – *Solea senegalensis*

O Linguado do Senegal, *Solea senegalensis*, é considerada a espécie de peixe plano mais promissora para a aquacultura no Mediterrâneo (Rema *et al.*, 2008; Navarro-Guillén *et al.*, 2015), adapta-se bem a águas temperadas (Martínez *et al.*, 1999). Devido ao seu elevado interesse para aquacultura, elevado preço e grande procura no mercado (Navarro-Guillén *et al.*,

2015), o seu desenvolvimento biológico tem sido muito estudado (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). Para além disso, é uma boa espécie para ser estudada, principalmente durante a fase larvar, apresenta um elevado crescimento, especialmente na síntese de proteínas e sofre alterações morfológicas complexas num curto espaço de tempo (Piccinetti *et al.*, 2014b).

O desenvolvimento larval desta espécie, apesar de curto (Piccinetti *et al.*, 2012), é caracterizada por uma metamorfose complexa que inclui mudanças dramáticas na anatomia, ocorre uma rotação de 90° da posição do corpo, a migração de um olho para o lado superior ocular e aparecimento de pigmentação, fisiologia e comportamento, alteração da natação e dos hábitos alimentares (Martínez *et al.*, 1999; Fernández-Díaz *et al.*, 2001; Geffen *et al.*, 2007; Navarro-Guillén *et al.*, 2015), sendo uma espécie modelo para estudar a fisiologia nutricional larval (Conceição *et al.*, 2007). Por outro lado, a metamorfose pode ser afectada pela alimentação e condições nutricionais, logo a partir dos 2 DAE, após a abertura da boca, (Yúfera *et al.* 2005; Villalta *et al.* 2008; Engrola *et al.*, 2009a,b; Engrola *et al.*, 2010; Morais *et al.*, 2014), como a quantidade de vezes que o alimento é administrado e em que altura do dia, afetando também o desenvolvimento da pigmentação (Lund *et al.*, 2010; Piccinetti *et al.*, 2012).

Na fase pré-metamórfica, as larvas pelágicas consomem mais durante o dia, devido ao baixo grau desenvolvimento dos órgão sensoriais (Navarro-Guillén *et al.*, 2015). Após a metamorfose, as larvas assentam no substrato e ocorre a mudança de larvas pelágicas para bentónicas, tornam-se mais activas durante a noite (Barata *et al.*, 2009), alterando os seus hábitos alimentares e a fisiologia digestiva (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). Devido a estas mudanças de hábitos alimentares, existem elevadas taxas de mortalidade aquando da passagem de alimento vivo para alimento inerte (Ribeiro *et al.*, 1999; Conceição *et al.*, 2007; Santos, 2014).

As larvas de *Solea senegalensis* apresentam uma elevada capacidade de digerir presas vivas desde o início da alimentação exógena, quando comparado com outras espécies marinhas, apresentando assim enzimas digestivas antes da abertura de boca (Navarro-Guillén *et al.*, 2015), o que reflete elevadas taxas de crescimento (Conceição *et al.*, 2007). No entanto, estudos demonstram que durante a metamorfose a alimentação não é tão eficiente (Yúfera *et al.*, 1999) e a ingestão de presas e a ração diária (alimento ingerido em função do peso do peixe) é menor no início da metamorfose (Geffen *et al.*, 2007). Existe um aumento na quantidade de energia antes da metamorfose, seguindo um decréscimo no fim da metamorfose (Yúfera *et al.*, 1999).

Os protocolos alimentares utilizados no cultivo larvar do linguado ainda se baseiam na utilização de presas vivas durante o período antes da metamorfose, ocorre entre os 12 e os 20 DAE (dias após eclosão), quando elas já podem ser gradualmente substituídas por metanúplios de artémia congelados (Pousão-Ferreira, 2009).

2 – Objetivo

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um protocolo alimentar à base de copépodes congelados, em substituição das presas habitualmente utilizadas. Como objectivo secundário pretende-se avaliar o potencial dos copépodes congelados serem utilizados nas microdietas de adaptação ao alimento inerte.

3 - Materiais e métodos

3.1 – Avaliação do comportamento alimentar

3.1.1 – Coloração dos copépodes congelados

Como os copépodes congelados não possuem movimento é importante desenvolver metodologias que tornem a partícula mais atrativa para a larva, neste caso através da coloração. Realizaram-se três testes (Figura 3.1), no qual se testou a quantidade de corante necessário e o tempo de atuação do mesmo, antes de se adicionar água.



Figura 3.1 – Esquema dos testes de coloração dos copépodes congelados.

Pesou-se 1 g de copépodes, adicionou-se o corante alimentar vermelho (Figura 3.2), o qual se deixou a atuar e adicionou-se água salgada. Aos 10, 20, 30, 40, 60 e 120 minutos e 24 horas, recolheram-se amostras de copépodes. Estas amostras foram observadas à lupa e verificou-se a intensidade da cor e a duração da mesma.



Figura 3.2 – Corante alimentar vermelho utilizado.

3.1.2 - Observação da ingestão de partículas

O comportamento alimentar da larva baseou-se na observação à lupa da presença ou ausência de partículas do trato digestivo, enquanto a larva não apresentava pigmentação excessiva. O comportamento foi testado com copépodes congelados corados, não corados e com *Artemia* spp. viva.

Os testes foram realizados em diferentes volumes, em copos de 500ml e nas incubadoras de 200L (Tabela 3.1), com larvas de idade 9-12 DAE (idade). Os peixes foram mantidos em jejum durante toda a noite.

Os testes realizados nos copos, após a introdução dos peixes e do alimento foram tapados e todos os indivíduos foram observados à lupa, passado 30 min. Nas incubadoras, foi fornecido o alimento e ao fim de 20, 30 e 40 minutos, recolheram-se 10 indivíduos para serem observados à lupa, verificando-se apenas se havia alimento ou não no trato digestivo das larvas. Estes dados foram utilizados para calcular a taxa de ingestão, número de larvas com presas no trato digestivo sobre o número total de larvas observadas.

Tabela 3.1 - Resumo dos testes de ingestão realizados, tanto para os copos de 500mL como para as incubadoras 200L, com os diferentes parâmetros.

	Copo (500ml)	Incubadora (200L)
Número de larvas	50 e 30	10
Densidade alimento	2 part/ml	10 part/ml
Tempo de verificação	30 min	Aos 20, 30 e 40 min
Idade	9- 12 DAE	

3.1.3 – Observação do comportamento alimentar das larvas de linguado a diferentes alimentos

As observações do comportamento foram feitas em larvas, entre os 15-18 DAE e em post-larvas, entre os 27-30 DAE. Todos os peixes ficaram em jejum durante a noite. Foram utilizados tabuleiros brancos (18cm x 25cm x 5,5cm) com 1,5L de água salgada, a 17±0,5°C. No tabuleiro colocou-se uma divisória, para separar os peixes do alimento (Figura 3.3). Colocaram-se 2, 10 e 20 larvas (diferentes testes) num lado do tabuleiro e do outro o

alimento. Testou-se com copépodes congelados corados e com *Artemia spp.* congelada. Em cada observação, foi dada a mesma quantidade de alimento. Após a adição do alimento, retirou-se a divisória e observou-se o tempo de reação da larva (foco), o movimento e o comportamento dos peixes para a presa antes da ingestão e o número de larvas que ingeriram o alimento.



Figura 3.3 – Tabuleiro utilizado para o teste de observação do comportamento, com a divisória.

3.2 - Ensaio larvar

3.2.1 - Material Biológico

Os ovos de linguado, *Solea senegalensis*, foram obtidos através de postura natural dos reprodutores mantidos em cativeiro na EPPO, Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. Os ovos foram incubados a $18\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em incubadoras cilíndricas de 200L, com água salgada filtrada por filtro de cartunho, durante dois dias.

3.2.2 - Cultivo larvar

Após a eclosão, foram feitas contagens para estimar o número de larvas eclodidas, que depois foram igualmente divididas pelos 9 tanques cilíndricos (200L) a uma densidade de 25larvas L^{-1} , correspondendo à fase pelágica do ensaio (Figura 3.4). As larvas de linguado foram mantidas num sistema aberto de recirculação de água com um fluxo entre os 10%/h e 20%/h. Diariamente os parâmetros físico-químicos eram medidos, tais como a temperatura e oxigénio dissolvido, e também o caudal. Ao longo do ensaio, a temperatura da água foi de

17,8±1,5°C, a salinidade de 35±1 psu, o oxigênio dissolvido (DO) de 7,0±1 mg L⁻¹ e com uma saturação de 93±4%. O fotoperíodo foi de 14 horas de luz e 10 horas escuro.



Figura 3.4- Tanques cilíndricos 200L utilizados para a fase pelágica.

Aos 23 DAE as pós-larvas, foram transferidos para os tanques retangulares azuis de 35L (69 cm x 45cm), com uma densidade de 0,27 ind m⁻², fase bentônica (Figura 3.5). Foi utilizado um menor número de indivíduos nesta segunda fase devido ao menor volume do sistema de cultivo. O fluxo de renovação da água aumentou, variando entre os 65%/h e os 125%/h. Os parâmetros físico-químicos foram os mesmos, exceto o fotoperíodo, a luminosidade diminuiu, sendo 11 horas de luz e 13 horas de escuro.



Figura 3.5- Tanques retangulares 35L utilizados para a fase bentônica.

As larvas eram alimentadas quatro vezes por dia até aos 22 DAE, após essa idade e até ao fim do ensaio as larvas foram alimentadas cinco vezes por dia. Nesta fase, a quantidade de

alimento era calculada tendo em conta o número de peixes existentes no tanque, a média do peso seco por tanque, a percentagem de crescimento diário e o coeficiente de eficiência de conversão.

Diariamente eram realizadas rotinas diárias de limpeza, no qual os tanques eram aspirados e purgados, uma vez por dia, e os filtros dos tanques lavados com água doce duas vezes por dia para não haver colmatção dos mesmos. Os filtros do sistema eram lavados duas vezes por semana. Após a limpeza dos tanques eram contabilizados o número de peixes mortos. Até aos 10 DAE mantiveram-se os filtros de 150µm durante o dia e noite, só aos 11 DAE é que se trocou-se para 500µm durante a noite, para que houvesse uma melhor renovação e limpeza dos tanques. Após 19 DAE e até ao fim do ensaio utilizaram-se apenas filtros de 500µm, tanto de dia como durante a noite. Após a transferência dos peixes (23 DAE) realizaram-se, uma vez por semana, tratamento com peróxido de hidrogénio (10ppm).

3.2.3 – Protocolos alimentares

Neste ensaio pretendeu-se testar 2 protocolos alimentares (Figura 3.6), utilizando copépodes congelados em diferentes proporções, os quais foram comparados com o protocolo Standard para linguado utilizado na EPPO.

Os protocolos alimentares consistiram em:

Protocolo alimentar **Controlo** (Figura 3.6A): utilizou-se apenas alimento vivo durante a fase pelágica, *Brachionus spp.* e *Artemia spp.*, que serve de comparação para os outros dois protocolos, seguindo o protocolo Standard da EPPO para larvas de linguado. Durante a fase bentónica (23 aos 40 DAE), as larvas foram alimentadas com metanúplios de artémia congelada. A partir dos 40 DAE começou o desmame e foram alimentadas com ração experimental, formulada e produzida pela em presa Sparos, com a incorporação de 10% de copépodes.

Protocolo alimentar **50:50** (Figura 3.6B): Neste protocolo as larvas de linguado foram alimentadas com 50% de alimento vivo e 50% de copépodes congelados. Desde a abertura de boca, 2 DAE, até aos 10 DAE foram alimentadas com rotíferos enriquecidos, com uma densidade de 5 rotíferos/ml, por dia. Aos 6 DAE, foram introduzidos os metanúplios de

artémia (instar II-III), até aos 21 DAE, com uma densidade de 1artémia/ml, por dia. Dos 21 aos 39 DAE foram fornecidos metanúplios de artémia congelado, com a mesma densidade. Os copépodes congelados corados de classe 100-200µm foram introduzidos aos 4 DAE até aos 36 DAE, com uma densidade 7copépodes/ml, por dia. No dia 37 DAE iniciou-se a administração de copépodes de classe 300-400µm, que perdurou até aos 39 DAE, com uma densidade de 4copépodes/ml, por dia.

Protocolo alimentar **Agressivo** (Figura 3.6C): Neste protocolo alimentar não foram introduzidos rotíferos, iniciou-se a alimentação com copépodes e náuplios de artémia (instar I). Após a abertura de boca, 2 DAE e até aos 36 DAE foram administrados copépodes congelados corados de classe 100-200µm, com uma densidade de 9 copépodes/ml/dia. Os náuplios de artémia foram iniciados aos 2 DAE até aos 8 DAE, com uma densidade média de 0,5 artémias/ml/dia. Dos 8 DAE até aos 22 DAE foram introduzidos os metanúplios de artémia (instar II-III), com densidade média de 0,4 artémias/ml/dia. Dos 36 aos 39 DAE foram introduzidos copépodes congelados de classe superior, 300-400µm, com a mesma densidade.

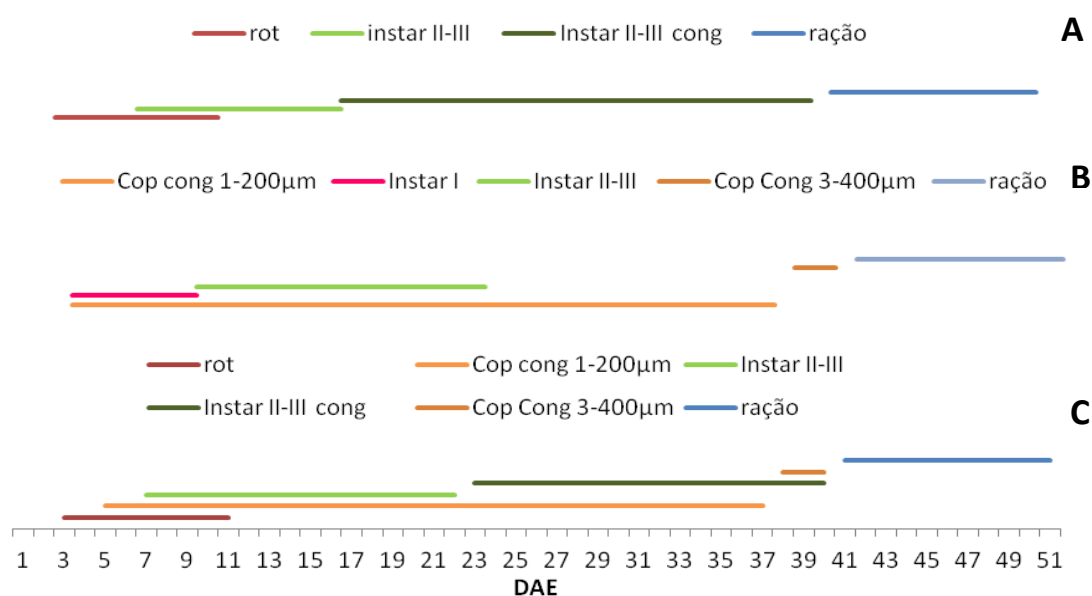


Figura 3.6 – Protocolos alimentares do ensaio larvar: A) protocolo Controlo; B) protocolo 50:50; C) protocolo Agressivo. DAE- Dias apos eclosão.

Após os 22 DAE até aos 39 DAE, quando ocorreu a transferência para os tanques retangulares, no protocolo controlo foram introduzidos 100% metanúplios de artémia congelados, o protocolo Agressivo 100% copépodes congelados e o protocolo 50:50 foi 50%copépodes congelados-50% metanúplios de artémia congelados.

Desde a abertura de boca até aos 21 DAE foram introduzidos 2 litros de mistura de microalgas (*Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*, numa proporção 1:1), 1 L de manhã, antes da primeira refeição e o outro antes da última refeição.

Sendo a adaptação ao alimento inerte uma fase crítica no cultivo do linguado, pretendeu-se avaliar a condição nutricional proporcionada pelos protocolos alimentares durante a fase larvar, alimentando dos 40 aos 50 dias todos os grupos com uma ração experimental (200µm) com a incorporação de 10% de copépodes, formulada e produzida pela empresa SPAROS (Olhão,Portugal).

3.2.4 - Preparação dos copépodes congelados

Os copépodes congelados encontravam-se numa embalagem opaca, selados. Cada vez que se abria um saco novo procedia-se à contagem das partículas para se determinar a densidade do mesmo. Pesava-se 1g de copépodes e diluía-se em 50ml de água salgada misturando bem. Em seguida, com a ajuda de uma pipeta de vidro retirava-se um 1ml e procedia-se à contagem dos copépodes, repetindo este processo 4 vezes. Após isso, calculava-se a média das partículas por grama, sendo este valor utilizado para calcular a quantidades de copépodes a utilizar por refeição.

Para cada protocolo era pesado a quantidade estipulada, por refeição. O saco de copépodes era colocado no congelador até á próxima refeição.

Após a coloração dos copépodes e antes de serem administrados aos tanques, os copépodes eram lavados, cinco vezes por dia e para os dois protocolos alimentares aplicados.

3.2.5 - Preparação do alimento vivo

Os rotíferos (*Brachionus spp.*) e artémia (náuplios e metanáuplios de *Artemia spp.*) foram produzidos na EPPO. Os rotíferos foram produzidos pela técnica batch, de acordo com os protocolos da EPPO, de acordo com Pousão-Ferreira (2009).

Os cistos de *Artemia spp.* foram obtidos por fabricantes comerciais. Foram utilizadas duas estirpes neste ensaio, estirpe AF (480 INVE Aquaculture, Ghent, Belgium) e a estirpe EG (Artemia systems SA, Ghent, Belgium). Todos os cistos de *Artemia spp.* foram descapsulados de acordo com o protocolo descrito por Pousão-Ferreira (2009) e incubados com uma densidade de 4cistos/ml, a 27°C e forte arejamento.

Ambos os alimentos vivos, rotíferos e metanáuplios foram enriquecidos com óleo W3 (BERNAQUA), seguindo as indicações do fornecedor. Óleo W3 é uma emulsão estável tendo por base óleos de peixe refinado e fosfolipídios, é também enriquecido com vitaminas E e C, que actuam como anti-oxidantes.

As microalgas utilizadas neste ensaio foram *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*, produzidas de acordo com protocolos *Standard* da EPPO, descrito por Pousão-Ferreira (2009). A partir de stocks puros de microalga foram produzidos culturas de grandes volumes, utilizando o método batch e as práticas descritas por Pousão-Ferreira (2009).

3.2.6 – Amostragens

Durante a fase pelágica, foram amostradas larvas aos 0, 2, 6, 9, 13, 16 e 22 dias, como referido na Figura 3.7, para a determinação do comprimento total, peso seco, sobrevivência, mortalidade e índice de metamorfose n=100 (*pool* 5), n=30 (*pool* 3) e n=20. Na fase bentónica, recolheram-se pós-larvas aos 26, 33, 40 e 50 dias, em que para além dos parâmetros referidos anteriormente, também foram recolhidos os dados de peso húmido, n=20. Ao 26 DAE recolheram-se 30 larvas/tanque para aferir o peso húmido, as quais foram repostas nos tanques.

Todas as larvas recolhidas foram analisadas pela técnica RNA/DNA e quantificadas a proteína BCA.



Figura 3.7- Esquema representativo das amostragens realizadas ao longo do ensaio ao longo dos dias após eclosão (DAE).

3.3 – Componente analítica

3.3.1 - Biometria

Nas primeiras amostragens as larvas foram medidas, comprimento total, através da lupa ocular micrométrica Zeiss Stemi 2000-C (Figura 3.8). Durante este processo, cada larva foi fotografada com o auxílio da Cannon PowerShot GS 5,0 MP (Figura 3.8), incorporada na lupa ocular micrométrica. A partir dos 6 DAE observou-se o índice de metamorfose, de acordo com a tabela de Fernández-Díaz (2001)(Tabela 3.2) , através do registo fotográfico. A partir dos 33 DAE, as pós-larvas de linguado foram medidas com uma régua graduada em cm e os seus pesos húmido através da balança Kern EG620-3NM, ± 1 mg.



Figura 3.8 – Lupa ocular micrométrica Zeiss Stemi 200-C e Cannon PowerShot GS, respetivamente.

Após a medição, as larvas eram colocadas num filtro e lavadas com água destilada, durante uns segundos, para a remoção do sal (Figura 3.9), sendo depois colocadas em microtubos e congeladas em azoto líquido. Posteriormente foram liofilizadas, sendo o peso seco das larvas determinado na balança Sartorius Pro 11, $\pm 1g$.



Figura 3. 9 - Sistema de lavagem utilizado durante as amostragens.

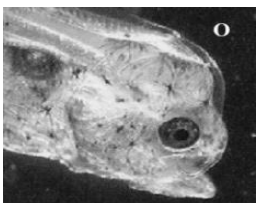

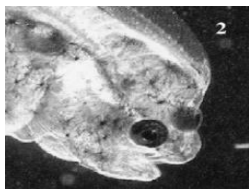
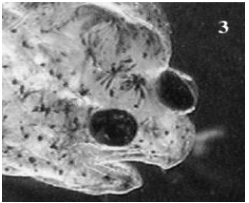
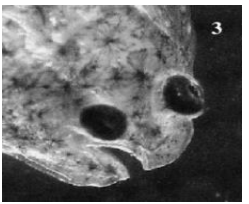

Foi determinada a taxa de crescimento relativa (TCR) através da fórmula:

$$TCR = \left(\frac{\ln(\textit{peso final}) - \ln(\textit{peso inicial})}{\textit{tempo}} \right) \times 100$$

Foi ainda calculado o Índice de Condição (IC):

$$IC = \frac{\textit{Peso}}{\textit{Comprimento Total}^3} \times 100$$

Tabela 3.2- Índice de Metamorfose descrito por Fernández-Díaz *et al.* (2001).

Fase	Aparência	Nomenclatura	Outros estudos e espécies
0		Pré-metamorfose (Simetria bilateral, com natação vertical)	<i>Scophthalmus maximus</i> – Etapa 1-3 <i>Paralichthys olivaceus</i> – pre-metamorfose
1		Início da metamorfose (início da migração do olho esquerdo, os indivíduos não são totalmente simétricos)	<i>Scophthalmus maximus</i> – 4a-4c <i>Paralichthys olivaceus</i> – F-, F
2		Metamorfose media (olho esquerdo já pode ser visto do lado direito)	<i>Scophthalmus maximus</i> – 4d <i>Paralichthys olivaceus</i> – G, H-
3a		Metamorfose media (os indivíduos mudam o seu tipo de natação e o olho continua a migrar)	<i>Scophthalmus maximus</i> – 5 a, 5 c <i>Paralichthys olivaceus</i> –H, H+
3b		Metamorfose media (olho esquerdo continua a migrar dentro do lado ocular)	<i>Scophthalmus maximus</i> – 5 a, 5 c <i>Paralichthys olivaceus</i> –H, H+
4		Fim da metamorfose (migração do olho complete e o arco orbital é claramente visível).	<i>Scophthalmus maximus</i> – 5 d <i>Paralichthys olivaceus</i> –I

3.3.2 - Técnica de ARN/ADN

A condição nutricional foi avaliada através da análise dos ácidos nucleicos, que forneceram vários índices, como o ARN/ADN, ADN/mg e ARN/mg e por larva. Os ácidos nucleicos foram medidos através do método de fluorescência adaptados para leitor de multiplacas (MFA), de Ikeda *et al.* (2007), com base no método fluorométrico sequencial de Bentle *et al.* (1981). Este método é uma modificação da fluorometria sequencial, em que o ADN e ARN numa amostra são determinados sequencialmente pela adição de DNase e RNase, utilizando GEL Red como corante fluorescente. Wagner *et al.* (1998) modificou o método fluorométrico sequencial ao MFA com placas de microtitulação de 96 poços, através da técnica de extração de sarcosil e eliminando o passo da DNase, permitindo a medição de ácidos nucleicos de várias amostras ao mesmo tempo.

O procedimento utilizado para quantificar os ácidos nucleicos nas larvas de linguado está descrito em Caldarone *et al.* (2001) e Esteves *et al.* (2000). Inicialmente as larvas foram quimicamente e mecanicamente homogeneizadas, com a adição de tampão de extração sarcosilTris (0,5%) com ultrassons (3 pulsos de 50 A durante 1 minuto). O volume de tampão de extração variou de acordo com o peso das amostras, quanto maior o indivíduo maior volume de tampão, entre os 100µl e 1000µl. Em seguida, as amostras foram agitadas durante 30 min à temperatura ambiente num misturador de vórtice equipado com um suporte múltiplo.

As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, 0,-4°C) durante 15 min. Em cada microplaca Nunclon, fundo redondo e preto, duplicou-se 25 µl de alíquota de sobrenadante das amostras e, também, duplicados de 0, 26,3, 39,5 e 52,6 µg/ml de solução padrão de ADN (λ -phagus 0,25 mg/ml, Roche) e duplicados de 0, 14,6, 29,2 e 43,8 µg/mL de solução padrão de ARN (16s-23s de E. coli 4 mg/ml, Roche). Em seguida, as retas padrão de ADN e ARN foram diluídas com tampão Tris de 0,05%, na proporção 1:10 (v:v). As amostras foram diluídas com Solução padrão Tris EDTA (110µl).

Devido à elevada fluorescência da solução RNase, foi adicionado logo antes da primeira leitura (30µl, 0,12µg/mL) em todos os poços da placa exceto na reta de ARN. Posteriormente e antes da primeira leitura, o GEL Red (30µl) foi adicionando a cada poço. A fluorescência do GEL Red foi digitalizada num leitor de multiplacas (Biotek modelo HT

sinergia SIAFRTD) e lido pelo programa Gens 1.08, com 365 nm (excitação) e 590 nm (emissão). (Primeira leitura da fluorescência total de ARN e ADN).

Após a primeira leitura, a placa foi a incubar 30 minutos a 37°C e lido outra vez, pelo mesmo programa. A concentração de ADN foi calculada diretamente através da curva padrão. A concentração de ARN foi determinada indiretamente através da diferença das duas leituras, fluorescência ADN (segunda leitura) e fluorescência total (primeira leitura).

3.3.3 - Determinação e quantificação colométrica da Proteína Total

Este método baseia-se na redução dos iões Cu^{2-} pela proteína. O ião Cu^+ é detetado pela conversão numa substância de cor violeta por reação com o ácido bicinconinico. Primeiro, preparou-se os padrões de proteína. A solução padrão de proteína usada foi a BSA – bovine serum albumine 1mg/ml. A curva padrão foi feita partido da solução stock e fazendo-se diluições sequenciais de 1:2 até ter no mínimo 5 pontos da reta. Em resumo, da solução stock BSA (1mg/ml água destilada) retirou-se 100 μl para o microtubo 6, desse retirou-se 50 μl e transferiu-se para o microtubo 5 n qual se juntou 50 μl de água destilada e agitou-se. Repetiu-se o procedimento até chegar ao microtubo 2 (Tabela 3.3).

Em seguida, preparou-se a microplaca (transparente). Adicionou-se 10 μl de alíquota da amostra e pipetou-se 25 μl de cada padrão (incluído o branco), em duplicado. Posteriormente, preparou-se a solução de trabalho, misturou-se 50 partes de Ácido Bicinconinico com 1 parte de 4% de sulfato pentahidratado em água. Adicionou-se 200 μl da solução de trabalho a cada poço na microplaca e tapou-se com papel de alumínio e agitou-se a mesma. Foi a incubar a 37°C durante 37 min. Após isso, deixou-se arrefecer e mediu-se a absorvância a 562 nm, no Multiskan Go Microplate Spectrophotometer. Verificou-se se alguma amostra ultrapassou a reca padrão. Subtraiu-se a absorvância do branco a todas as outras leituras e determinou-se a concentração da proteína com base na equação de reta obtida com os padrões.

Tabela 3.3 – Tabela com a Concentração ($\mu\text{g/ml}$) e volumes (μl) de BSA e de Solução diluente utilizados neste ensaio.

Microtubo	1	2	3	4	5	6
Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	0	62,5	125	250	500	1000
BSA (μl)	0	6,25	12,5	25	50	100
Solução (μl)	100	93,75	12,5	75	50	0

3.4 – Análise Estatística

Sobrevivência, mortalidade, comprimento total, peso húmido e peso seco foram expressos pela média aritmética com os seus respetivos desvios padrão. Após isso, procedeu-se à construção de gráficos e tabelas com o auxílio do programa Microsoft office Excel. Os resultados da análise de ARN/ADN, após a leitura no leitor de multiplacas, foram analisados pelo programa office Excel, no qual foram construídos os gráficos e as retas padrão correspondentes.

A comparação dos diferentes protocolos alimentares, implica verificar se os pressupostos básicos foram cumpridos (análise paramétrica): as amostras são aleatórias e independentes, possuem uma distribuição normal e observa-se a homogeneidade das variâncias. Para além disso, para a comparação entre protocolos alimentares, é necessário que haja uma hipótese nula (H_0) as médias populacionais são iguais, por isso não existem diferenças significativas entre os protocolos ($P > 0,05$) e a hipótese alternativa (H_1) as médias populacionais são diferentes, ou pelo menos uma delas o é, logo existem diferenças significativas ($P < 0,05$).

Sempre que os pressupostos eram cumpridos, os resultados foram analisados pela análise de variâncias (ANOVA) e quando não eram cumpridos através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Sempre que se verificavam diferenças estatísticas entre os protocolos alimentares eram analisados pelo teste de Bonferroni. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa informático SPSS e Microsoft office Excel.

4 - Resultados

4.1 – Avaliação do comportamento alimentar

4.1.1 – Coloração dos copépodes congelados

A avaliação da coloração dos copépodes congelados encontra-se resumida na Tabela 4.1. Da análise da tabela, observa-se, que os resultados obtidos foram diferentes entre os três ensaios. O primeiro, 5 gotas/5min (Figura 4.1A), apresentou o pior resultado, tanto na intensidade da cor, como na sua duração, ficou pouco intenso e perdeu a cor em 90 minutos, o que não é vantajoso para um ensaio larvar.

Tabela 4.1 - Resultados de coloração dos copépodes congelados obtidos, após a observação à lupa.

Ensaio	Intensidade da cor	Duração
5 gotas/5min	Pouco Intenso (extremidades)	Ao fim de 90 min já não tinha cor
10 gotas/5min	Intenso (corpo)	Até ao dia seguinte
5 gotas/10min	Intenso após 10min (corpo)	Ao fim de 3h já não tinha cor

Os outros dois ensaios apresentaram resultados melhores. Apesar de no terceiro ensaio, 5 gotas/10min (Figura 4.1C) os copépodes perderem a cor em três horas, ficou intenso mais rapidamente, sendo mais vantajoso num ensaio larvar, pois poderá despertar mais rapidamente a atenção das larvas. O segundo ensaio, 10gotas/5min (Figura 4.1B), é o que apresentou melhores resultados, principalmente em relação à duração da cor, os copépodes ficaram corados durante mais tempo.

Por isso, escolheu-se o método de coloração dos copépodes congelados através dos fatores que resultaram num melhor coloração para um ensaio larvar, sendo 10 gotas de

corante alimentar vermelho e 10 minutos de atuação, tendo sido este o seleccionado. Assim, os copépodes ficam corados rapidamente e durante mais tempo.

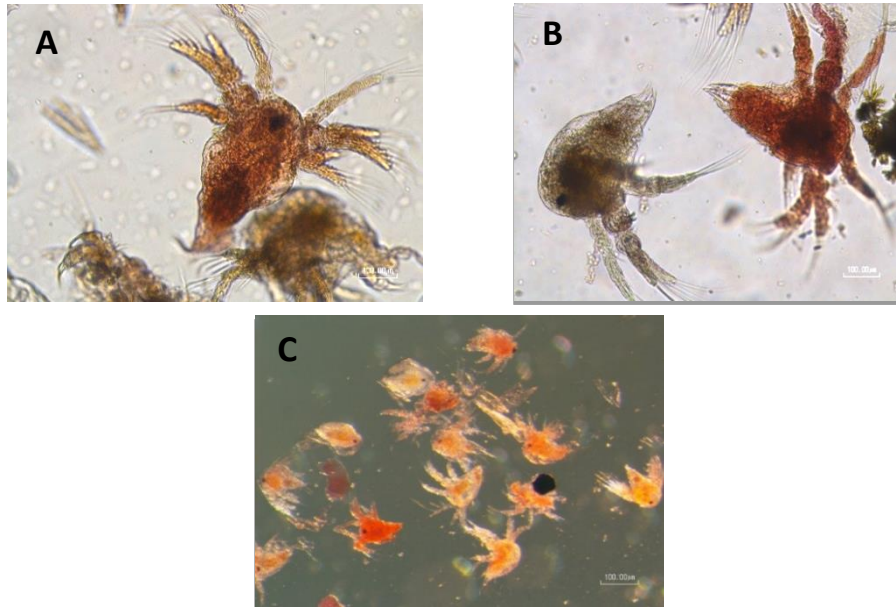


Figura 4.1– Fotografias dos copépodes congelados nos diferentes ensaios de coloração: A – 5gotas/5min; B – 10gotas/5min; C – 5gotas/10min.

4.1.2 - Observação da ingestão de partículas

A observação da ingestão de partículas pelas larvas de linguado encontra-se sintetizada na Tabela 4.2. Ao analisar a Tabela V, verifica-se que os resultados obtidos para a taxa de ingestão foram bastante diferentes para as diferentes presas. A taxa de ingestão de *Artemia spp.* viva é de 99%.

Tabela 4.2 - Resultados da ingestão de partículas pelas larvas de linguado , após a observação à lupa.

	Taxa de ingestão
Copépodes corados	30%
Copépodes não corados	10%
<i>Artemia spp.</i> viva	99%

Em relação aos copépodes, ambos apresentaram taxas de ingestão baixas, quando comparados com a artémia. No entanto os copépodes congelados corados apresentaram uma taxa superior (30%) relativamente aos copépodes congelados não corados (10%). Na figura 4.2 observa-se o estômago e trato digestivo de larvas de linguado com diferentes presas.

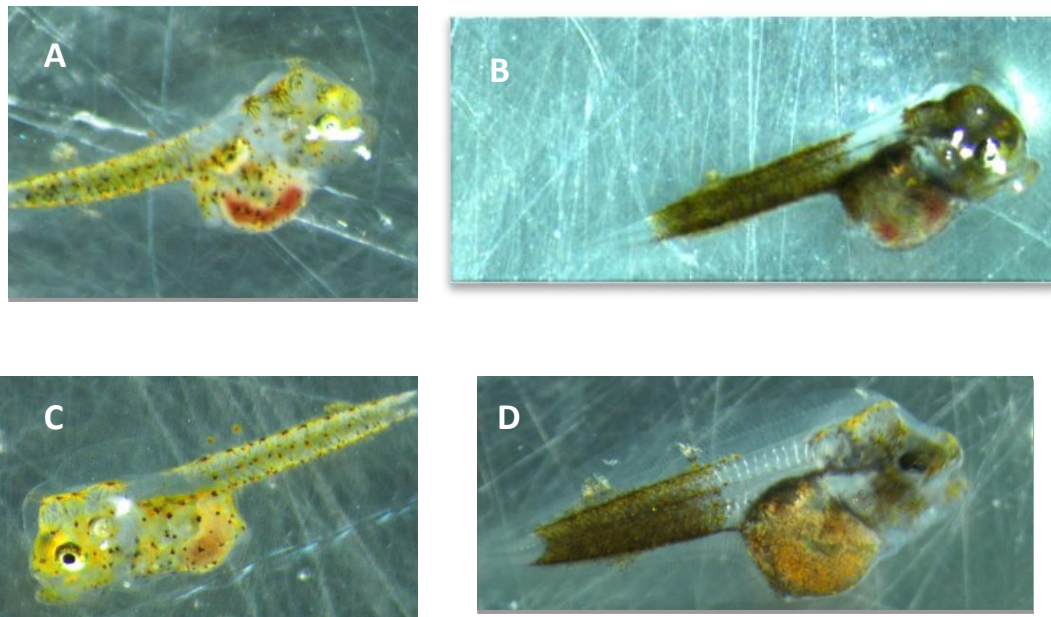


Figura 4.2 - Fotografias de larvas de linguado com diferentes presas no tracto digestivo: A e B – Copépodes congelados corados; C – Copépodes congelados não corados; D – *Artemia spp.*.

4.1.3 – Observação do comportamento alimentar das larvas de linguado a diferentes alimentos

A avaliação do comportamento alimentar das larvas de linguado a diferentes alimentos encontra-se resumida na Tabela 4.3. Observaram-se dois comportamentos alimentares completamente diferentes face ao tipo de presas. Por um lado, as larvas de linguado, após a administração de artémia congelada, rapidamente se movimentaram em direção à presa e todas as larvas ingeriram a presa.

Por outro, quando se administraram copépodes congelados corados, as larvas de linguado não mostraram grande interesse pela presa. Algumas larvas ainda mostraram natação

para capturar a presa, mas só algumas é que a ingeriram, como verificado no teste de comportamento anterior.

Tabela 4.3 - Resultados obtidos após a observação do comportamento das larvas a dois diferentes alimentos.

	Copépodes congelados corados	<i>Artemia spp.</i> congelada
Tempo de reação	Demorado	Rápido
Comportamento	Vão a encontro do alimento, mas não comem	Vão rapidamente em direção do alimento
Número de larvas que ingerem	Só algumas	Todas

4.2 – Análise do crescimento e condição larvar

4.2.1- Crescimento

- Fase Pelágica

O gráfico da figura 4.3 mostra o comprimento total médio para as larvas de linguado, durante o seu desenvolvimento larvar.

Em relação ao comprimento total, no final do ensaio as larvas do tratamento Controlo foram as que cresceram mais, logo seguidas do tratamento 50:50, sendo as do tratamento Agressivo as que cresceram menos. No início do ensaio as larvas tinham um comprimento total igual, tendo-se observado as primeiras diferenças entre os tratamentos aos 6 DAE ($P < 0,05$), em que as larvas do 50:50 eram maiores, logo seguidas pelas larvas do Controlo e por fim as larvas do Agressivo. Este padrão desapareceu aos 9 DAE quando as larvas do Controlo e 50:50, apresentaram comprimentos semelhantes, embora maiores do que as larvas do Agressivo ($P < 0,05$). Após esta idade e até aos 22 DAE as larvas dos tratamentos apresentaram sempre tamanhos diferentes ($P < 0,05$), com as larvas do Controlo a apresentarem maior comprimento e as do Agressivo com o menor comprimento.

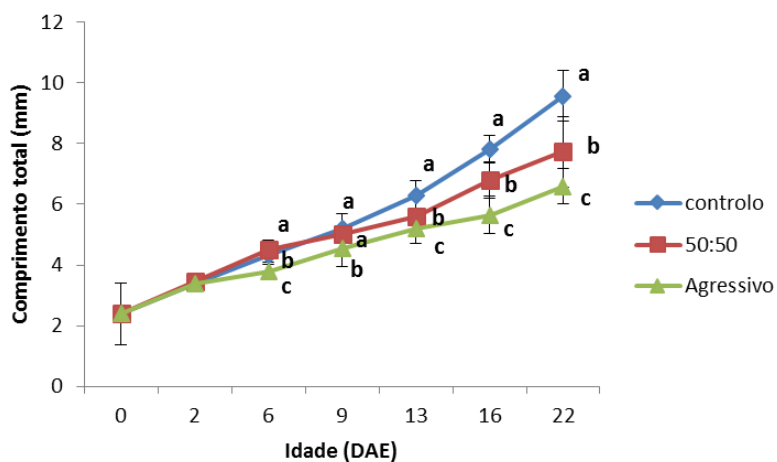


Figura 4.3 – Variação do comprimento total (mm), das larvas de linguado, *Solea senegalensis* durante a fase larvar (22 DAE), para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20) As letras indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

No gráfico da figura 4.4 observa-se a variação do peso seco, em média, para as larvas de linguado ao longo da fase larvar.

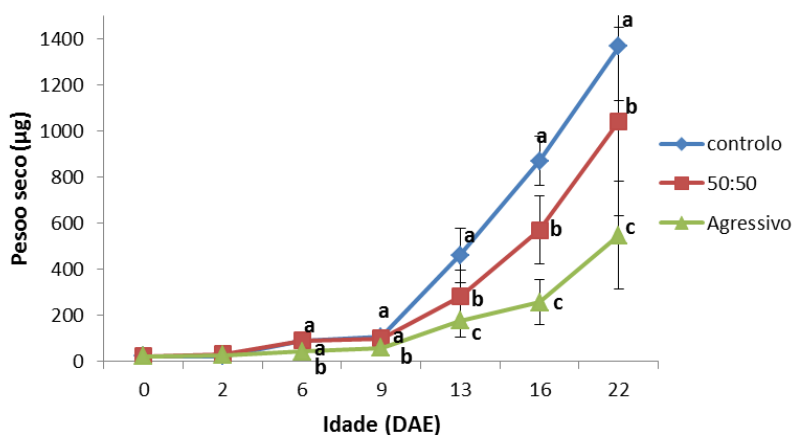


Figura 4.4 – Variação do peso seco (µg) das larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

O padrão de variação de peso seco foi semelhante ao de comprimento total, com as larvas do tratamento Controlo crescerem mais quando comparadas com os outros dois protocolos alimentares. No início do ensaio (0 DAE) as larvas apresentavam o mesmo peso

seco, $22,18 \pm 15,39 \mu\text{g}$, sendo que até aos 9 DAE, as larvas do tratamento 50:50 e do Controlo apresentaram valores de peso seco semelhantes ($P < 0,05$). Só começaram a haver diferenças significativas entre os tratamentos aos 13 DAE ($P < 0,05$). Após essa idade e até ao fim da fase pelágica, as larvas dos três tratamentos apresentaram pesos significativamente diferentes ($P < 0,05$), no qual as larvas do Agressivo apresentaram menor peso e as do Controlo maior peso, como se verificou em relação ao comprimento total.

O gráfico da figura 4.5 mostra a taxa de crescimento relativa (%) durante a fase larvar, verificou-se que no início as larvas cresceram nos tratamentos Controlo e 50:50.

Aos 9 DAE verificou-se uma diminuição na taxa de crescimento em todos os tratamentos, aumentando novamente aos 13 DAE, as larvas do tratamento Controlo apresentaram a maior taxa de crescimento, seguindo do tratamento Agressivo e 50:50 que apresentam uma taxa de crescimento semelhante ($P < 0,05$). Desde essa idade e até ao fim da fase pelágica, 22 DAE, a taxa de crescimento das larvas em todos os tratamentos diminuíram. No fim da fase pelágica, as larvas do tratamento Agressivo foram as que apresentaram a taxa de crescimento maior, seguindo do tratamento 50:50 e do Controlo ($P < 0,05$).

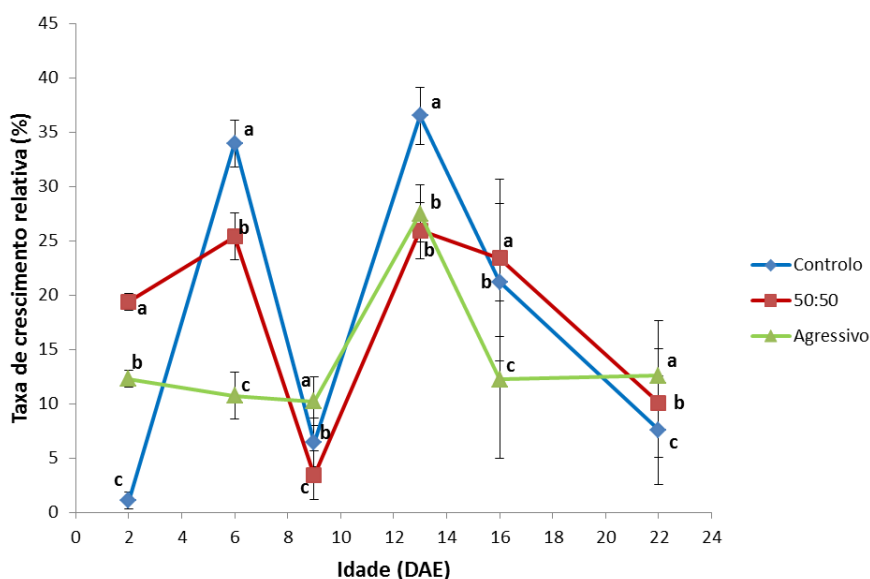


Figura 4.5 - Variação da taxa de crescimento relativa (%) das larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão ($n=20$). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

O gráfico da figura 4.6 mostra o Índice de condição, em média, ao longo da fase larvar.

Ao longo do ensaio, as larvas do tratamento Controlo e 50:50 apresentaram valores de índice de condição superiores, quando comparados com as larvas do tratamento Agressivo. Aos 2 DAE não existiram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Aos 6 DAE, as larvas de todos os protocolos alimentares apresentaram diferenças no índice de condição ($P < 0,05$), aos 9 DAE voltaram a não existir diferenças entre os protocolos. No fim do ensaio, as larvas do tratamento 50:50 apresentaram um Índice de Condição superior, seguindo o tratamento Controlo e por fim o Agressivo.

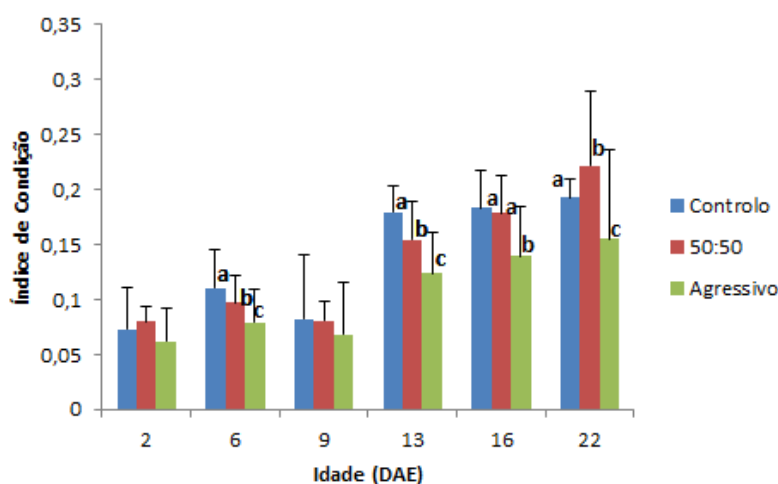


Figura 4.6 - Variação do Índice de Condição das larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

- Fase bentónica

No gráfico da figura 4.7 observa-se variação do comprimento total, durante a fase bentónica.

Durante toda a fase bentónica, observaram-se diferenças significativas no tamanho das pós-larvas dos diferentes tratamentos alimentares ($P < 0,05$). No fim do ensaio, as pós-larvas do protocolo alimentar Controlo foram as que cresceram mais e as do Agressivo cresceram

menos ($P < 0,05$). No teste *challenge*, dos 40 aos 50 DAE, verificou-se que as larvas do tratamento Agressivo cresceram mais, apresentado um declive maior.

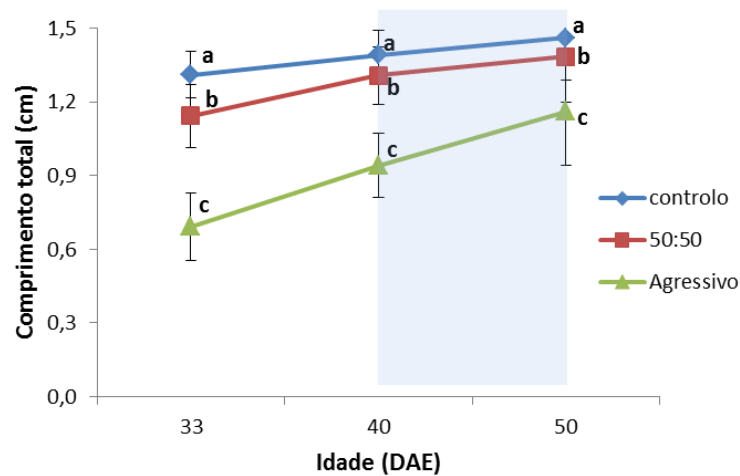


Figura 4.7- Variação do comprimento total (cm) das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

O gráfico da figura 4.8 apresenta os resultados do crescimento, em média, do peso húmido ao longo do ensaio.

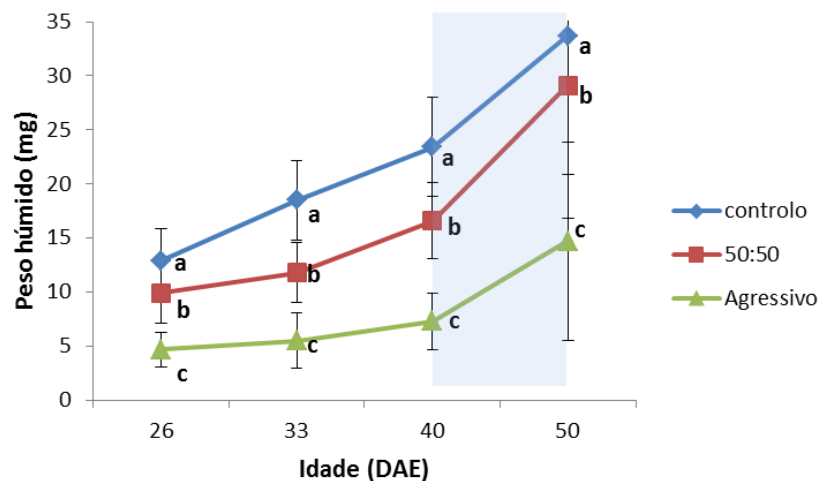


Figura 4.8 - Variação do peso húmido (mg) das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão

(n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

Constata-se, pela figura 4.8, que as pós-larvas de linguado alimentadas com os diferentes protocolos alimentares aumentaram de peso ao longo do ensaio, tendo-se observado diferenças significativas entre os tratamentos em todos os pontos de amostragem ($P < 0,05$). No final do ensaio, as pós-larvas do protocolo alimentar Controlo apresentaram valores de peso húmido maiores, seguindo as do tratamento 50:50 e por fim pelo Agressivo.

No teste *challenge*, as larvas do tratamento 50:50 foram as que cresceram mais, apresentado um maior declive.

No gráfico da figura 4.9 observa-se, a variação do peso seco, em média, ao longo do ensaio, durante a fase bentónica.

Verificou-se uma variação dos pesos secos, pouco acentuado, entre os protocolos alimentares em todos os pontos de amostragem, com as pós-larvas do tratamento Controlo a crescerem mais, seguindo as do tratamento 50:50 e por fim as do Agressivo. Através da análise estatística verificou-se que existem diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os protocolos alimentares, em todos os pontos de amostragem.

No teste *challenge* observou-se que no tratamento 50:50 o declive foi mais acentuado, as pós-larvas ganharam mais peso.

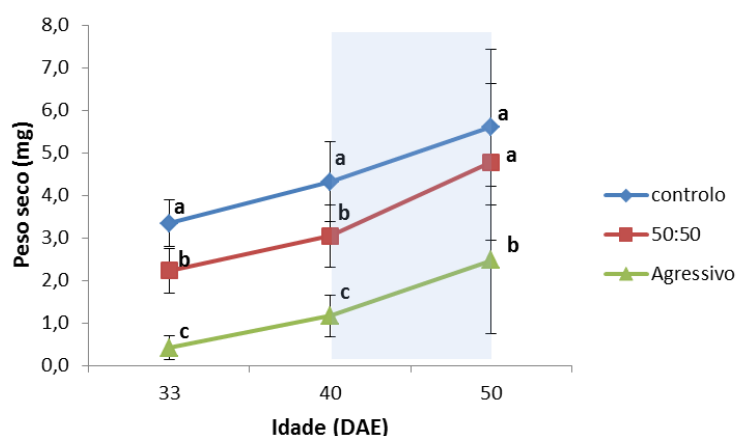


Figura 4.9 - Variação do peso seco (mg) das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão

(n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

O gráfico da figura 4.10 mostra o Índice de condição, em média, nas pós-larvas de linguado.

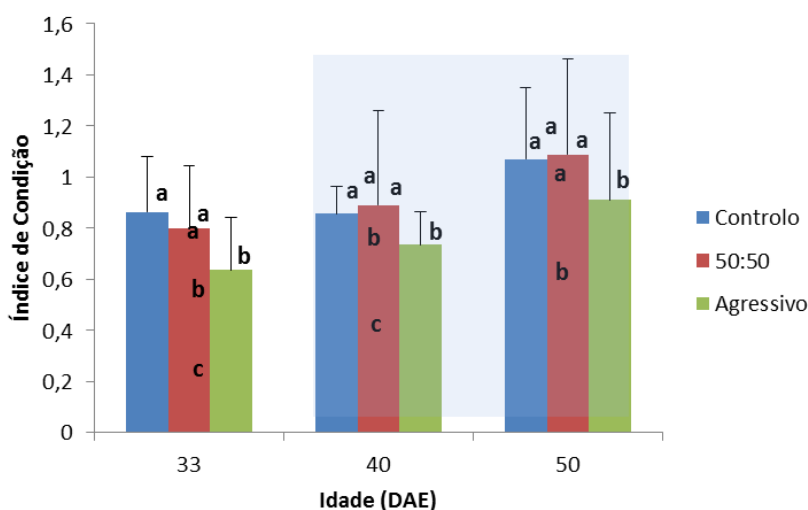


Figura 4.10 - Variação do Índice de Condição das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

Ao observar-se o gráfico da figura 4.10, concluiu-se que o Índice de Condição na fase bentónica é muito semelhante entre os três tratamentos alimentares, no qual não existiram diferenças significativas entre as pós-larvas do tratamento 50:50 e as do tratamento Controlo ($P < 0,05$). No fim do ensaio, teste *challenge*, no tratamento 50:50, apesar de a diferença ser mínima, as pós-larvas apresentaram um índice de condição superior. As pós-larvas de linguado do tratamento Agressivo foram as que ao longo da fase bentónica apresentaram valores de índice de condição mais baixos.

As relações biométricas durante o teste *challenge*, dos 40 aos 50 DAE, a introdução da dieta não afetou a tendência de crescimento observada, no qual as larvas do tratamento Controlo foram as que cresceram mais. Observou-se um aumento do peso, durante esta fase, principalmente no tratamento 50:50.

4.2.2 – Índice de Metamorfose

Relativamente ao Índice de Metamorfose observaram-se diferenças entre os tratamentos ao longo do ensaio experimental, dos 2 DAE aos 40 DAE (Figura 4.11).

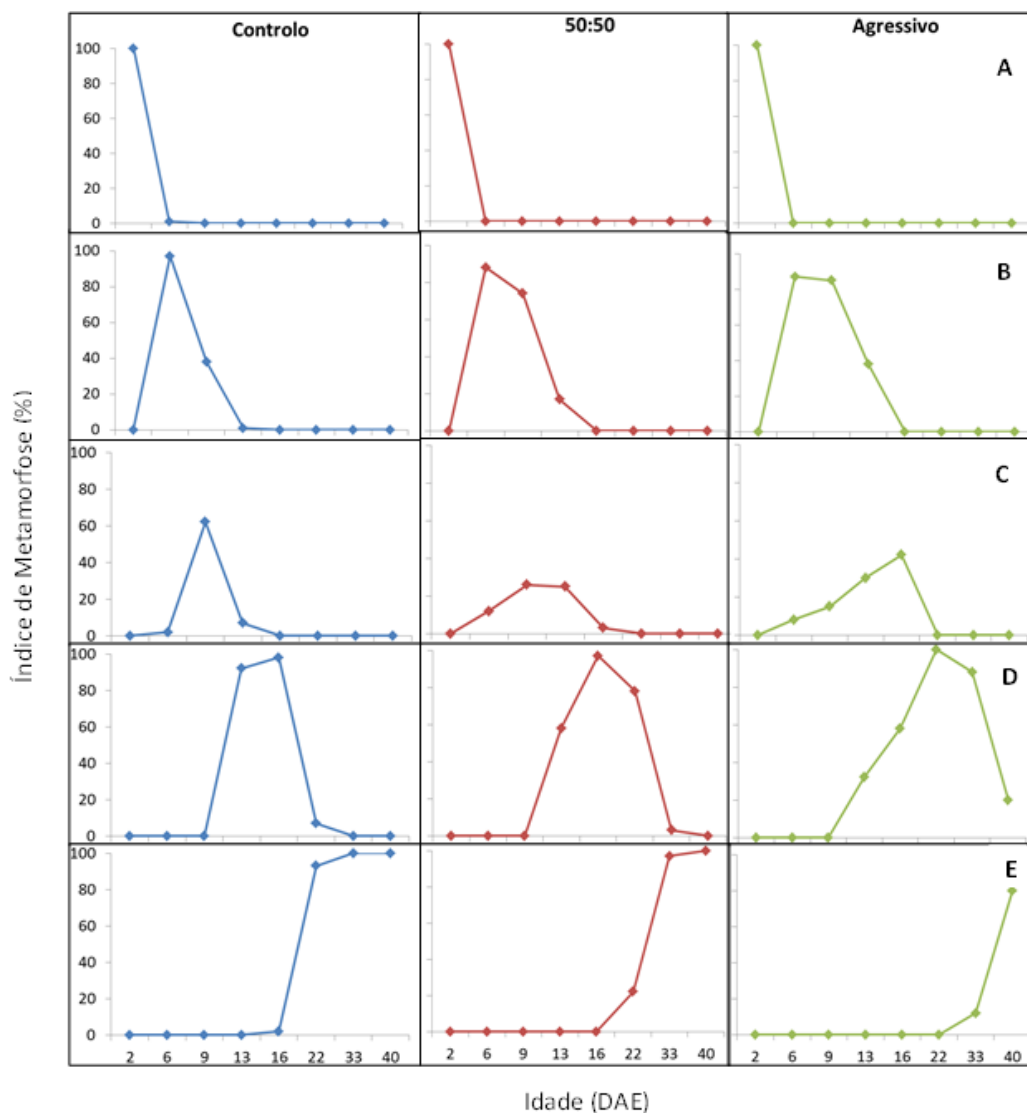


Figura 4.11 - Variação dos Índices de metamorfose (%) no linguado (*Solea senegalensis*) durante o ensaio experimental, dos diferentes protocolos alimentares (n=20). Fase de metamorfose: A – Fase 0; B- Fase 1; C- Fase 2; D- Fase 3 e E – Fase 4.

A migração do olho iniciou-se entre os 6 e os 9 DAE, em todos os tratamentos. No entanto, o tratamento Agressivo, apesar de ter iniciado a migração do olho ao mesmo tempo, a metamorfose foi mais atrasada.

No fim do ensaio experimental, aos 40 DAE, toda a população, tanto o Controlo como o 50:50, apresentava a metamorfose concluída. No tratamento agressivo não se observou o mesmo, aos 40 DAE, cerca de 20 % das pós-larvas ainda não estavam completamente metamorfoseadas.

4.2.3- Sobrevivência

- Fase Pelágica

Ao longo do cultivo larvar, observou-se um aumento da taxa de mortalidade. Aos 2 DAE, todos os tratamentos alimentares apresentaram uma sobrevivência de 99% (Figura 4.12).

É a partir dos 6 DAE que o aumento da mortalidade começa a ser mais acentuada, principalmente para o tratamento Agressivo. Apesar desse aumento, verificou-se que a incidência de mortalidade é semelhante entre os tratamentos Controlo e 50:50 e maior no tratamento Agressivo ($P < 0,05$). A partir dessa idade e até aos 13 DAE, existiram diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$).

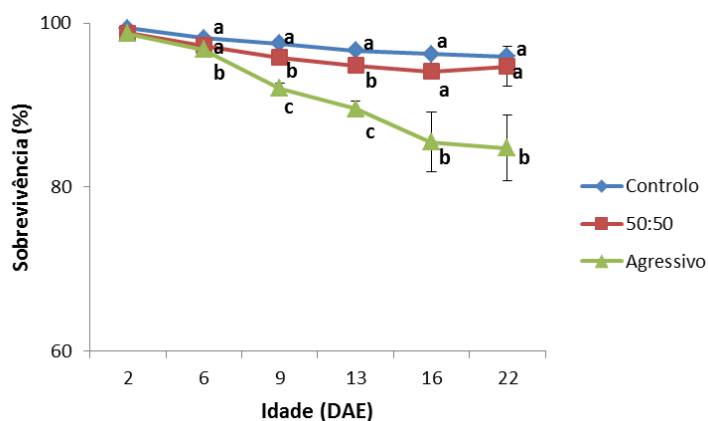


Figura 4.12 - Variação da sobrevivência (%) das larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 22 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

Aos 16 DAE e até ao fim do ensaio, o tratamento Controlo e 50:50 apresentaram valores de mortalidade muito semelhantes, enquanto as larvas do tratamento Agressivo apresentaram valores mais baixos e significativamente diferentes ($P < 0,05$).

- Fase bentónica

Nos três protocolos observou-se um aumento da mortalidade ao longo do ensaio (Figura 4.13). Até aos 33 DAE, todos os tratamentos alimentares apresentaram valores semelhantes, não existindo diferenças entre eles ($P < 0,05$). Até ao final do ensaio (40 DAE) os tratamentos, Controlo e 50:50, os valores de sobrevivência foram semelhantes não existindo diferenças entre estes dois tratamentos ($P < 0,05$). Em relação ao tratamento Agressivo, verificou-se um aumento da mortalidade até ao final do ensaio.

No teste *challenge* (exposição a dieta inerte), dos 40 DAE e até aos 50 DAE, verificou-se um aumento acentuado da mortalidade no tratamento Agressivo. Por outro lado, o tratamento Controlo e 50:50 apresentaram valores semelhantes ($P < 0,05$).

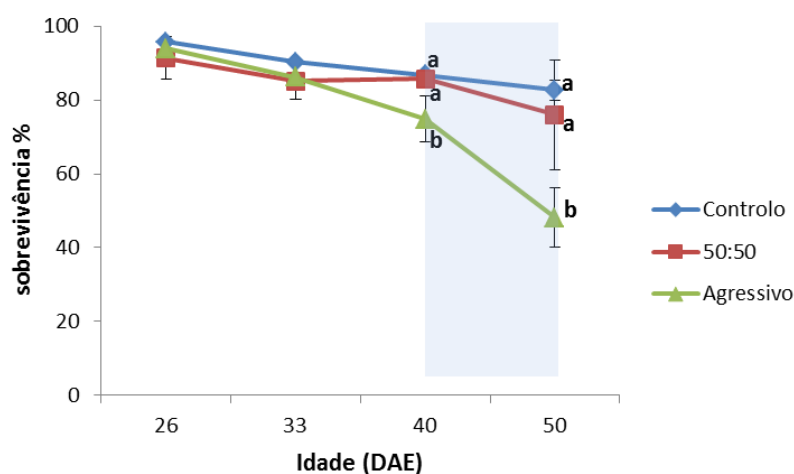


Figura 4.13 - Variação da sobrevivência (%) das pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, até aos 50 DAE, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

4.2.4 – Determinação dos ácidos nucleicos e índice ARN/ADN

Na figura 4.14 e 4.15 podemos observar a evolução do índice de ARN:ADN para os três tratamentos alimentares.

Apesar do padrão de variação da razão entre os ácidos nucleicos ser semelhante entre os tratamentos (figura 4.15), ocorreram alterações no conteúdo de ARN e ADN por larva (figura 4.14).

Tanto o conteúdo de ADN (4.14A) como o de ARN(4.14B) apresentaram oscilações ao longo do ensaio. Isto verificou-se tanto no tratamento Controlo como no 50:50. No Agressivo esse padrão é menos evidente.

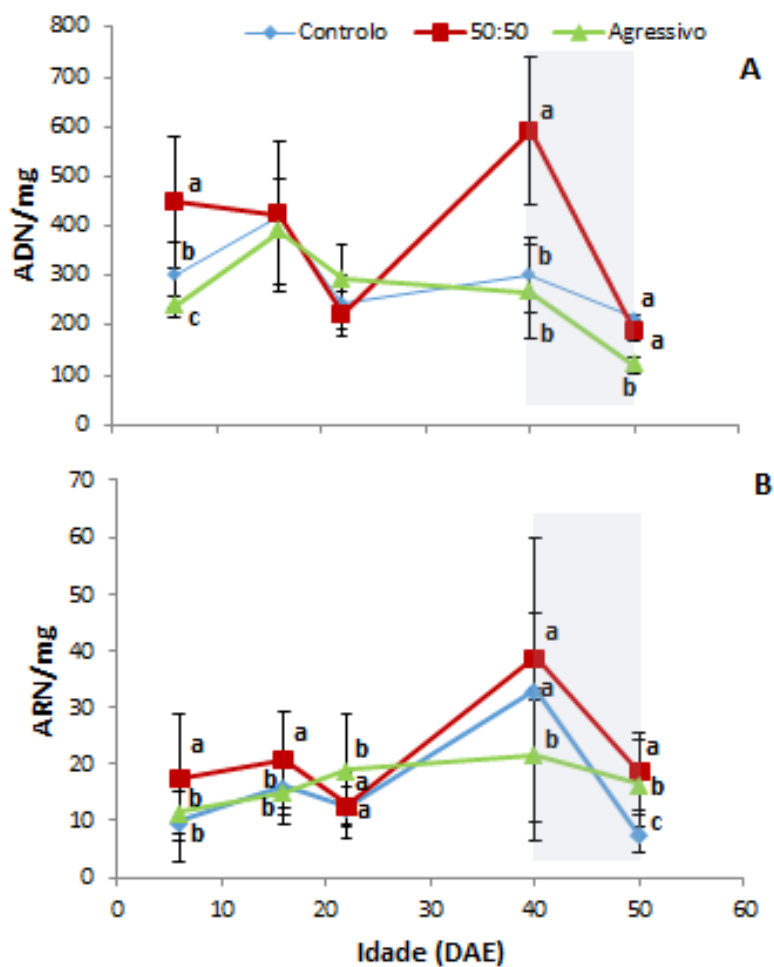


Figura 4.14 - Variação do conteúdo de ADN/mg (A) e do ARN/mg (B) nas larvas e pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, durante o ensaio, para todos os protocolos alimentares. Valores

apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

Relativamente ao ADN/mg, no início do ensaio, as larvas apresentaram valores relativamente altos e aumentam aos 16 DAE, isto aconteceu nas larvas do tratamento Controlo e Agressivo. No tratamento 50:50 houve uma pequena descida no conteúdo de ADN, mas todas as larvas dos três tratamentos apresentaram valores semelhantes ($P<0,05$). As larvas do tratamento Agressivo foram diminuindo o conteúdo ADN, desde os 16 DAE e até ao fim do ensaio. Dos 16 aos 22 DAE, os valores de ADN do tratamento Controlo e 50:50 diminuíram e foram muito semelhantes ($P<0,05$). Aos 40 DAE, o conteúdo de ADN nas larvas do Controlo e do 50:50 voltaram a aumentar, principalmente nas larvas do tratamento 50:50. No fim do ensaio, teste *challenge*, as larvas do tratamento Controlo apresentaram os maiores valores de ADN/mg, mas muito semelhantes às do 50:50 ($P<0,05$).

No início da fase larvar, o conteúdo de ARN/mg foi relativamente baixo, principalmente para as larvas do tratamento Controlo e Agressivo ($P<0,05$). Aos 22 DAE, ocorreu uma diminuição do conteúdo de ARN nas larvas do tratamento Controlo e 50:50, enquanto que os valores de ARN para as larvas do Agressivo foram superiores ($P<0,05$). Aos 40 DAE, verificou-se um pico de ARN/mg, no qual as larvas do tratamento 50:50 e Controlo apresentaram valores elevados ($P<0,05$). Durante o teste *challenge*, verificou-se, uma diminuição do conteúdo de ARN/mg em todos os tratamentos alimentares.

No início do ensaio, todas as larvas apresentavam valores ARN/ADN semelhantes, não existindo diferenças entre os tratamentos ($P<0,05$). Observaram-se diferenças entre os tratamentos, nas idades seguintes (16 e 22 DAE). No fim do ensaio, aos 40 DAE, as larvas do tratamento 50:50 apresentaram melhores valores de ARN/ADN. As pós-larvas do tratamento Controlo apresentaram valores superiores às do tratamento Agressivo, mas não existem diferenças entre eles ($P<0,05$). No teste *challenge*, até aos 50 DAE, os valores de ARN/ADN aumentaram, apesar disso, as pós-larvas de linguado do tratamento 50:50 foram as que apresentaram melhores valores de ARN/ADN, seguidas do tratamento Controlo e do Agressivo ($P<0,05$).

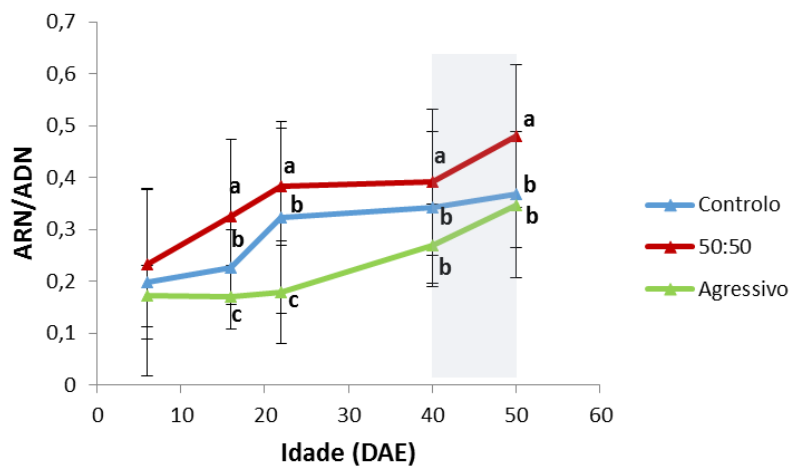


Figura 4.15 - Variação do ARN/ADN nas larvas e pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, durante o ensaio, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

4.2.5 - Proteína Total

A variação da proteína por larva (Figura 4.16) apresentou um comportamento idêntico ao do peso seco e ARN:ADN, em relação ao tempo. Assim, ao longo do período de ensaio, observou-se um aumento exponencial da proteína por larva em todos os tratamentos.

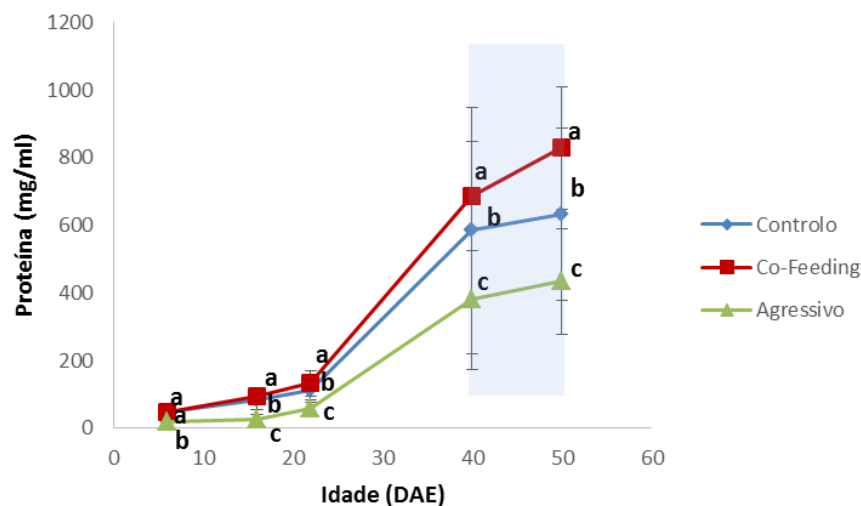


Figura 4.16 - Variação da proteína (mg/ml) nas larvas e pós-larvas de linguado, *Solea senegalensis*, durante o ensaio, para todos os protocolos alimentares. Valores apresentados sob a forma de média±desvio padrão (n=20). As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Zona sombreada indica o período do teste *challenge*.

No início do ensaio, as larvas de linguado do tratamento Controlo e 50:50 apresentaram valores de proteína muito semelhantes ($P < 0,05$). A partir dos 16 DAE, todos os tratamentos alimentares foram diferentes entre si ($P < 0,05$). No fim do ensaio, teste “challene”, as larvas tratamento 50:50, foram as que aumentaram mais ao nível de proteínas,, logo seguidas do tratamento Controlo, sendo as do tratamento Agressivo as que apresentaram menores valores.

5 – Discussão

Os resultados obtidos permitiram avaliar o potencial de utilização de copépodes congelados como alternativa ao alimento vivo normalmente utilizado, considerando a sua performance e o comportamento larvar.

5.1 - Avaliação do comportamento alimentar

A acuidade visual na larva é considerada vital para a orientação larvar e reconhecimento da alimentação. Na maior parte das larvas de peixe, no início da alimentação exógena, os olhos não estão bem desenvolvidos, mas já conseguem distinguir as cores (Kolkovski *et al.*, 1997). A cor das presas afeta a captura das mesmas por parte das larvas, existindo preferência por presas coloridas. No teste de comportamento alimentar, as larvas ingeriram mais copépodes corados, o que já tinha sido descrito em larvas de *Epinephelus coioides* (Zhang *et al.*, 2015) e de *Psetta maxima* (Planas *et al.*, 1999). Quando comparado com os copépodes congelados, observou-se, embora pequena, uma maior taxa de ingestão quando os copépodes foram corados. Dendrinós *et al.* (1984) observaram que as taxas de ingestão nas larvas de linguado melhoraram quando os náuplios de artémia foram corados, devido ao maior contraste com as paredes do tanque.

Tanto no teste de ingestão de partículas como no da observação do comportamento das larvas quando expostas a diferentes alimentos, as larvas de linguado preferiram os náuplios de artémia, quando comparado com os copépodes congelados. Isto está relacionado com o fato de a artémia ter movimento, para além de outras características, pois os copépodes congelados não apresentam o movimento característico das presas vivas essencial ao sucesso da captura. Nos estudos descritos por Olivotto *et al.* (2010b) para larvas de *Amphiprion clarkii* e por Piccinetti *et al.* (2014a) para larvas de *Sparus aurata*, observaram-se menores taxas de ingestão com copépodes preservados, devido à falta de movimento, tornando-se pouco atrativo às larvas. É comum a maioria dos peixes marinhos cultivados não responderem bem a alimentos inertes durante a fase larvas, sendo necessário um certo período de adaptação (Papadakis *et al.*, 2009).

Apesar do teste de ingestão de partículas ter sido feito em volumes diferentes, (copo de 0,5L e tanques de 200L) o padrão de ingestão foi semelhante em ambos os casos. Por outro lado, no teste de observação do comportamento das larvas a diferentes alimentos, verificaram-se diferenças relativamente à idade/fase de desenvolvimento. As pós-larvas de linguado mostraram um pouco mais de interesse nos copépodes do que as larvas. Isto está relacionado com o desenvolvimento das larvas e dos seus órgãos sensoriais, quando passam a pós-larvas o movimento deixa de ter tanta importância, tornando-se o sentido olfativo mais importante para a captura de presas (Velez *et al.*, 2011), principalmente nesta espécie, que apresentam um sistema olfativo desenvolvido e complexo.

Por isso, como descrito por Kolkovski et al (1997), a cor do alimento e o movimento são suficientes para induzir uma resposta de alimentação.

5.2 - Análise do crescimento e condição larvar

Durante a fase larvar ocorrem alterações fisiológicas/anatómicas importantes, sendo caracterizado por um crescimento rápido. Para um cultivo larvar de sucesso é necessário desenvolver protocolos alimentares adequados para maximizar a sobrevivência e o crescimento das larvas de peixe, principalmente protocolos capazes de satisfazer a elevada energia que os peixes marinhos necessitam para o crescimento e sobrevivência. Neste ensaio larvar, testou-se um novo produto, copépodes congelado. Num ensaio também com larvas de linguado (*Solea senegalensis*) testou-se um produto semelhante, os quais mantiveram a sua composição lipídica ao longo do tempo (Olivotto *et al.*, 2010b; Piccinetti *et al.*, 2014a). Os diferentes protocolos alimentares resultaram em diferentes taxas de crescimento, de sobrevivência e na duração da metamorfose durante a fase larvar, devido ao tipo de presa disponível. Para além da disponibilidade da presa, a assimilação de lípidos na dieta é essencial para a sobrevivência larvar e está relacionado com o desenvolvimento do intestino e as características do alimento /digestibilidade (Piccinetti *et al.*, 2014a).

Aos 2 DAE, após a abertura da boca, ocorrem as primeiras alterações morfológicas do sistema digestivo, as larvas deixam de estar exclusivamente dependentes das reservas endógenas (Ribeiro *et al.*, 1999a), sendo por isso importante iniciar a alimentação exógena

com presas adequadas ao tamanho da boca das larvas, para além de serem adequadas nutricionalmente.

Tanto na fase pelágica como na fase bentónica, concluiu-se que as larvas de linguado alimentadas com o protocolo alimentar **Controlo**, presas vivas, apresentaram um desempenho superior relativamente ao comprimento total, peso seco, peso húmido e de sobrevivência, quando comparados com os outros dois protocolos alimentares, apresentando uma tendência crescente ao longo do ensaio. Estes resultados foram semelhantes a outros estudos para a mesma espécie (Fernández-Díaz *et al.*, 2001 e 2006).

As larvas de linguado alimentadas com o protocolo alimentar **Agressivo** (90% copépodes congelados) apresentaram um desempenho inferior, relativamente ao crescimento e sobrevivência, ao esperado para esta espécie (Yúfera *et al.*, 1999). Isto já tinha sido descrito por Olivotto *et al.* (2008a,b, 2009, 2010b) para larvas de *Amphiprion clarkii* e por Piccinetti *et al.* (2014b) para larvas de *Solea solea*. Devido ao baixo crescimento das larvas quando alimentadas praticamente por copépodes, os mesmo são considerados como alimento suplementar à dieta tradicional.

Durante os primeiros dias de alimentação, a capacidade locomotora das larvas é bastante limitada e a deteção e captura das presas é dependente do movimento das presas para o seu encontro (Ronnestad *et al.*, 2013). Demonstrou-se que o movimento das presas vivas, como os rotíferos e a artémia, é um atributo essencial para estimular a atividade predatória das larvas (Meakin *et al.*, 2008). Tal não acontece com os copépodes congelados, que não apresentam movimento atrativo para as larvas, contribuindo para uma menor taxa de ingestão. Para, além disso, a maioria dos copépodes afundam no fundo do tanque ou nas paredes do tanque, deixando de estar disponível para a predação das larvas (Olivotto *et al.*, 2008a,b e 2010a). Estes fatores parecem justificar o baixo crescimento e sobrevivência do linguado. Isto leva a que o desenvolvimento larvar seja mais lento, no qual as alterações fisiológicas/morfológicas foram mais tardias, principalmente a metamorfose e o desenvolvimento do intestino (Piccinetti *et al.*, 2014a), para além de poder afetar a capacidade locomotora e deteção de presas (Ronnestad *et al.*, 2013).

Estes resultados, baixo desempenho das larvas do tratamento **Agressivo**, também podem ser explicados devido às diferenças de tamanho e de conteúdo energético entre as presas, conforme descrito por Stottrup *et al.* (1997).

Na fase pelágica, o menor comprimento e peso dos peixes do tratamento **Agressivo** foi mais notável a partir dos 9 DAE, após a mudança de artémia instar I para instar II, no qual pode ter influenciado os resultados para este tratamento. Apesar de ser o mesmo tipo de presa (artémia), a transição pode não ter sido feita da forma mais correta. Para uma alimentação eficaz, é necessário que o tamanho da presa seja o ideal para o tamanho da boca da larva (Planas *et al.*, 1999), no qual a relação entre tamanho da presa/tamanho da boca da larva é o que determina a seleção e ingestão de uma dada presa (Ronnestad *et al.*, 2013). Como estas larvas estavam menos desenvolvidas, provavelmente tinham a boca mais pequena o que dificultava a captura e ingestão de partículas maiores (Pousão-Ferreira, 2009). Por isso, existia uma pequena quantidade de alimento viável para estas larvas e um aumento de alimento não consumido, diminuindo a qualidade da água e contribuindo para uma maior mortalidade neste tratamento alimentar, como reportado por Piccinetti *et al.*, 2014a.

As larvas alimentadas com 50% de alimento vivo e 50% de copépodes congelados, protocolo **50:50**, apresentaram um desempenho semelhante às larvas do tratamento **Controlo**, em termos do comprimento total, peso seco, peso húmido e índice de condição. Tanto no fim da fase pelágica como no fim do ensaio, as larvas do tratamento **50:50** apresentaram melhores valores de índice de condição. Em outros estudos em que foram utilizados diferentes níveis de copépodes para substituir o alimento vivo (Olivotto *et al.*, 2010b; Piccinetti *et al.*, 2012), demonstraram que as larvas alimentadas com copépodes preservados apresentavam valores de ácidos gordos elevados, principalmente HUFAs. Estes nutrientes são essenciais nas dietas de larvas, melhorando o cultivo larvar, principalmente no crescimento, sobrevivência e metamorfose (Sargent *et al.*, 1999). Um teor mais elevado e equilibrado de HUFAs resulta numa oxidação lipídica mais eficiente e conseqüente um melhor crescimento larvar (Olivotto *et al.*, 2009). Logo, os copépodes preservados podem ser considerados como uma fonte suplementar de ácidos gordos para as larvas de peixes marinhos, no qual são facilmente digeridos e assimilados, quando comparados com a artémia. O baixo crescimento das larvas do tratamento **50:50** quando comparado com o tratamento **Controlo**, foi devido à baixa taxa de ingestão de copépodes quando comparado com a elevada taxa de ingestão da artémia.

Outra razão para o crescimento das larvas do tratamento **50:50** ser menor ao do **Controlo**, é o fato de não se ter alterado o tamanho dos copépodes mais cedo, visto que aos 13 DAE o tamanho da boca das larvas era suficientemente grande para se alimentarem de copépodes congelados de 400 µm. Por isso as larvas tinham de capturar mais presas para lidar

com as suas necessidades de energia, o que implica mais energia gasta na captura. À medida que a larva cresce, a presa/alimento também aumenta e precisa de fornecer massa e energia suficiente (Ronnestad *et al.*, 2013) para um crescimento ótimo. Por isso, protocolos alimentares não otimizados podem representar uma série de problemas a um cultivo larvar (Ronnestad *et al.*, 2013).

Apesar da existência de copépodes congelados, a presença de artémia, com os seus movimentos atrativos (Papadakis *et al.*, 2009), favoreceram a captura dos copépodes, facilitando o encontro deste alimento por parte das larvas (Piccinetti *et al.*, 2014a). Olivotto *et al.* (2010b), reportou que dietas combinadas (neste caso o tratamento 50:50) apresentaram bons resultados de crescimento e sobrevivência, tais como neste ensaio, pois as larvas alimentam-se primeiro dos copépodes preservados, antes dos mesmo atingirem o fundo e depois alimentam-se do alimento vivo, artémia. Desta forma, as larvas do tratamento **50:50**, foram capazes de tirar partido da composição bioquímica dos copépodes, no qual correspondem às necessidades nutricionais das larvas (Piccinetti *et al.*, 2012).

A alimentação combinada, co-alimentação, neste ensaio representa o tratamento **50:50**, no início da fase larvar representa uma estratégia alternativa, no qual permite que o desmame decorra num período mais curto (Rosenlund *et al.*, 1997). O desmame é um processo de substituição gradual de alimento vivo para alimento inerte, no qual quanto mais cedo começar a administração de partículas inertes, mais fácil e eficiente é o desmame (Ma *et al.*, 2014).

Para que a co-alimentação seja bem sucedida é importante que as larvas se alimentem de alimento inerte quando o alimento vivo estiver presente, assim aumenta a condição nutricional da larva e, também, aumenta a aceitabilidade de alimentos secos (Rosenlund *et al.*, 1997; Cañavate *et al.*, 1999), melhorando a ingestão de presas, como os copépodes congelados.

Durante o teste *challenge*, o tratamento **50:50**, apresentou a melhor taxa de crescimento, melhor do que o tratamento **Controlo**, como já descrito por outros autores (Cañavate *et al.*, 1999; Kolkovski, 2001; Engrola *et al.*, 2009b). A utilização de dietas artificiais o mais cedo possível num cultivo larvar é o desejado, para isso é necessário administração antecipada de alimentos inertes (Watanabe *et al.*, 1994; Cañavate *et al.*, 1999), como o protocolos alimentar **50:50**. As larvas do tratamento **50:50** e **Controlo** encontravam-

se bem nutricionalmente, pois adaptaram-se à nova dieta sem afetar significativamente o crescimento e sobrevivência, quando comparado com as larvas do tratamento **Agressivo**.

A metamorfose é um processo que exige muita energia e pode interferir com o crescimento quando existem dificuldades na alimentação (Geffen *et al.*, 2007), sendo um período crítico para mudanças na alimentação. Para além disso, ocorrem inúmeras alterações morfológicas/fisiológicas durante essa fase, no qual é necessário adaptar o protocolo alimentar a esta fase crítica do cultivo. É iniciada quando atinge comprimentos totais ótimos, a flexão do notocórdio, o tamanho da cabeça e boca ideais (Fernández-Díaz *et al.*, 2001) e quando apresenta níveis de energia elevados (Geffen *et al.*, 2007). Neste estudo a metamorfose iniciou-se cedo, por volta dos 6 DAE, quando comparado com outro estudo com a mesma espécie, que iniciaram entre os 8 e os 12 DAE (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). Em termos de comprimento, iniciaram a metamorfose quando apresentavam um comprimento por volta dos 4 mm, como registado noutros estudos (Osse *et al.*, 1997; Fernández-Díaz *et al.*, 2001). No fim do estudo, aos 40 DAE, todas as pós-larvas do tratamento **Controlo** e **50:50**, apresentavam metamorfose completa. Por outro lado, apenas 80% das pós-larvas do tratamento **Agressivo** sofreram a metamorfose completa o que se associou à alimentação. Como estas pós-larvas não se alimentaram tanto, não possuem energia suficiente para crescerem, logo não ficaram metamorfoseadas rapidamente (Geffen *et al.*, 2007). Para além disso, durante a metamorfose, a captura de presas é afetada dificultando a metamorfose e a vulnerabilidade à predação aumenta, aumentando a taxa de mortalidade.

As larvas que apresentaram uma taxa de crescimento superior, tanto do tratamento **Controlo** como o **50:50**, iniciaram a sua metamorfose mais cedo. Cañavate *et al.* (2006) reportaram que durante a metamorfose do linguado (*S. Senegalensis*) a alimentação contínua, mas não eficazmente e que a ingestão de presas e a ração diária diminuiu no início da metamorfose. Observou-se, que no início da metamorfose, a taxa de crescimento das larvas diminuiu, o peso seco das larvas é relativamente constante e menos variável nesta primeira etapa de metamorfose, as larvas utilizaram a energia para sobreviverem nesta fase em vez de utilizarem para o crescimento. Já foi descrito por Fernández-Díaz *et al.* (2001) para a mesma espécie (*Solea senegalensis*) e para outras espécies de peixes planos, como *Solea solea* (Amara *et al.*, 1995), *Plathichtys stellatus* (Policansky, 1982) e *Pseudopleuronectes americanus* (Chambers *et al.*, 1987). Ao iniciarem a metamorfose mais cedo, as larvas dos dois tratamentos, **Controlo** e **50:50**, apresentavam uma elevada energia, devido a uma boa

alimentação e ao tipo de presa, principalmente no tratamento **50:50**. Os copépodes apresentam elevadas concentrações de HUFAs (Olivotto *et al.*, 2010b; Piccinetti *et al.*, 2012) importantes para o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central, que tem um papel chave na regulação da metamorfose (Olivotto *et al.*, 2010a).

Relativamente à sobrevivência, foi maior no **Controlo** e **50:50**, quando comparado com o tratamento **Agressivo**, larvas com taxas de crescimento baixas apresentam valores de sobrevivência igualmente mais baixos (Geffen *et al.*, 2007). A introdução de alimentos inertes, como os copépodes congelados, desde a abertura da boca não afetaram a sobrevivência. Os valores de sobrevivência deste ensaio foram superiores ao reportado por outros investigadores para a mesma espécie (Cañavate *et al.*, 1999; Fernández-Díaz *et al.*, 2006; Piccinetti *et al.*, 2012,2014b). No entanto, outros estudos reportaram total mortalidade ao fim de 7-9 DAE, para o grupo alimentado com copépodes preservados (equivalente ao tratamento **Agressivo** neste ensaio) (Olivotto *et al.*, 2010b; Piccinetti *et al.*, 2012,2014a), o que contrastou com o resultado obtido neste ensaio, no qual as larvas de tratamento **Agressivo** sobreviveram até ao fim do ensaio. A mortalidade das larvas do tratamento **Agressivo** está associado aos restos de alimento que as larvas não comiam, pois a taxa de ingestão de copépodes é baixa, facilitando a proliferação de bactérias e o aumento da amónia (Slembrouck *et al.*, 2009).

O aumento da mortalidade, no tratamento **Agressivo**, no teste *challenge*, a partir dos 40 DAE, deve-se à alteração do alimento, passando para uma ração experimental. As larvas eram mais pequenas e provavelmente tinham a boca menor, mas também devido à dificuldade da transição do alimento vivo para uma dieta artificial (Ma *et al.*, 2013; Piccinetti *et al.*, 2014b; Rasdi *et al.*, 2014).

As concentrações dos ácidos nucleicos tornaram-se um dos índices mais utilizados como biomarcadores de crescimento em Ecologia (Clemmesen, 1993; Chícharo *et al.*, 2008). A fase larvar é caracterizada por ocorrerem intensas alterações morfológicas e fisiológicas, no qual ocorrem alterações na atividade metabólica ao nível celular quer em termos de síntese proteica (aumento de ARN por larva) quer em termos de proliferação celular (aumento ADN por larva). Por outro lado, as alterações das presas e no tamanho das mesmas ao longo do ensaio, também provocaram oscilações no conteúdo de ARN e ADN. Alterações na alimentação conduzem a mudanças significativas no teor de ARN, logo na síntese de

proteínas, principalmente ribossômica (Dahldoff, 2003), afetando o crescimento (Chícharo *et al.*, 2008). Neste estudo verificou-se que as diferentes dietas, protocolos alimentares, tiveram um efeito significativo no índice de condição (ARN/ADN).

A relação ARN/ADN tendeu a aumentar ao longo do período do ensaio, exibindo menores valores de ARN e de proteínas no início da alimentação e na ausência de alimento (Gwak *et al.*, 2003a). Neste estudo os valores de ARN/ADN foram baixos quando comparados com outros estudos publicados para larvas da mesma espécie (Fonsenca *et al.*, 2006; Faria *et al.*, 2011), em larvas *Solea solea* (Chícharo *et al.*, 2008), para larvas de *Thunnus orientalis* (Tanaka *et al.*, 2008), larvas de *Paralichthys olivaceus* (Gwak *et al.*, 2003a e b), em larvas de *Sardina pilchardus* (Chícharo *et al.*, 1998), mas semelhantes em larvas de gobídeos (Esteves *et al.*, 2000) e larvas de *Sardina pilchardus* (Silva *et al.*, 2014). Estas diferenças nos valores de relação do ARN/ADN estão relacionadas com vários fatores, tais como espécies diferentes, métodos de quantificação de ácidos nucleicos diferentes, diferentes marcas de padrão de ADN e ARN e, também, pelo fato de a maioria destes estudos utilizar apenas um tecido da larva, enquanto neste estudo analisou-se toda a larva, sendo, este último, um fator determinante na explicação destas variações (Dahlhoff, 2004; Olivar *et al.*, 2009).

No presente estudo, as larvas de linguado do tratamento **50:50** apresentaram melhores valores de ARN/ADN e de proteínas totais, logo uma melhor condição fisiológica. As larvas do tratamento **50:50** foram capazes de tirar proveito da composição bioquímica dos copépodes, sendo que os copépodes apresentam as necessidades nutricionais essenciais às larvas de peixes (Piccinetti *et al.*, 2014a). Isto permite que tenham um maior sucesso na captura de alimento, nadem mais rápido (Ji *et al.*, 2002) e também aumenta a sobrevivência durante o seu desenvolvimento (Vieira *et al.*, 2014). Isto significa que o alimento utilizado melhorou a condição nutricional da larva e sugere que o ARN/ADN está correlacionado com a disponibilidade e qualidade do alimento (Dahldoff, 2003; Tanaka *et al.*, 2008). Outros estudos demonstraram que uma boa alimentação aumenta o crescimento do tecido muscular que está correlacionada com a taxa de síntese proteica (Fonseca *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2012; Viera *et al.*, 2014). O que não se verificou neste estudo, as larvas do tratamento **Controlo** apresentaram a maior taxa de crescimento, as larvas do tratamento **50:50** apresentaram um melhor índice de ARN/ADN. Isto está associado à maior concentração de ADN do que ARN, logo as larvas estão a crescer à custa do aumento do número de células (hiperplasia) e não só do aumento da dimensão das células (hipertrofia)(Olivar *et al.*, 2009)

Por outro lado, Gwak *et al.* (2002), sugeriram que durante o crescimento das larvas de *Paralichthys olivaceus*, no início da metamorfose, as larvas realizavam primeiro hipertrofia, no qual poupavam energia para ser utilizada na fase crítica da metamorfose, assentamento, fase em que há alteração dos hábitos alimentares e uma maior mortalidade e depois hiperplasia, para concluir a metamorfose. Por isso, as larvas do tratamento **50:50** não cresceram tanto como as do **Controlo**, mas apresentaram uma melhor condição nutricional. Tanaka *et al.* (1996) descreveram que no início da fase juvenil, as larvas apresentaram rácios de ARN/ADN inferiores, para pouparem energia para a fase de assentamento. Neste ensaio verificou-se que durante essa fase, o rácio ARN/ADN, para o tratamento **Controlo** e **50:50**, era praticamente constante e a proteína total aumentou, no qual as larvas pouparam energia para o período de não alimentação e para sobreviverem. No teste *challenge*, verificou-se que as pós-larvas do tratamento **50:50** aumentaram o seu rácio de ARN/ADN devido a essa poupança de energia, o que favoreceu as pós-larvas para a mudança de alimento. Contudo, a condição das larvas estimada pela relação ARN/ADN não é significativamente diferente entre o **Controlo** e o **50:50**.

As larvas do tratamento **Agressivo** foram as que apresentaram pior índice de ARN/ADN e níveis baixos de proteínas totais, isto deve-se ao alimento oferecido. Como dito anteriormente, estas larvas apresentaram taxas de crescimento menores, taxas de mortalidade mais altas, logo uma condição nutricional mais baixa, isto deve-se ao fato de estas larvas não se alimentaram tão bem como as restantes, apresentando uma escassez de energia em forma de triglicérides e fosfolípidos, como descrito por outros autores para larvas de *Gadus morhua* (McNamara *et al.*, 1999), *Paralichthys olivaceus* (Gwak *et al.*, 2003a) e para várias larvas de peixes marinhos (Buckley, 1984; Dahldoff, 2003).

Ao nível da variação do ADN e ARN, verificaram-se oscilações, ao longo do ensaio nos três tratamentos, períodos de proliferação celular acompanhados de elevadas taxas de síntese proteica, alternados por períodos de hiperplasia e baixas taxas de síntese proteica. Estas oscilações já foram observadas por Gwak *et al.* (2003a) para larvas de *Paralichthys olivaceus*.

6 – Conclusão

Com este trabalho pode-se concluir que os copépodes congelados são um bom substituto parcial em protocolos alimentares para larvas de peixe marinho, principalmente de linguado, *Solea senegalensis* e também parece ser um bom ingrediente para a microdieta. Para além disso, este produto apresenta vantagens, diminui os custos de produção da cadeia alimentar, sendo mais rentável.

O tamanho das presas durante o desenvolvimento larvar é importante, especialmente nas primeiras fases larvares, quando a disponibilidade de presas determina a sobrevivência e o crescimento das larvas de peixes.

As larvas alimentadas com uma substituição parcial de copépodes congelados, apresentaram uma condição nutricional superior, mas crescimento inferior aos das larvas alimentadas com presas vivas. Um dos motivos que pode estar na origem destes resultados é o fato dos copépodes congelados não apresentarem movimento, logo as larvas gastam energia na captura e não no crescimento, para a sua sobrevivência. Mas também devido à baixa taxa de ingestão de copépodes por parte das larvas. No teste *challenge* a mortalidade foi inferior ao esperado, principalmente no tratamento Controlo e 50:50, pois as larvas encontravam-se bem nutricionalmente, logo a inclusão de 10% de copépodes numa dieta é adequada. Seria interessante realizar estudos semelhantes, mas testar percentagens maiores de inclusão de copépodes congelados em dietas.

A coloração dos copépodes ajudou a ingestão dos mesmos por parte das larvas, no qual permitiu uma melhor deteção e estimulação na captura do alimento. Para além da coloração, seria interessante utilizar atratantes, como a Betaína e Fish e Shrimp Hidrolised, para verificar o efeito atrativo dos copépodes para as larvas.

Apesar de se ter verificado que os copépodes congelados são um bom alimento, são necessários melhoramentos, principalmente na administração adequada face aos requisitos da espécie e melhorar a manipulação dos copépodes, pois durante a lavagem perde-se compostos nutricionais essenciais.

7 - Referências

- Ajiboye, O.O., Yakubu, A.F., Adams, T.E., Olaji, E.D. e Nwogu, N.A. (2011). A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21: 225-246.
- Almeida, F.M. (2006). Uso de copépodes na alimentação de larvas de Linguado *Paralichthys orbignyana* (Valenciennes, 1842) e otimização do cultivo do copépodes *Acartia tonsa* (Dana, 1849). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Rio Grande, Brasil.
- Amara, R. e Lagardère, F. (1995). Taille et âge au début de la métamorphose chez la sole (*Solea solea*(L.)) du golfe de Gascogne. *ICES Journal of Marine Science* 52:247–256.
- Barata, E.N., Hubert, F., Conceição, L.E.C., Velez, Z. *et al.* (2009). Prey odour enhances swimming activity and feed intake in the Senegalese sole. *Aquaculture* 293: 100-1007.
- Barros, H.P. e Valenti, W.C. (2003). Ingestion rates of *Artemia* nauplii for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 217: 223-233.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J. e Sargent, J.R. (2003). Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227: 211-220.
- Benítez-Santana, T., Masuda, R., Juárez Carrillo, E., Ganza, E., Valencia, A. *et al.* (2007). Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 264: 408–417.
- Bentle, L.A., Dutta, S. e Betcoff, J. (1981). The sequential enzymatic determination of DNA and RNA. *Anal Biochem* 116:5-16.
- Bergeron, J.P. (1997) Nucleic acids in ichthyoplankton ecology: a review, with emphasis on recent advances for new perspectives. *Jour. Fish Biol* 51: 284–302.
- Blaxter, J.H.S. (1986). Development of sense organs and behaviour in teleost larvae with special reference to feeding and predation avoidance. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 98–114.

- Boujard, T. e Leatherland, J. (1992). Circadian rhythms and feeding time in fishes. *Environ. Biol. Fish* 35: 109–131.
- Buckley, L.J. (1984). RNA – DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* 80: 291 – 298.
- Buckley, L.J., Caldarone, E. e Ong, T.L. (1999). RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* 401: 265–277.
- Buttino I., Ianora A., Buono S., Vitiello V., Malzone M.G. *et al.*. (2012). Experimental cultivation of the Mediterranean calanoid copepods *Temora stylifera* and *Centropages typicus* in a pilot re-circulating system. *Aquaculture Research* 43, 247–259.
- Cahu, C. e Zambonino Infante, J. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200: 161-180.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J. e Takeuchi, T. (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227: 245–258.
- Caldarone, E.M., Wagner, M., Onge-Burns, J. e Buckley, L.J. (2001). Protocol and guide for estimating nucleic acids in larval fish using a fluorescence microplate reader. Ref Doc No. 01–11. Northeast Fisheries Science Center, Woods Hole, EUA.
- Calliari, D., Borg, M., Thor, P., Gorokhova, E. e Tiselius, P. (2008). Instantaneous salinity reductions affect the survival and feeding rates of the co-occurring copepods *Acartia tonsa* (Dana) and *A. Clausi* (Giesbrecht) differently. *Jour. Of Exper. Mar. Bio. And Eco* 362: 18-25.
- Cañavate, J. e Fernández-Dáz, C. (1999). Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174: 255-263.
- Cañavate, J.P., Zerolo, R. e Fernandez-Diaz, C. (2006). Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture* 258: 368–377.

- Cara, J.B., Aluru, N., Moyano, F.J. e Vijayan, M.M. (2005). Food deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead seabream and rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 142: 426–431.
- Chambers, R.C. e Leggett, W.C. (1987). Size and age at metamorphosis in marine fishes: an analysis of laboratory-reared winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) with a review of variation in other species. *Canadian Jour. of Fisheries Aqua. Science* 44:1936–1947.
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., López-Jamar, E., Valdes L. e Ré, P. (1998). Estimation of starvation and diel variation of the RNA/DNA ratios in field-caught *Sardina pilchardus* larvae off north of Spain. *Mar Ecol Prog Ser* 164: 273–28.
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., Amaral, A. e Morais, P. (2007) Sex effect on ratios and concentrations of DNA and RNA three in marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 332: 241-245.
- Chícharo, M.A. e Chícharo, L. (2008). RNA: DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *Int Jour. Mol Sci* 9: 1453–1471.
- Chícharo, M.A., Amaral, A., Faria, A., Morais, P., Mendes, Piló, D. *et al.* (2012). Are tidal lagoons ecologically relevant to larval recruitment of small pelagic fish? An approach using nutritional condition and growth rate. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 112: 265-279.
- Clemmesen, C. (1993). Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100: 177-183.
- Cobcroft, J.M., Pankhurst, P.M., Hart, P.R. e Battaglione, S.C. (2001). The effects of light intensity and algal-induced turbidity on feeding behaviour of larval striped trumpeter. *Jour. Fish Biol.* 59: 1181–1197.
- Conceição, L.E.C., Grasdalen, H. e Rønnestad, I. (2003). Amino acid requirements of fish larvae as post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture* 227: 221-232.
- Conceição, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S. *et al.* (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 268: 64-81.

- Conceição, L.E.C., Aragão, C., Richard, N., Engrola, S., Gavaia, P., Mira, S. e Dias, J. (2009). Novel methodologies in marine fish larval nutrition. *Fish Physiol Biochem* 36:1–16.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A. e Harel, M. (2002). Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtailflounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210: 285–304.
- Cox, E.S. e Pankhurst, P.M. (2000). Feeding behavior of greenback flounder larvae, *Rhombosoeia tapirina* (Gunther) with differing exposure histories to live prey. *Aquaculture* 183: 285 – 297.
- Cunha, I. E Planas, M. (1999). Optimal prey size for early turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) based on mouth and ingested prey size. *Aquaculture* 175: 103-110.
- Dahlhoff, E. (2004). Biochemical Indicators of stress and metabolismo: Applications for Marine Ecological Studies. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 183-207.
- Darias, M.J., Murray, H.M., Martínez-Rodríguez, G., Cárdenas, S. e Yúfera, M. (2005). Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248: 245–252.
- Das, P., Mandal, S.C., Bhagabati, S.K., Akhtar, M.S. e Singh, S, (2012). Important live food organisms and their role in aquaculture. *Aquaculture* 69-86.
- David, A.B. (2003). Status of marine aquaculture in relation to live prey: past, present and future. In: Josianne, G. S and Lesley, A. M. (Eds.), *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell publishing, pp. 1-16.
- Dendrinis, P., Dewan, S. e Thorpe, J.P. (1984). Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile dover sole (*Solea solea* L.) by the use of a staining to improve the visibility of *Artemia* used as food. *Aquaculture* 38: 14–137.
- Dou, S., Masuda, R., Tanaka, M. e Tsukamoto, K. (2003). Identification of factores affecting the growth and survival of the settling Japanese flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 218: 309-327.

- Engrola, S., Mai, M.G., Dinis, M.T. e Conceição, L.E.C. (2009a). Co-feeding of inert diet from mouth opening does not impair protein utilization by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 287: 185–190.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L.E.C., Gavaia, P., Ribeiro, L. e Dinis, M.T. (2009b). Cofeeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture* 288: 264–272.
- Engrola, S., Dinis, M.T. e Conceição, L.E.C. (2010). Senegalese sole larvae growth and protein utilization is depressed when co-fed high levels of inert diet and *Artemia* since first feeding. *Aquaculture Nutrition* 16: 457–46.
- Esteves, E., Chícharo, M.A., Pina, T., Coelho, M.L. e Andrade, J.P. (2000). Comparison of RNA/DNA ratios obtained with two methods for nucleic acid quantification in gobiid larvae. *J Exp Mar Biol Ecol* 245: 43–55.
- Evjemo, J.O. e Olsen, Y. (1997). Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. *Hydrobiologia* 358: 159-162.
- Evjemo, J.O., Reitan, K. I. e Olsen, Y. (2003). Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutrition value. *Aquaculture* 227: 191-210.
- FAO. (2012). The State of the World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Faria, A., Muha, T., Morote, E. e Chícharo, M.A. (2011). Influence of starvation on the critical swimming behaviour of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its relationship with RNA/DNA ratios during ontogeny. *Scientia Marina* 75: 87-94.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J.P., Moyano, F.J., Alarcón, F.J., Díaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Jour. Fish Biol.* 58: 1086–1097.
- Fernández-Díaz, C., Kopecka, J., Cañavate, J.P., Sarasquete, C e Solé, M. (2006). Variations on development and stress defences in *Solea senegalensis* larvae fed on live and microencapsulated diets. *Aquaculture* 251: 573-584.

- Fonseca, V., Vinagre, F.C. e Cabral, H.N. (2006) Growth variability of juvenile soles *Solea solea* and *Solea senegalensis*, and comparison with RNA:DNA ratios in the Tagus estuary, Portugal. *Jour. Fish Biol.* 68: 1551-1562.
- Furuita, H., Konishi, K. e Takeuchi, T. (1999). Effects of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia* nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 170: 59–69.
- Geffen, A.J., Van der Veer, H.W. e Nash, R.D.M. (2007). The cost of metamorphosis in flatfishes. *Jour. of Sea Research* 58: 35-45.
- Gopakumar, G. e Santhosi, I. (2009). Use of copepods as live feed for larviculture of Damselfishes. *Astan Fisheries Science* 22: 1-6.
- Grageda, M.V.C., Kotani, T., Sakakura, Y. e Hagiwara, A. (2008). Effects of feeding copepod and *Artemia* on early growth and behaviour of the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus*, under laboratory conditions. *Aquaculture* 281: 100-105.
- Gwak, W.S. e Tanaka, M. (2002). Changes in RNA, DNA and protein contents of laboratory-reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* during metamorphosis and settlement. *Fisheries Sci.* 68: 27 – 33.
- Gwak, W.S., Tsusaki, T. e Tanaka, M. (2003a). Nutritional condition, as evaluated by RNA/DNA ratios, of hatchery-reared Japanese flounder from hatch to release. *Aquaculture* 219: 503-514.
- Gwak, W.S., Tanaka, Y., Tominaga, O., Tsusaki, T. e Tanaka, M. (2003b). Field evaluation by RNA/DNA ratios on post-release nutritional status of released and wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. *Jour. Of Exp. Mar. Bio. And Eco.* 293: 107-124.
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L.E.C. e Izquierdo, M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: Knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture* 5: 526-558.
- Hunt von Herbing, I. e Gallagher, S.M. (2000). Foraging behavior in early Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) feeding on a protozoan (*Balanion sp.*) and a copepod nauplius (*Pseudodiaptomus sp.*). *Mar. Biol.* 136: 591–602.

- Ikeda, T., Sano, F., Yamaguchi, A. e Matsuishi, T. (2007). RNA/DNA ratios of calanoid copepods from the epipelagic through abyssopelagic zones of the North Pacific Ocean. *Aquatic Biol* 1: 99–108.
- Ji, X., Qiu, Q.B. e Diong, C.H. (2002). Influence of incubation temperature on hatching success, energy expenditure for embryonic development, and size and morphology of hatchlings in the oriental garden lizards, *Calotes versicolor* (Agamidae). *Jour. Exp Zool* 292: 649–659.
- Kaiser, M. J., Attrill, M. J., Jennings, S., Thomas, D. N., Barnes, D. K. A., Brierley, A. S. e Raffaelli, D. G. (2011). *Marine Ecology: Processes, Systems, and Impacts*. 2nd ed. Oxford University Press, EUA.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J. e Rimmer, M.A. (2005). Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepods development. *Aquaculture* 249: 339-351.
- Kolkovski, S. (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200: 181-201.
- Kolkovski, S., Arieli, A. e Tandler, A. (1997) Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquaculture International*5: 527–536.
- Lall, S.P. e Tibbetts, S.M. (2009). *Nutrition, Feeding and Behavior of Fish. Veterinary Clinics of North America, Exotic Animal Practice. Nutrition and Behavior of Uncommon Species*. Vol. 12, n°2, Elsevier.
- Langdon, C. (2003). Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227: 259-275.
- Lavens, P., Thongrod, S. e Sorgeloos, P. (2000). Larval prawn feeds and the dietary importance of *Artemia*. In: New, M.B. e Valenti, W.C. (Eds.) *Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Blackwell Science, pp- 91-111. Oxford, Inglaterra.
- Luizi, F.S., Gara, B., Shields, R.J. e Bromage, N.R. (1999). Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)

- larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture* 176: 101–116
- Lund, I., Steinfeldt, S.J. e Hansen, B.W. (2010). Influence of dietary arachidonic acid combined with light intensity and tank color on pigmentation of common sole (*Solea solea* L.) larvae. *Aquaculture* 308: 159–165.
- Ma, Z., Qin, J.G., Hutchinson, W. e Chen, B.N. (2013). Food consumption and selectivity by larval yellowtail kingfish *Seriola lalandi* cultured at different live feed densities. *Aquaculture Nutrition* 19: 523-534.
- Ma, Z., Zheng, P., Guo, H., Zhang, N., Wang, L., Jiang, S., Qin, J. e Zhag, D. (2014). Effect of weaning time on the performance of *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) larvae. *Aquaculture nutrition*, John Wiley & Sons Ltd, vol. 21, nº5, pp- 670-678. EUA.
- Mai, M.G. (2009). Estudos da ontogenia e da alimentação inicial de larvas de peixe, com ênfase em dourado *Salminus brasiliensis* (Characiformes, Characidae). Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. São Carlos, Brasil.
- 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.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J.G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N. et al. (2003). Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg larval quality in Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*). *Aquaculture* 227: 21–33.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G e Robino, B. (2003). The potencial of tropical paravalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture* 223: 89-106.
- McNamara, P.T., Caldarone, E.M. e Buckley, L.J.. (1999). RNA/DNA ratio and expression of 18S ribosomal RNA, actin and myosin heavy chain messenger RNAs in starved and fed larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.* 135:123–32.
- Meakin, C., Qin, J. E Mair, G. (2008) Feeding behaviour, efficiency and food preference in yabbies *Cherax destructor*. *Hydrobiologia* 605: 29-35.

- Meeren, T., Olsen, R.E., Hamre, K. e Fyhn, H.J. (2007). Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 10.1016/j.aquaculture.2007.11.041.
- Meyer, S., Caldarone, E.M., Chícharo, M.A., Clemmesen, .C, Faria, A.M. *et al.* (2012). On the edge of death: Rates of decline and lower thresholds of biochemical condition in food-deprived fish larvae and juveniles. *Jour. Marine Syst* 93: 11–24.
- Millot, S e Bégout, M. (2009) Individual fish rhythm directs group feeding: a case study with sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*) under self-demand feeding conditions. *Aquat. Living Resour* 22: 363-370.
- Molejón, O.G. e Alvarez-Lajonchère, L. (2003) Culture experiments with *Oithona oculata* Farran, 1913 (Copepoda:Cyclopoida), and its advantages as food for marine fish larvae. *Aquaculture* 219: 471-483.
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L.E.C., Constenla, M., Costas, B. Et al. (2014). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture* 6: 1-37.
- Navarro-Guillén, C., Moyano, F.J. e Yúfera, M. (2015). Diel food intake and digestive production patterns in *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture* 435: 33-42.
- Okumura, D..T. (2011). Estudos ecotoxicológicos com as espécies *Argyrodiaptomus furcatus* e *Notodiaptomus iheringi* (Copepoda, Calanoida). Dissertação de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Olivar, M.P., DIAZ, M.V. e Chícharo, M.A. (2009). Tissue effect on RNA:DNA ratios of marine fish larvae. *Scientia Marina* 73S1: 171-182.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello., V. et al. (2008a). The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphipri* on *clarkia* larviculture: Effects on larval survival and growth. *Aquaculture* 274: 347-352.
- Olivotto, I., Buttino, I., Borroni, M., Piccinetti, C.C., Malzone, M.G. e Carnevai, O. (2008b). The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture* 284: 211-216.

- Olivotto, I., Avella, M., Buttino, I., Borroni, M., Cutignano, A. E Carnevali, O. (2009). Calanoid copepod administration improves yellow tail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture: biochemical and molecular implication. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, International jorç of the Bioflux Society* 2: 355-367.
- Olivotto, I., Piccinetti, C.C., Avella, M.A., Rubio, C.M. e Carnevali, O. (2010a). Feeding strategies for striped blenny *Meiacanthus grammistes* larvae. *Aquaculture research* 41: 307-315.
- Olivotto, I., Tokle, N.E., Nozzi, V., Cossignani, L. e Carnevali, O. (2010b). Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: A feeding study. *Aquaculture* 308: 124-131.
- Osse, J. e Van den Boogaart, J. (1997). Size of flatfish larvae at transformation, functional demands and historical constraints. *Journal of Sea Research* 37: 229–239.
- Papadakis, I.E., Zaiss, M.M., Kyriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P., e Mylonas, C. (2009) Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of sea bream (*Umbrina cirrosa* L.) *Aquaculture* 285: 45-52.
- Papandroulakis, N., Dimitris, P. e Pascal, D. (2002). An automated feeding system for intensive hatcheries. *Aquacultural Engineering* 26: 13-26.
- Parra, G. e Yúfera, M. (2000). Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to prey density. *Jour. of Exp. Mar. Bio. and Eco.* 243: 1-15.
- Pedersen, T., Eliassen, J.E., Eilertsen, H.C., Tande, K.S. e Olsen, R.E. (1989). Feeding, growth, lipid composition and survival of larval cod (*Gadus morhua* L.) in relation to environmental conditions in an enclosure at 70°N in northern Norway. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil international pour l'Exploration de la Mer* 191: 409–420.
- Piccinetti, C.C., Ricci, L.A., Tokle, N. et al. (2012). Malnutrition may affect common sole (*Solea solea*) growth, pigmentation and stress response. Molecular, biochemical and histological implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 161: 361–371.

- Piccinetti, C.C., Tulli, F., Tokle, N.E., Cardinaletti, G. e Olivotto, I. (2014a). The use of preserved copepods in sea bream small-scale culture: biometric, biochemical and molecular implications. *Aquaculture nutrition* 20: 90-100.
- Piccinetti, C.C., Donatti, M., Radaelli, G., Caporale, G. et al. (2014b). The effects of starving and feeding on Dover sole (*Solea solea*, Soleidae, Linnaeus, 1758) stress response and early larval development. *Aquaculture research* 1-15.
- Planas, M., Cunha, I., 1999. Simple techniques for labelling prey and gut content analysis in short-term feeding experiments with fish larvae. *Aquat. Living Resour.* 12: 145-149.
- Polikansky, D. (1982). Influence of age, size, and temperature on metamorphosis in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 514–517.
- Pousão-Ferreira, P.M. (2009). Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. Ed. IPIMAR. Portugal.
- Rasdi, N.W. e Qin, J.G. (2014). Improvement of copepod nutritional quality as live food for aquaculture: a review. *Aquaculture Research*, 1-20.
- Reglero, P., Ortega, A., Blanco, E., Fiksen, Ø., Viguri, F.J., Gândara, F., Seoka, M. e Folkvord, A. (2014). Size-related differences in growth and survival in piscivorous fish larvae fed different prey types. *Aquaculture* 433: 94-101.
- Rema, P., Conceição, L.E.C., Evers, F., Castro-Cunha, M. *et al.* (2008). Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture research* 14: 263-269.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. e 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. e Valente, L.M.P. (2008). Digestive enzyme activity at different developmental stages of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Aquaculture Research* 39, 339–346.
- Rocha, R.J., Ribeiro, L., Costa, R. e Dinis, M.T. (2008) Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture? *Aquaculture Research* 39: 362–369.

- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschar, B., Ribeiro, L., Saele, Ø. e Boglione, C. (2013). Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews In Aquaculture* 5: 559-598.
- Rosenlund, G., Stoss, J. e Talhot, C. (1997). Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155: 183-191.
- 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.
- Santos, F. (2005). Efeito da densidade de estocagem no cultivo do copépode *Acartia tonsa* e a avaliação do seu potencial como alimento vivo na larvicultura do Robalo-Peva *Centropomus parallelus*. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Florianópolis, Brasil.
- Santos, M. (2014). Utilização de copépodes preservados como alimento no cultivo de larvas de dourada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) e de juvenis de linguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858): Impacto no crescimento e qualidade dos organismos. Universidade do Algarve, Aquacultura e Pescas. Faro, Portugal.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. e Bell, J.G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine larval feeds. *Aquaculture* 155: 117-127.
- Sargent, J.R., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, J.G., Bell, M.V. *et al.* (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217–229
- Silva, L., Faria, A.M., Chicharo, M.A. e Garrido, S. (2014). Ontogeny of swimming behaviour in sardine *Sardina pilchardus* larvae and effect of larval nutritional condition on critical speed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 504: 287-300.
- Slembrouck, J., Baras, E., Subaja, J., Hung, L.T. e Legendre, M. (2009). Survival, growth and food conversion of cultured larvae of *Pangasianodon hypophthalmus*, depending on feeding level, prey density and fish density. *Aquaculture* 294: 52-59.
- Soorgelos, P. E Léger, P. (1992). Improved larviculture outputs of marine fish shrimp and prawn. *Jour. World Aqua. Soc.* 23: 251-264.

- Sorgeloos, P. (2000). President's column. *World Aquac.* 31: 3-71.
- Støttrup, J.G. e Norsker, N.H. (1997). Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155: 231-247.
- Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (2003). Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Science Ltd. 318pp. Oxford, Inglaterra.
- Takeuchi, T. (2001) . A review of feed development for early lifestages of marine finfish in Japan. *Aquaculture* 200: 203 – 222.
- Tanaka, M., Kawai, S., Seikai, T. e Burke, J.S. (1996). Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 28: 19 – 31.
- Tanaka, Y., Satoh, K., Yamada, H., Takebe, T. Et al. (2008) Assessment of the nutritional status of field-caught larval Pacific bluefin tuna by RNA/DNA ratio based on a starvation experiment of hatchery-reared fish. *Jour. Of Exp. Mar. Bio. And Eco.* 354: 56-64.
- Thomaz, L.A., Miyako, L., Oshiro, Y., Bambozzi, A.C., Filho, J. e Rosadas, L. (2004). Substituição de *Artemia* sp. Pelo Rotífero *Brachionus plicatilis* na Larvicultura do Camarão-d'Água-Doce (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). *R. Bras. Zootec.*, v.33, n.6, p. 1928-1933.
- Uribe, C.; Folch, H., Enriquez, R. e Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina*, 56 (10): 486-503.
- Velez, Z., Hubbard, P., Hardege, J., Welham, K., Barata, E. E Canário, A. (2011) Evidence that 1-methyl-1-tryptophan is a food-related odorant for the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 214: 153-158.
- Videler, J. J. (2011). An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(2): 337–43.
- Vieira, S., Martins, S., Hawkes, L.A., Marco, A. e Teodósio, M.A. (2014). Biochemical Indices and Life traits of Loggerhead Turtles (*Caretta caretta*) from Cape Verde Islands. *PLoS ONE* 9(11): e112181. doi:10.1371/journal.pone.0112181.

- Villalta, M., Estevez, A., Bransden, M.P. e Bell, J.G. (2008). Effect of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture Nutrition* 14: 232–24.
- Vu, M.T., Jepsen, P.M. e Hansen, B.W. (2014). A comprehensive and precise quantification of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) for intensive live feed cultures using an automated Zoolmage system. *Aquaculture* 422-423: 225-231.
- Wagner, M., Durbin E. e Buckley, L.J. (1998). RNA:DNA ratios as indicators of nutritional condition in the copepod (*Calanus finmarchicus*). *Mar Ecol Prog Series* 162: 173-18.
- Watanabe, T. e Kiron, Y. (1994). Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124: 223–251.
- Yasuda, F. (1960). The feeding mechanisms in some carnivorous fish. *Rec. Oceanogr Jpn.* 5:153-160.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C. e Pascual, E. (1995). Feeding rates of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae on microcapsules. *Aquaculture* 134: 257-268.
- Yúfera, M., Parra, G., Santiago, R. e Carrascosa, M. (1999). Growth, carbon, nitrogen and caloric content of *Solea senegalensis* (Pisces: Soleidae) from egg fertilisation to metamorphosis. *Mar. Biol.* 134: 43–49.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C. e Pascual, E. (2005). Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. *Aquaculture* 248: 253-262.
- Yúfera, M., Darias, M.J. (2007) The onset of feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268: 53–63.
- Zhang, J., Guo, H., Ma, Z., Jiang, S., Wu, K. et al. (2015). Effects of prey color, wall color and water color on food ingestion of larval orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822). *Aquacult. Int.* DOI 10.1007/s10499-015-9890-y.