



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Avaliação da qualidade dos ovos e das  
larvas de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)  
através da manipulação alimentar dos seus  
reprodutores**

Nédia Remália Delma Matusse

**Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica**

**Orientadores:**

Doutora Florbela Soares – IPIMAR-Olhão

Professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva – Universidade dos  
Açores

**ANGRA DO HEROÍSMO**

**2012**

## **Agradecimentos**

Quando atingimos um objetivo, notamos o encaixe perfeito de algumas peças, como um quebra-cabeça. Somente com o suporte de família e amigos é que obtemos êxito.

Primeiramente devo agradecer a Deus por tudo, principalmente pela vida, saúde e juízo.

Ao IPAD (Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento), por ter apostado em mim e contribuído financeiramente para os meus estudos em Portugal.

A Universidade dos Açores, por me ter concedido esta oportunidade de cursar ao Mestrado em Engenharia Zootécnica.

Ao Doutor Pedro Pousão Ferreira responsável da EPPO- Estação de Piscicultura de Olhão por me ter concedido a oportunidade de realizar o ensaio para esta tese durante 10 meses.

À orientadora Doutora Florbela Soares, pela orientação, ajuda material, interesse e disponibilidade demonstrada, importantes para a realização desta tese.

Ao orientador Professor Doutor Joaquim Moreira, por toda ajuda académica durante o mestrado.

A todos os colegas da EPPO-Olhão, pela simpatia e ajuda prestada, em especial a Ana Margarida Gamboa pela colaboração, partilha de conhecimentos e pelo excelente ambiente de trabalho. A sua ajuda foi Divina. Os meus agradecimentos.

À Doutora Laura Ribeiro e a Maria Santos (Milu) pela simpatia e ajuda prestada principalmente nas praticas de laboratório.

Ao colega Miguel Sáenz, pelas inúmeras e generosas ajudas científicas (*su paciencia y amistad conmigo no tiene precio*).

A amiga Daniela Boanares, pela ajuda inicial de material.

A amiga Sandra e ao casal Heliodoro pela contribuição na revisão ortográfica, apoio e muita paciência.

Aos meus pais Delma Fugel e André Matusse pela presença constante, paciência e apoio. Vocês são os melhores pais que poderia sonhar ter.

A paixão da minha vida, meus dois irmãos Adriel Timóteo e Eunício Joel, pelo carinho amizade e compreensão. Sem vocês a vida teria muito menos brilho.

A família Buscapé (Mara, Eduardo e Johana) pela adoção em vossa família durante o tempo em que estive em Olhão. As palavras faltam-me para expressar toda a minha gratidão. Fostes para mim uma nova família, irei guardar-vos para todo o sempre, no meu coração.

A família Lima pelo acolhimento, simpatia e amizade demonstrado no pequenoperíodo que passei na Ilha Terceira (Porto Judeu), mas que para mim foi como uma vida. O meu muito obrigado.

Aos verdadeiros amigos por compreenderem a distância e mesmo assim se fazerem presentes em minha vida.

Enfim, a todos amigos e conhecidos que não mencionei, mas que fizeram parte da minha história em Portugal (Angra do Heroísmo e Algarve - Olhão), que me fizeram sorrir em vários momentos, a todos os meus mais sinceros agradecimentos.

*“Eu poderia suportar, embora não sem dor, se tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!”* - Fernando Pessoa.

Para todos vocês digo “... É impossível ser feliz sozinho.”



*“ O pensamento é o unico lugar onde ainda estamos seguros, onde nossa loucura é permitida e todos os nossos atos são inocentes.”*

**Martha Medeiros**

*“He who gets wisdom loves his own soul; He who keeps understanding will find good”.*

**(Proverbs 19:8)**

## Resumo

Este trabalho tem como objectivo a avaliação da qualidade e quantidade dos ovos e larvas de linguados *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), após terem os progenitores sido alimentados com uma dieta diferenciada. Para isso, um total de quarenta e quatro reprodutores desta espécie foram distribuídos em dois tanques externos e divididos na proporção de (1:1) machos e fêmeas. Aos dois grupos foram se administradas as mesmas quantidades diárias, com dietas diferenciadas no teor dos ácidos gordos essenciais (EPA) e em ácido docosahexaenóico (DHA). Ao primeiro grupo de peixes foi fornecido a dieta enriquecida (DE) que continha 0,81% de EPA e 1,05% de DHA a mais que a dieta controlo (DC) fornecida ao segundo grupo de peixes.

Durante o ensaio decorrido nos meses de setembro a janeiro foi também avaliada a importância e influência de outros parâmetros de qualidade dos ovos e larvas, tais como a periodicidade e peso total das posturas, tamanhos, pesos secos, níveis de atividade proteica e os efeitos da temperatura sobre os ovos e o desenvolvimento das larvas até a abertura da boca.

A produção total de ovos foi obtida em maior quantidade para os peixes alimentados com a dieta enriquecida, tendo neste grupo sido observadas quarenta e sete posturas, trinta e duas mais que as observadas nos peixes pertencentes ao grupo controlo. Os ovos pertencentes ao tanque alimentado com a dieta enriquecida apresentaram também melhores taxas de eclosão que variando entre 40,1% e 100% para o tanque DE, 31,1% e 95,7% para o tanque DC.

A temperatura durante o período de desova variou entre 16,7 e 21,7°C, e não tendo sido manipulada para que não houvesse oscilação dos valores.

As larvas do tanque DC, foram provenientes de ovos com diâmetros e peso seco maiores que os do tanque DE, e em sequência tiveram maiores comprimentos em 0,12 mm e maior peso seco, embora não tenha tido as melhores taxas de eclosão ao longo do tempo.

Na avaliação dos níveis de atividade das catepsinas do tipo B e D nos ovos viáveis e inviáveis provenientes do tanque DE, constou se que houve maior atividade da catepsina D nos ovos inviáveis e menor atividade nos ovos viáveis em relação a catepsina B, sendo que não houveram diferenças significativas nos níveis de atividade da catepsina B entre os ovos viáveis e nos inviáveis.

Tendo em conta as condições em que este trabalho foi realizado, podemos concluir que a administração com uma dieta enriquecida em DHA/EPA durante o período reprodutivo dos linguados, melhora a qualidade e a quantidade de posturas, condicionando quer a disponibilidade de larvas quer a sua qualidade numa fase de desenvolvimento inicial.

## **Abstract**

This work aims to evaluate the quality and quantity of eggs and larvae of *Solea senegalensis*, (Kaup, 1858), after their parents have been fed with a different diet. To do this, a total of forty-four breeding of this species were distributed in two external tanks and divided in the ratio of (1:1) male and female. The two groups were given the same amounts up daily diets differed in content of essential fatty acids (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The First group of fish was administered with enriched diet (DE) with 0,81% of essential fatty acids (EPA) and 1,05% of Docosahexaenoic acid (DHA), more than control diet (DC) supplied to the second group of fish.

During the essay elapsed in the months of September to January was also assessed the importance and influence of other parameters of quality of eggs and larvae, such as the periodicity and total weight of postures, sizes, dry weights, levels of protein activity and effects of temperature on the eggs and the development of the larvae until the opening of the mouth.

The total Production of eggs was in greater quantity for the fish fed by the diet enriched and these also presented best rates of outbreak that varied between 40,05% and 100% for the DE tank, 31,11% and 95,69% for the tank DC.

The temperature during the spawning varied between 16,7 and 21,7°C, and has not been manipulated so that there would not be fluctuation of the values.

The Larvae of the tank DC were hatched from eggs with diameter higher than those of DE, dry weight of, and in larger lengths and larger sequence had dry weight. Having regard to the conditions under which this work was

accomplished, we can conclude that the administration with diet enriched during the reproductive period of sole, improves the quality and quantity of postures, making either the availability of larvae want their quality at an early stage.

In assessing of activity levels of cathepsins B and D type in viable and unviable eggs from the tank DE, consisted that there was increased activity of cathepsin D in eggs unviable and viable eggs in lower activity against cathepsin B, and not there were significant differences in activity levels of cathepsin B between viable and non-viable eggs.

Considering the conditions under which this work was performed, we conclude that administration with a diet enriched in DHA/EPA during the reproductive period of the *sole senegalensis*, improves the quality and quantity of postures, condition necessary of larvae for their quality an early stage of development.

Key-words: *Solea senegalensis*; flatfish; fatty acids; DHA/EPA; intensive producticions

# Índice Geral

Agradecimentos .....	2
Resumo .....	6
Abstract .....	8
Índice Geral .....	10
Lista de símbolos e abreviaturas .....	12
I. Introdução.....	15
II. Revisão Bibliográfica .....	18
2.1 Evolução da Aquacultura.....	18
2.1.1 Aquacultura em Portugal.....	19
2.2 Biologia do <i>Solea Senegalensis</i> Kaup, 1858 .....	20
2.2.1 Taxonomia e distribuição geográfica.....	20
2.3 Linguado em Aquacultura.....	23
2.3.1 Reprodução do Linguado .....	24
2.3.2 Ovos e larvas de Linguado .....	27
2.3.2.1. Ação das catepsinas nos ovos .....	32
2.3.2.2 Desenvolvimento inicial das larvas .....	35
2.3.3 Nutrição dos Linguados.....	36
2.3.3.1 Função dos lípidos na alimentação.....	38
2.3.3.2 Regime alimentar de reprodutores da <i>Solea segalensis</i> .....	41
III. Material e Métodos .....	44
3.1 Descrição do ensaio.....	44
3.1.1 Acondicionamento dos reprodutores.....	44
3.1.2 Parâmetros físico-químicos .....	46
3.1.3 Recolha dos ovos e caracterização das posturas.....	47
3.1.4 Análise estatística.....	52

IV. Resultados.....	54
4.1 Condições ambientais dos tanques e alimentação dos reprodutores.....	54
4.2 Efeito das diferentes dietas (DE e DC) na quantidade e qualidade das posturas de <i>S. senegalensis</i> .....	55
4.2.1 Taxas de eclosão.....	56
4.2.2 Tamanhos dos ovos e das larvas .....	59
4.2.3 Qualidade dos ovos através da atividade catepsina B e D.....	62
4.3 Ensaio à temperatura de 17°C desde a eclosão dos ovos até à abertura da boca, com ovos provenientes dos tanques DE e DC .....	65
V. Discussão .....	69
VII. Conclusões.....	78
VIII. Referências Bibliográficas .....	79
IX. Anexos .....	87
9. 1 Anexo I .....	87

## **Lista de símbolos e abreviaturas**

ARA – Arachidonic Acid (ácido araquidónico)

°C – graus Celsius

DAE – Dia após a eclosão

DHA – Docosahexaenoic Acid (ácido docosahexaenóico)

DC – Dieta Controlo (ração comum oferecida ao segundo grupo de reprodutores de linguados durante o presente trabalho)

DE – Dieta Enriquecida em DHA/EPA (ração oferecida ao primeiro grupo de reprodutores de linguados durante o presente trabalho)

DGPA – Direção Geral das Pescas e da Aquacultura

EFA – Essential Fatty Acids (ácidos gordos essenciais)

EPA – Eicosapentaenoic Acid (ácido eicosapentaenóico)

FA – Fatty acid (Ácido gordo)

FSH – Follicle-stimulating hormone (hormona estimulante do folículo)

F1 – Cruzamento simples

GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone (hormonas gonadotropinas)

GtHm – Gonadatrofina maturacional plasmática

HUFA – Highlyunsaturated Fatty Acids (ácidos gordos polinsaturados)

kg – Quilograma

l – Litro

LINOLEICO – Ácido linoleico (18:2n-6)

LINOLÉNICO – Ácido linolénico (18:3n-3)

LH – Luteinizing hormone (hormona luteizante)

lux – Lúmen

MUFA – Monounsaturated Fatty Acids (ácidos gordos monoinsaturados)

mg – Miligrama

µg – Micrograma

ppt (°/oo) – Partes por milhar

PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids (ácidos gordos polinsaturados)



# I. Introdução

## I. Introdução

A procura de alimento sempre foi uma das maiores preocupações da vida do Homem, desde a recolha de frutos, vegetais, caça e pesca. Por isso, passou a cultivar terras e a domesticar animais tornando-se autossuficiente.

A aquacultura é uma atividade que engloba o cultivo de organismos aquáticos (algas, moluscos, crustáceos e peixes), sendo necessária a intervenção humana para o sucesso da mesma.

Os peixes vivem num meio que experimenta trocas constantes de luz, temperatura, salinidade, pH, oxigénio, pressão barométrica, precipitação, presença de alimentos, etc. A sobrevivência, reprodução e crescimento dos mesmos dependem da percepção destes estímulos e das condições adequadas a cada espécie.

Na região marítima do sul da Europa, nas últimas duas décadas houve uma maior concentração na produção em aquacultura de dourada (*Sparus aurata*) e de robalo (*Dicentrarchus labrax*), surgindo uma necessidade científica e tecnológica para desenvolver cultivos de novas espécies com potencial para a aquacultura. Um dos promissores candidatos foi o linguado da família dos *soleidae*, que é uma espécie bem adaptada a climas quentes e criada em viveiros ao longo da costa sul de Portugal e Espanha (Dinis *et al.*, 1999).

Na aquacultura, um dos aspectos mais estudados é a gestão nutricional dos lotes principalmente dos reprodutores que melhoram desse modo a qualidade das larvas. A baixa qualidade do ovo é um factor de importante restrição para expansão da produção de peixes em aquacultura e eles são utilizados para se estudarem os níveis de mobilização das proteínas vitelinas (Carnevali *et al.*, 2001).

Os produtos sintetizados no ovo, incluindo as enzimas vitais como as catepsinas e os mecanismos que controlam as suas expressões, desempenham um papel crucial na determinação da qualidade do ovo (Brooks *et al.*, 1997).

A realização deste trabalho permitiu comparar a qualidade e quantidade dos ovos e das larvas produzidas pelos reprodutores de *S. senegalensis* selvagens, alimentados por uma ração enriquecida em ácidos gordos, de modo a averiguar o efeito dessa dieta na sua prole, melhorar o conhecimento sobre a influência nutricional, na sobrevivência e desenvolvimento das larvas a determinadas temperaturas.



## II. Revisão Bibliográfica

## **II. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Evolução da Aquacultura**

A aquacultura é uma atividade milenar, com 4.000 a 5.000 anos de história. A nível mundial tem-se desenvolvido de forma gradual e, durante a segunda Guerra Mundial beneficiou de avanços tecnológicos e.g. eco-sonar para detecção dos cardumes, aperfeiçoamento dos métodos de captura, etc., tornando-se desde então a atividade na área da produção alimentar que mais se desenvolveu, sendo responsável por cerca 50% do peixe consumido no mundo (Furuya, 2001).

Segundo os dados da Food and Agriculture Organization (FAO), em 2005 houve uma produção mundial de pescados aquícolas na ordem de 158 milhões de toneladas, cerca de 124 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo humano, sendo 90% deste valor destinado ao mercado Chinês (Öczan, 2010).

Entre as espécies mais cultivadas, os peixes que apresentam maior percentagem de produção são os peixes de água doce com 60,7%; os peixes diádromos representam 7%, os salmonídeos 2,47% e os moluscos 23,6% (FAO, 1996).

A pesca em pequena escala pode garantir a alimentação dos povos, reduzindo o índice de pobreza e melhoria do desenvolvimento económico de países em vias de desenvolvimento. Além disso, a aquacultura serve, também para a produção de peixes para fins lúdicos e ornamentais.

Segundo Branco (2003) e Nomura (2010), há duas décadas que a aquacultura se tem transformado essencialmente numa prática mais focada em providenciar proteínas, omega-3 e omega-6 na alimentação humana, uma vez

que estas são as melhores qualidades dietéticas que os mariscos possuem. O seu ritmo contínuo desempenha um papel socioeconómico fundamental, aproveitando-se dos recursos naturais.

A pesca e a aquacultura são atividades competitivas, mas podem complementar-se ao serem administradas em simultâneo, sendo a aquacultura o suporte das pescas pelo repovoamento das marés, na restauração da riqueza pesqueira de uma determinada região, ou ao aliviar a pressão exercida sobre algumas espécies através da sua oferta como alternativa ao consumidor (Pillay & Kutty, 2005).

### **2.1.1 Aquacultura em Portugal**

Portugal possui características edafoclimáticas por causa da sua situação geográfica, que permitem a influência do mar Mediterrâneo e do oceano Atlântico (Diniz *et al.*, 1998). Isso faz com que o País desfrute de um potencial único na atividade aquícola e no desenvolvimento de algumas espécies com grande interesse comercial. É também um dos países europeus que está referenciado como detentor de um elevado potencial para esta atividade.

O país apresenta um consumo de peixe *per capita* bastante elevado, que segundo dados da DGPA (Direção Geral das Pescas e da Aquacultura) em 2005 foi cerca 59,3 kg, colocando-o em 3º lugar a nível mundial depois do Japão e da Islândia (Ildefonso, 2011).

Com queda da atividade pesqueira, a aquacultura pode constituir uma importante alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado. Devido a restrições burocráticas e legais esta atividade está longe de atingir o grau de desenvolvimento desejado para o País.

A espécie *Solea senegalensis* e a *Scophthalmus maximus* (Pregado), são também dois fortes candidatos à aqualtura em Portugal e tem-se verificado o incremento da sua produção. Apesar do preço de mercado da espécie *S.senegalensis* ser elevado, é uma espécie que muito se adapta às condições existentes.

## **2.2 Biologia do *Solea Senegalensis* Kaup, 1858**

### **2.2.1 Taxonomia e distribuição geográfica**

A *S.senegalensis* Kaup, 1858 é uma espécie nova para a aquacultura, vulgarmente conhecida em Portugal, Espanha e nos países Lusófonos por linguado.

Esta espécie está bem adaptada às águas subtropicais e temperadas, a ambientes de salinidade elevada (30 e 35 ppm) com forte evaporação. Ela encontra-se constantemente, nas águas do oceano Atlântico (nos estuários do Tejo, do Sado e da costa algarvia), próximo à costa das regiões do Senegal até La Rochelle (França); no mar mediterrâneo, nas costas do norte de África, Espanha, Itália e Grécia (Figura 1), em profundidades de 80 a 100 m (Branco, 2003 e Öczan, 2010).

As larvas desta espécie ao eclodirem são planctónicas com um comprimento de  $2,4 \pm 0,1$ mm, com uma fisionomia comum à das outras espécies e uma vida pelágica durante 15 a 20 dias. Ao terminarem a metamorfose tornam-se bentónicas com uma condição dextrógira ou levógira (migração do olho esquerdo para o lado direito da cabeça) e ausência de simetria bilateral (Pleuronectiforme), comum a todos os peixes com forma plana (Teixeira, 1998 e Branco, 2003).

Dentro desta ordem, está incluída a família *soleidae*, cujos peixes são bentônicos, que em ambiente selvagem utilizam o estuário dos rios como berçário para os indivíduos juvenis (Antunes, 2011). Apresentam um corpo oval e achatado, cabeça redonda e pouco saliente, focinho arredondado e uma boca pequena em forma arqueada semi-circular que alcança a borda inferior do olho direito, sem dentes e com a mandíbula superior mais desenvolvida que a parte inferior (Sarasquete, 2005).



**Figura 1:** Distribuição geográfica de *Solea senegalensis* em cor de rosa (Porta, 2006).

São pouco ativos e demersais (costumam permanecer em fundos arenosos ou lodosos). Além disso, têm como base alimentar pequenos invertebrados, embora consigam resistir a longos períodos de fome (Dinis *et al.*, 1999). A cor do manto superior é acastanhada, e tem a particularidade de poder modificar-se devido aos mecanismos de mimetismo que possuem.

A espécie *Solea senegalensis* (Figura 2) é uma espécie de peixes teleósteos que possui as seguintes características taxonômicas apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1-** Posição sistemática de *Solea senegalensis*

---

Filo: Vertebrata

Superclasse: Osteictios (*Osteichthyes*)

Classe: Actinopterygidos (*Actinopterygii*)

Ordem: Pleuronectiformes (*Pleuronectiformes*)

Família: Soleidos (*Soleidae*)

Gênero: *Solea*

Espécie: *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)

---

Segundo Öczan (2010), a espécie *S. senegalensis*, anteriormente denominada como *Solea melanochira*, era confundida com a espécie *Solea vulgaris* no Atlântico e com a *S. vulgaris* e *S. aegyptica* no mediterrâneo, tendo adquirido o atual nome nos trabalhos de Chabanaud (1927), registados no Atlântico e posteriormente na costa norte da Tunísia (Goucha & Ktari, 1981), no lago Ichkeul (Chaouachi & Hassine, 1998), no Golfo de Lyon (Quignard *et al.*, 1986) e no Mediterrâneo (Rodríguez & Rodríguez, 1980).



**Figura 2:** Exemplos adultos de *Solea senegalensis* durante a época de posturas na primavera, com aproximadamente 45 cm de comprimento e 1,8kg de peso corporal.

### **2.3 Linguado em Aquacultura**

O linguado é um peixe de grande valor comercial, que se tornou uma espécie prioritária para a diversificação da aquacultura nos países banhados pela costa mediterrânea (Dinis *et al.*, 1999). Embora seja uma nova espécie para as águas mediterrâneas, é de grande potencial reprodutivo e de rápido crescimento, sendo importante a sua utilização como espécie aquícola.

Como em qualquer outra indústria de produção animal, o controle zootécnico, tem sido a chave para o seu sucesso. Os linguados, normalmente têm desovas eficazes mas, em cativeiro, torna-se fundamental a racionalização alimentar, pois esta tem influência na reprodução, na quantidade e qualidade das posturas, no tamanho dos ovos e das larvas até à abertura da boca.

Um dos problemas observados na linhagem F1 produzida em cativeiro é a disfunção reprodutiva e o método atual para superar essa dificuldade é a obtenção de gâmetas por descascamento e usá-las para a fertilização artificial

(Rasines *et al.*, 2012). Esta disfunção tem causa ainda desconhecida mas, pensa-se ser devido a vários factores ambientais, tais como: o maneio incorreto das larvas na fase inicial, a alimentação defeituosa que leva ao *stress*, perda de peso de alguns e conferindo-lhe assim uma baixa qualidade dos espermatozóides e dos ovócitos.

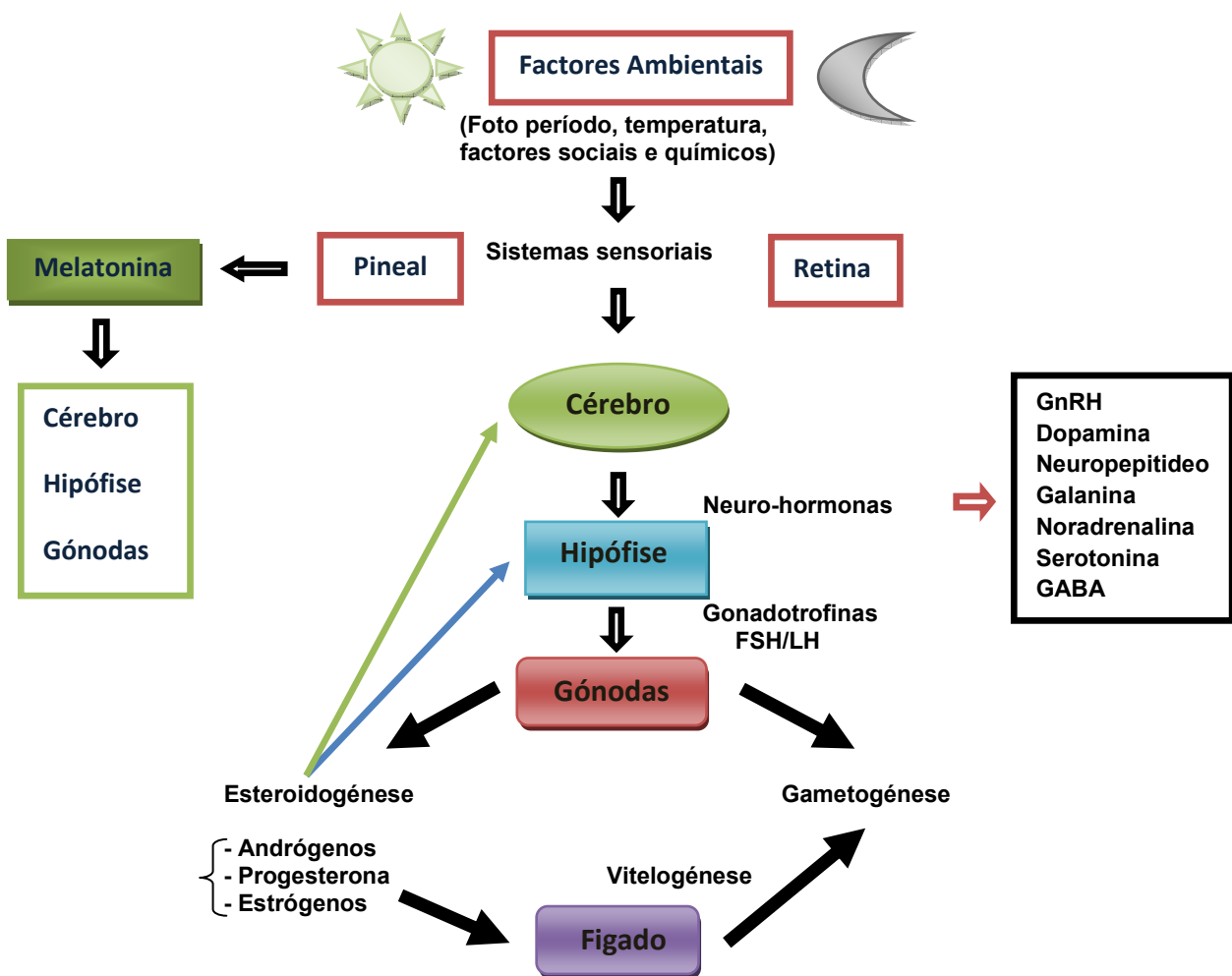
### **2.3.1 Reprodução do Linguado**

Os linguados são peixes gonocóricos, têm uma maturação sexual que ocorre naturalmente quando atingem 3 a 4 anos de vida. Nessa fase costumam apresentar tamanhos entre 25-32 cm de comprimento (Sarasquete, 2006; Idelfonso, 2011). As fêmeas apresentam um par de ovários que estão situados na região do ventre, na cavidade abdominal. Os machos têm os testículos de forma triangular que se localizam no dorso do abdómen por baixo da bexiga-natatória. O tamanho dos testículos e dos ovários varia consoante a idade do peixe e a fase do ciclo reprodutivo e, logo após iniciarem a fase de maturidade sexual a taxa de crescimento dos peixes reduz para ambos os sexos (Dinis *et al.*, 1999).

O comportamento reprodutivo é influenciado por estímulos internos (genéticos, biológicos e alimentação) e por estímulos externos (natureza, mecanismos de influências físicas, bióticas e sociais) que afetam a evolução normal do processo reprodutivo e perturbam o sistema endócrino em níveis diferentes no eixo pineal-cérebro-hipófise-gónada (Figura 3), que regula as respostas comportamentais necessárias para que ocorra a reprodução (Cuento, 2009).

O órgão pineal e o cérebro desempenham um papel importante na atividade do eixo reprodutivo, já que possuem funções receptoras, integradoras

e efectoras. Segundo Gozalbo (2008) estes estímulos actuam sobre o hipotálamo desencadeando a síntese de neurotransmissores. O neuropeptídeo liberta as hormonas gonadotropinas (GnRH) que chegam à hipófise através da glândula pituitária pela enervação direta das neuronas hipotalámicas. As células formadoras de gonadotropinas, que é a hormona estimulante do folículo (FSH) e a hormona luteizante (LH), são secretadas para a corrente sanguínea estimulando as gónadas através de recetores específicos, a produzirem esteróides sexuais e fatores de crescimento. Pouco se sabe como é que as informações ambientais atuam no eixo do hipotálamo-hipófise-gónadas.



**Figura 3:** Esquema representativo do eixo do hipotálamo-hipófise-gónadas, que governa o processo reprodutivo nos peixes.

A melatonina é o principal mediador dos sinais fotoperiódicos na maturação gonadal nos peixes, no caso dos peixes teleósteos os níveis de melatonina variam de acordo com o ciclo dia/noite, sendo altos durante a noite e baixos durante o dia (Oliveira *et al.*, 2009).

O fotoperíodo e a temperatura são responsáveis por regularem as atividades fisiológicas, através da glândula pineal que é a responsável por traduzir estímulos ambientais em impulsos hormonais e/ou neurais ao sistema nervoso central e periférico, controlando desta forma muitos processos fisiológicos nos peixes sazonais (Iseki *et al.*, 2008). Nos peixes teleósteos a ovulação e a desova ocorre durante a noite, isso porque os picos da gonadotrofina maturacional plasmática (GtHm) neste período influenciam a secreção e a liberação da testosterona, da  $17\alpha$  hidroxiprogesterona ( $17\alpha$  OH-P) e da  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxiprogesterona ( $17\alpha$   $20\beta$  diOH-P), sendo esta a hormona mais importante na maturação final dos ovócitos (Muniz *et al.*, 2008), atuando sobre o ovócito através de um recetor de membrana, o qual ativa o factor promotor de maturação no citoplasma do ovócito, responsável pela meiose (Gozalbo, 2008).

Alguns níveis de temperatura da água inibem a postura dos ovos durante o período reprodutivo. A temperatura favorável situa-se entre  $16,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (Dinis *et al.*, 1999; Branco, 2003 e Idelfonso, 2011). Este intervalo de temperatura está ligado à sobrevivência da prole na fase pelágica. Assim sendo, a temperatura é um factor crítico e indicador externo do início e do término das posturas.

Uma desova natural de linguado ocorre imediatamente depois do anoitecer (Oliveira *et al.*, 2009), durante a primavera e início do verão (Março até Julho) com um máximo de emissão de ovos em Maio, e no início do

Outono, quando as temperaturas são similares (Dinis *et al.*, 1999; Beirão *et al.*, 2011), isso porque nessa época há uma maior disponibilidade de alimentos, favorecendo a sobrevivência das larvas em ambiente selvagem.

Nos machos a produção espermática ocorre normalmente ao longo do ano, sem estimulação hormonal ou alterações dos factores bióticos (Anguis & Canavate, 2005; Cabrita *et al.*, 2006). No entanto, pode sofrer alguns problemas tais como, a produção reduzida do esperma e do aspecto viscoso, indutor de consequências negativas para a fertilização natural bem como para a artificial. Esta baixa qualidade da produção espermática ocorre normalmente pelo facto do reprodutor se encontrar em cativeiro, pela modificação de estação, aumento da temperatura, idade do reprodutor, indisponibilidade de alimentos e de factores abióticos (Mañanos *et al.*, 2009; Santos, 2011), enquanto para o desenvolvimento dos ovos nas fêmeas, ainda que em estações propícias, é necessário a presença dos machos para que estas fiquem estimuladas.

### **2.3.2 Ovos e larvas de Linguado**

Para garantir o repovoamento dos tanques de cultivo, a chave principal é o controlo reprodutivo que depende essencialmente de um bom planeamento e cuidados com os reprodutores. A relação macho e fêmea em cativeiro deve ser de 1:1 ou 2:1, a fim de favorecer a fecundação e minimizar o número de posturas não fecundadas, o que vem limitando no cultivo desta espécie.

A incubação dos ovos de peixe em cativeiro tem sido um sucesso na aquacultura, facilitando o aumento no número de lotes com características parentais desejadas, sendo assim possível avaliá-los, quer a nível quantitativo quer qualitativo.

A ovogénese é o processo pelo qual as células primordiais e germinais formam um ovo pronto a ser fertilizado. Um ovo não fertilizado ou gâmeta feminino é um ovócito bloqueado em metáfase II (Bobe & Labbé, 2010), e estes são incapazes de desenvolver embriões, limitando assim a reprodução controlada de uma espécie (Carnevali *et al.*, 2001).

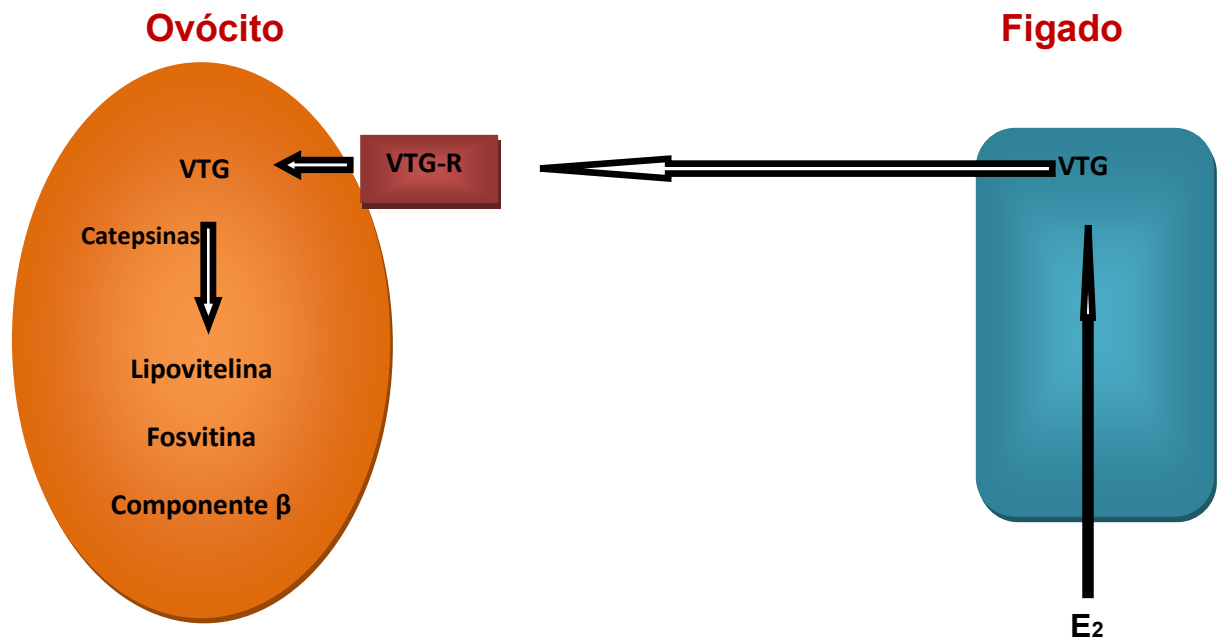
Quando o ovócito chega ao seu máximo estado de desenvolvimento, no final da vitelogénese, fica preparado para a maturação. Após a postura dos ovos e até ao início da alimentação exógena das larvas, o saco vitelino é a única fonte de nutrientes disponível para o desenvolvimento embrionário. Isto deve-se ao facto de as membranas estruturais dos ovos e embriões apresentarem uma elevada hipermeabilidade (Conceição *et al.*, 2009).

O ovo é composto pelo vitelo, constituída por uma mistura de matéria orgânica que é utilizada para a nutrição durante a fase de desenvolvimento embrionário. A composição bioquímica é específica para cada espécie e dentro dela variam de acordo com a sazonalidade, a localização geográfica e tipo de dieta que o peixe tem quando adulto. A composição dos ovos quer lipídica, quer proteica (aminoácidos essenciais) é afectada directamente pela alteração da composição da dieta do reprodutor, servindo como indicador de qualidade da dieta.

A estratégia fisiológica é de maximizar a qualidade da composição bioquímica do ovo para garantir a maior sobrevivência das larvas (Riveiro *et al.*, 2003). A maioria dos ovos pelágicos contém gotas de óleo em número e dimensões variadas (0,1 a 1,0 mm). O tamanho dos ovos também é considerado um indicador de qualidade, porque muitas vezes o tamanho do ovo está relacionado com a viabilidade das larvas em incubação (Geffen & Nash, 2012).

O principal componente do vitelo é a fosfoglicoproteína vitelogénica (VTG), que em alguns peixes é sintetizada no fígado sob controlo hormonal, transportada pelo sangue e incorporada no ovócito em crescimento, cujo metabolismo é mediado pelo recetor endocitose e posteriormente transformado em proteínas vitelinas: lipovitelina e fosvitina (Carnevali *et al.*, 2008 e Gozalbo, 2008). Depois disto ocorre o processo de translocação citoplasmática da fosfoglicoproteína vitelogenica, que é acompanhada por um processo proteolítico específico, processado nas proteínas da gema (Figura 4). Estas proteínas são derivadas da clivagem enzimática do soro proteico materno durante a fase da vitelogenese.

Durante o desenvolvimento embrionário, os materiais acumulados no ovócito incluindo fontes de energia são rapidamente degradados para produzir e.g. aminoácidos livres, FAs, fósforo e cálcio, posteriormente utilizados pelo embrião (Carnevali *et al.*, 2001).



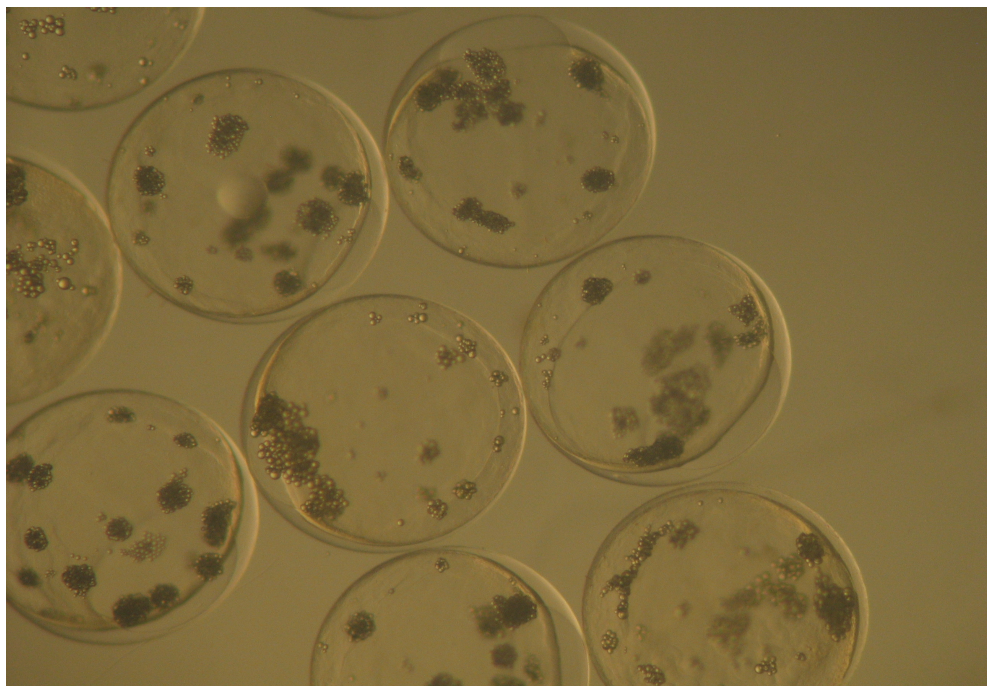
**Figura 4:** Esquema resumo do processo geral da vitelogenese.

Nos sistemas intensivos existem algumas desvantagens na utilização dos ovos das posturas, especialmente quando se trata da contribuição de gâmetas, de um grande número de peixes em cativeiro, tornando difícil a identificação para efeitos parentais. Outro problema encontrado no estudo da dinâmica da população dos peixes é da sobrevivência dos primeiros estágios de desenvolvimento (ovo/larva) bem como os factores que a condicionam (Meneses, 2003).

Assim, a fecundidade está relacionada com o tamanho dos reprodutores e com as condições ambientais, enquanto as posturas estão relacionadas com o tipo de desenvolvimento ovocitário e com a frequência da libertação de ovócitos maduros no período da reprodução.

Os ovos podem ser libertados, depositados no substrato, colocados em ninhos ou guardados pelos progenitores. No caso dos linguados, pela característica da espécie, os ovos contêm numerosos aglomerados de glóbulos

lipídicos (Figura 5), que ajudam no ajuste da sua densidade em direção às correntes de água.



**Figura 5:** Foto ilustrativa de ovos viáveis de *Solea senegalensis*

A temperatura e a salinidade afectam a flutuabilidade dos ovos e posteriormente das larvas. Os ovos pelágicos como os do linguado têm como característica principal a flutuabilidade, devido ao processo de hidratação durante a reprodução que é responsável por esta característica. Além disso, existe a proteólise D do vitelo que também leva à flutuabilidade mas que afecta a fertilidade e a sobrevivência dos ovos gerados (Carnevali *et al.*, 1999).

A flutuação é importante na desova dos peixes, porque permite que este tipo de ovos evite condições de baixo nível de oxigênio das camadas profundas (Guisande *et al.*, 1998), nos ovos dos linguados a flutuabilidade pode ser comprometida pela salinidade da água, que ao atingir percentagens inferiores a 30 ppt desencadeia a deposição dos ovos.

As formas e padrões do ciclo de vida dos peixes são as mais variadas entre os vertebrados. Existem estratégias de reprodução, que possibilitam o sucesso em ambientes distintos. Estas são conhecidas pelo elevado grau de fecundidade, libertando entre centenas a milhões de ovócitos anualmente (Araújo, 2009).

### **2.3.2.1. Ação das catepsinas nos ovos**

A baixa qualidade do ovo é um factor de importante restrição para expansão da produção de peixes em aquacultura. Esta é definida como a capacidade de um ovo produzir um embrião viável e descendentes, e determinada pelas propriedades intrínsecas do desenvolvimento do ovócito em si e do ambiente no qual o ovo está a ser incubado.

Os embriões são bons indicadores para se estudarem os níveis de mobilização das proteínas vitelinas durante a embriogénese dos peixes, pois é nessa fase que o embrião em formação requer aminoácidos livres provenientes das proteínas das reservas vitelinas para o seu rápido desenvolvimento (Carnevali *et al.*, 2001).

Segundo os mesmos autores, durante o desenvolvimento embrionário há um acumular de materiais nos ovócitos (fontes de energia) que são rapidamente degradados para produzir aminoácidos livres, ácidos gordos, fosforo, cálcio, etc, que são posteriormente utilizados pelo embrião.

Durante o desenvolvimento embrionário existem enzimas responsáveis pela degradação das proteínas do vitelo, denominadas catepsinas. Elas sob determinadas condições fisiológicas, são localizados nos lissosomas, em resposta a certos sinais que são libertados a partir dos lissosomas para o citoplasma, onde eles desencadeam a morte celular por apoptose através de

várias vias, incluindo a activação ou a libertação de factores pro-apoptóticos a partir da mitocôndria (Chwieralski *et al.*,2006).

Nos ovos esta degradação é bem controlada por inibidores específicos das proteases que estão associadas às proteínas do vitelo (Carnevali *et al.*, 2001).

A qualidade dos ovos dos peixes pode variar muito, podendo estes serem dependentes dos genes paternos. Os produtos sintetizados no ovo, incluindo as enzimas vitais como as catepsinas e os mecanismos que controlam as suas expressões, são susceptíveis de desempenhar um papel crucial na determinação da qualidade do ovo (Brooks *et al.*,1997).

Segundo Carnevali *et al.* (2006) no final da fase de reprodução, as enzimas lisossomais encontram-se também envolvidas com a reabsorção dos ovócitos e são reguladas por diversos factores incluindo hormônas sexuais, tal como o estradiol. A degeneração dos folículos que não atingiram a maturação (atrésia folicular) ocorre sob controlo das catepsinas e afetam o potencial da fecundidade.

As atividades das catepsinas B e D atuam de forma diferente nos ovos entre espécies diferentes ou até na mesma espécie de peixe. As funções e características das catepsinas (B e D) em estudo nos ovos viáveis e inviáveis são:

a) Catepsina B

A catepsina B é uma cisteino-protease lisossomal, que possui tanto atividade endopeptidática como a atividade carboxidipeptidil-peptidásica, o que a distingue das demais enzimas da família da papaína Nägler *et al.*, (1997). Ela é encontrada em diferentes tecidos eg. tecidos tumorais em investigações

clínicas. E isto faz desta catepsina um indicador confiável no diagnóstico e prognóstico de cancro (Kos & Lah, 1998).

Segundo Fu *et al.*, (1998) as funções normais da catepsina B estão relacionadas com processos celulares como o de degradar proteínas da matriz extra-celular, no processo de reciclagem de proteínas e durante o metabolismo do vitelo em ovócitos de peixes (Tingaud-Siqueira *et al.*, 2010), além disso especula-se que ela pode estar envolvida na ativação inicial das catepsinas D e L, e no controle da morte celular programada a apoptose (Carnevali *et al.*, 2001).

Segundo os mesmos autores, em ovos de peixes marinhos, a atividade da catepsina B é visível em ovos inviáveis e durante todos os estados de desenvolvimento embrionário dos ovos viáveis, com picos elevados em relação as catepsinas (A, D e L) em 100% de atividade na fase de morula, tendo valores mais baixos e semelhantes no estado de blastula, gastrula e segmentação, voltando a aumentar à eclosão em ovos de robalos.

#### b) Catepsina D

A catepsina D que também é conhecida como protéase aspártica, é uma enzima proteolítica da família da pepsina, com máxima atividade nos ovos durante a incubação, embora possuam níveis de atividade enzimática significativamente altos em ovos inviáveis (Carnevali *et al.*, 1999). A catepsina D é considerada um marcador de má qualidade de ovos (Carnevali *et al.*, 2001).

Esta catepsina é também encontrada em muitos tipos de células diferentes, estando envolvida no processo de apoptose como ativador plasminogênico, que é muito importante no desenvolvimento embrionário, eg. a

regressão da cauda nos anfíbios; esse processo pode ser um dos responsáveis pelo alto nível de atividade destas catepsinas nos ovos inviáveis, e desempenha um papel importante na produção de ovos viáveis.

O nível de atividade da catepsina D durante a ovogênese depende do estado de maturação dos ovócitos, e isso pode estar relacionado com as necessidades de energia por parte dos embriões, que durante a primeira fase do desenvolvimento embrionário quando as divisões são rápidas e sem aumento do volume, a mobilização do vitelo e os de catepsina D são baixos (Carnevali *et al.*, 1999).

O pico máximo de atividade enzimática é observada durante a fase de gástrula e na fase de blástula lenta em ovos de dourada, quando a divisão celular é lenta. Segundo Carnevali *et al.* (2001), a inibição da catepsina D resulta no bloqueio da proteólise do vitelo e desenvolvimento anormal ou mesmo mortalidade dos embriões.

Segundo Brooks *et al.* (1997), a catepsina D nos ovos de peixes é responsável por mediar o processamento das proteínas do vitelo no ovócito, e é vital para a produção de um ovo viável.

### **2.3.2.2 Desenvolvimento inicial das larvas**

A larvicultura é uma parte do processo da aquacultura, com dificuldades de atingir sucesso, devido ao índice elevado de mortalidade durante esta fase.

Normalmente, numa desova natural eclodem entre 20% a 70% dos ovos no sistema de cultivo intensivo (Bock & Padovani, 2000). Após a eclosão, a mortalidade está frequentemente relacionada com a alimentação, que quando não atinge as exigências nutricionais dos reprodutores, promove um maior depósito de reservas vitelinas aos ovos.

Além disso, importa salientar também as condições abióticas desfavoráveis, a densidade da população adulta, em que quanto maior a quantidade dos reprodutores, maiores são as probabilidades de abortos dos ovos, o parasitismo e a existência de predadores (Borges *et al.*, 2001).

Os ovos dos peixes marinhos são ricos em Hufas na série n-3 e os seus reprodutores têm uma exigência nutricional em ácidos gordos essenciais (Ferreira, 2009), que são importantes para o desenvolvimento embrionário nas primeiras fases larvares. A deficiência destes ácidos gordos pode levar a patologias, como o *stress*, deficiências no crescimento, problemas de pigmentação, da migração do olho durante a metamorfose em linguados juvenis e aumento da mortalidade.

No momento final de absorção das reservas vitelinas (abertura da boca), a fase de alimentação exôgena é muito crítica e está associada a um alto nível de mortalidade, o que pode ter uma relação com a escassez de alimento adequado, com a predação, a densidade e a existência de condições abióticas desfavoráveis.

### **2.3.3 Nutrição dos Linguados**

O papel da nutrição na reprodução de peixes tem sua importância principalmente para o desenvolvimento reprodutivo. Mesmo reconhecendo a importância da adequada alimentação para a reprodução e para a qualidade das posturas em peixes teleósteos, os requisitos nutricionais continuam a ser uma das áreas menos evoluídas no campo da nutrição de peixes (Fernández-Palacios & Izquierdo, 2009). Mas, isto é devido à necessidade de grandes instalações, quer em ambientes fechados ou abertos, para manter os grupos.

Na aquacultura os custos totais relacionados com a alimentação na produção são cerca de 50% a 80% no seu total (Turchini *et al.*, 2011). O assunto ligado à nutrição, principalmente nos reprodutores, não é bem compreendido nas pesquisas de peixes ósseos. Para se oferecer uma dieta tem que se ter conhecimento adequado das várias informações sobre a espécie a ser criada, a fase de crescimento, assim como o valor nutritivo dos ingredientes que irão compor a dieta.

Os alimentos são substâncias que, depois de ingeridas pelo animal, podem ser digeridas, absorvidas e assimiladas, fornecendo energia ao organismo para o crescimento, a reprodução e para manutenção do metabolismo basal (Gomes, 1998). Os peixes são os vertebrados que convertem melhor o alimento exógeno em proteína corporal com menor gasto de energia.

É obvio que os requerimentos nutricionais dos reprodutores são maiores e diferentes que à dos juvenis e dos adultos que não se encontram em fase reprodutiva, chegando a comprometer notoriamente a reprodução, na qualidade dos gâmetas, ao desenvolvimento dos gónadas, a composição dos espermatozóides, do plasma seminal (antioxidante presente no sémen) e na fecundidade (De Coen *et al.*, 1995; Jasso *et al.*, 2003 e Santos, 2011).

Tendo os peixes o alimento disponibilizado, existem alguns factores que impedem com que estes aproveitem perfeitamente. O uso das rações na aquacultura surgiu com o objetivo de ajudar a balancear os nutrientes adequados para os peixes e que não podem ser sintetizados por eles. Quando oferecidos e não eficientemente ingeridos e absorvidos, resulta no desperdício de alto aporte de nutrientes na água, o que em ambientes fechados contribui para uma deposição de resíduos no fundo do tanque, diminuindo a qualidade

da água em catifeiro, aumentando o desenvolvimento de microorganismos e a possibilidade do aparecimento de doenças (Sussel, 2008). E não somente, as rações têm também a vantagem de não possuírem riscos de transmissão de patologias via alimentos húmidos.

São vários os tipos de nutrientes capazes de influenciar na reprodução, como os lípidos, proteínas, carboidratos, vitamina A e E, ácido ascórbico, carotenoides e os nucleótidos. Neste âmbito, o uso de gordura na ração quer de origem animal ou vegetal, constitui um importante factor para a alimentação dos peixes, como forma concentrada de energia influenciando, positivamente nas outras exigências nutricionais e para compactar as rações (Gomes, 1998).

### **2.3.3.1 Função dos lípidos na alimentação**

Os lípidos constituem um grupo heterogénio, caracterizam-se por apresentarem uma estrutura molecular (ácidos gordos com pelo menos 8 átomos de carbono) que podem ser divididos em grupos, em função da presença do glicerol: ácidos gordos em estado livre, lípidos com glicerol (triglicéridos e fosfolípidos) e lípidos sem glicerol, onde se englobam os esteróides que são também componentes fundamentais para o correto funcionamento e desenvolvimento dos organismos. Servem como veículo biológico na absorção de vitaminas lipossolúveis (A, E e K) e esteróides (Mendes, 2008). Segundo Gomes (1998); Bell & Koppe (2011), os lípidos para além de energéticos (9,5 Kcal.g<sup>-1</sup>) têm outras funções estruturais, de serem coenzimáticas, hormonais e nutricionais importantes. São precursores da síntese de prostaglandinas, componentes e precursores das hormonas parácrinas e eicosanóides.

Uma dieta, contendo lípidos principalmente os ácidos gordos essenciais (EFA), influenciam na qualidade das posturas especialmente em espécies que apresentam posturas contínuas e períodos vitelogênicos curtos. Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA - polyunsaturated fattyacids) são agrupados em duas famílias: a série linoleica (n-6) e a série linolénica (n-3), que não podem ser sintetizados pelos animais porque as suas enzimas são incapazes de inserir novas ligações duplas entre a já existente e o grupo carboxilo. Estas duas séries são consideradas ácidos gordos essenciais, havendo assim a necessidade de os adicionar à dieta.

Os ácidos gordos essenciais são os precursores dos restantes ácidos gordos da mesma série do ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), do ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e do ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) (Villalta *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007). Estes ácidos são importantes no crescimento e desenvolvimento normal dos linguados, para melhorar a fluidez do esperma, dar resistência aos efeitos osmóticos do ejaculado que são os principais factores de sucesso na reprodução e sobrevivência da prole (Izquierdo *et al.*, 2011).

As exigências lipídicas apresentam grandes variações entre as espécies cultivadas. Nos linguados, durante o processo reprodutivo, a adição de PUFAs à dieta leva a um aumento na sensibilidade da membrana e à peroxidação lipídica nos espermatozóides que, posteriormente, participam nas reservas vitelinas, garantindo a sobrevivência e crescimento das larvas após a eclosão e antes da abertura da boca (Ferreira, 2009).

Não é somente o conteúdo individual de cada ácido gordo que importa mas, também, as proporções entre eles, a qualidade e a quantidade dos DHA e ácidos gordos essenciais tornam-se decisivos para o sucesso do

desenvolvimento dos ovos e das larvas e são primordiais na pigmentação e migração do olho. O excesso ou deficiência na sua assimilação pode provocar várias disfunções, malformações e patologias de várias ordens em peixes planos (Mendes, 2008). O ácido docosahexaenóico é especialmente importante no tecido neural das larvas, retina, nervo óptico e estruturas relacionadas com os órgãos de sentido, demonstrando ser mais determinante que os ácidos gordos essenciais na maioria das espécies marinhas.

A necessidade por ácidos gordos essenciais muda ao longo da vida dos peixes. Quando os peixes se encontram na fase juvenil podem ser capazes de sobreviver meses com uma dieta pobre em ácidos gordos essenciais. As larvas morrem em poucos dias e nos reprodutores há uma necessidade durante a fase da gametogénese e durante as posturas, pois afetam a qualidade dos ovos (Izquierdo, 2002).

Durante o desenvolvimento das larvas da *S. senegalensis* existe uma diminuição de ácidos gordos, que apoiam a ideia de que larvas de peixe têm um metabolismo rápido e altas exigências nutricionais, utilizando lípidos (ácidos gordos essenciais) como fonte de energia metabólica (Conceição *et al.*, 2007). Para além disso, os ovos dos linguados apresentam os melhores valores na razão DHA/EPA de 4,3 comparado com 2 a 3 que, normalmente apresentam as outras espécies.

A relação de (DHA/EPA) na dieta é determinante para distintas funções fisiológicas principalmente a reprodução (Fernández-Palacios & Izquierdo, 2009). Alguns autores como Ferreira (2009) falam sobre a importância da relação (DHA/EPA) para a nutrição larval após a abertura da boca, melhorando assim o seu desenvolvimento larvário e sugerem que ambas as relações estejam incluídas nas dietas de reprodutores para melhorar a qualidade das

posturas, sendo estes dois ácidos importantes no controlo da ovulação, na embriogénese, eclosão e desenvolvimento larvário inicial.

### **2.3.3.2 Regime alimentar de reprodutores da *Solea senegalensis***

São poucos os estudos sobre os efeitos nutricionais das larvas da *S. senegalensis*, a base alimentar das *post*-larvas e juvenis (até 7 cm de comprimento total) é de pequenos crustáceos, entre os quais predominam os copépodes harpacticoides, mas também consomem poliquetas em quantidades apreciáveis (Branco, 2003). Para reprodutores *S. senegalensis*, a base alimentar normalmente é de Lula-comum (*Loligo vulgaris*), diferentes espécies de poliquetas marinhas vivas e/ou descongeladas, mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) e ração bêntica em cativeiro (Conceição *et al.*, 2007).

Os poliquetas são um grupo de invertebrados anelídeos da classe *polychaeta* abundantes que se encontram, desde entre as marés e estuários, a regiões com grande profundidade das fossas oceânicas. Existem cerca de 8000 espécies distintas que vivem associados aos substratos dos oceanos, chegando a serem conhecidos como indicadores de poluição (Paiva, 2006). Além disso, têm a capacidade de incorporar detritos orgânicos, que são transformados em biomassa animal e ao serem ingeridos por peixes e outros aquáticos que tem hábito de se alimentarem no fundo, vão retornar para o ciclo de material orgânico dos oceanos.

Estes anelídeos, que costumam ter entre 5 a 50 cm de comprimento, são muito nutritivos, sendo utilizados como suplemento alimentar às rações comerciais em cultivos extensivos e semi-intensivos, aumentando o potencial de produção, visto que fornecem elementos essenciais como 20% de ácidos gordos e 60% de proteínas, têm propriedades anti-microbianas, anti-tumorais e

contêm hormonas que podem promover a função de reprodução dos organismos marinhos.

As lulas são reconhecidas como componentes dietéticos ricos em proteínas para os reprodutores e, juntamente com uma boa concentração de ácidos gordos, altamente insaturados (HUFAs), que conduzem a uma performance reprodutiva positiva (Izquierdo *et al.*, 2011).

Os mexilhões são ricos em selénio (Se), cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg), fósforo (P), vitaminas (A, B1, B2, B6, B12 e C) e em ácidos gordos polinsaturados (37- 48% de ácidos gordos principalmente o n-3), o que permite uma maior concentração de colesterol na membrana dos espermatozóides e no plasma seminal (Cabrita *et al.*, resultados não publicados).

A ração comercial normalmente utilizada para a alimentação de linguados contém uma mistura de farinha de peixe e óleo extraído de pequenos peixes pelágicos marinhos. Estes são ingredientes que historicamente têm sido utilizados como fontes de proteína e lipídios para os peixes carnívoros.

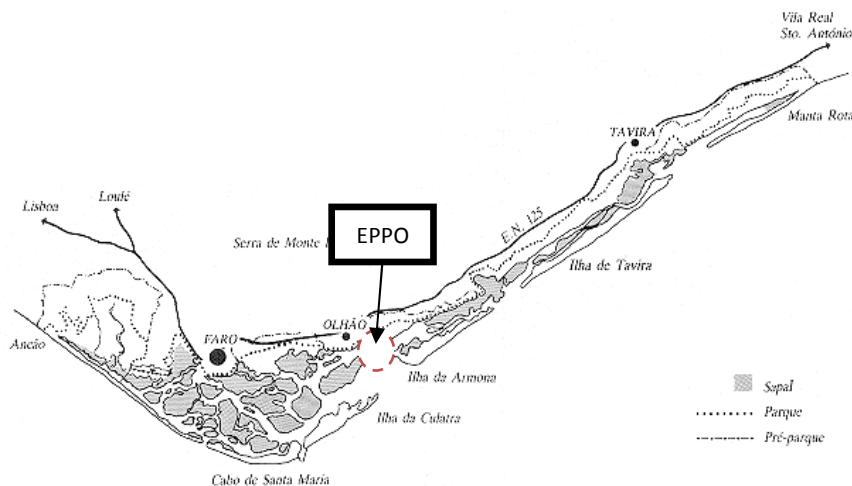


### III. Material e Métodos

### III. Material e Métodos

#### 3.1 Descrição do ensaio

Este trabalho foi realizado na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) – IPIMAR, no Algarve ( $36^{\circ} 59' 0''$  N,  $7^{\circ} 55' 0''$  W), Portugal (Figura 6).



**Figura 6:** Localização da piscicultura (EPPO) no Parque natural da ria Formosa, (<http://descobrir-a-terra.blogspot.pt/24081.html>).

##### 3.1.1 Acondicionamento dos reprodutores

Foram utilizados 44 reprodutores adultos de *Solea senegalensis* divididos em dois tanques paralelos retangulares. Os peixes eram provenientes do meio selvagem há aproximadamente 4 ou 5 anos e, previamente acondicionados a cativeiro.

Para que a dieta tivesse influência sobre as posturas, um mês antes de se iniciarem a época das posturas introduziram-se as dietas. Os peixes foram diariamente alimentados com cerca de 3% do peso vivo de cada um dos tanques. Foram fornecidas duas rações semi-húmidas (Sparus®) distintas a cada um dos tanques, uma rica em ácidos gordos (Dieta Enriquecida - DE) e a outra simples denominada ração controlo (Dieta Controlo - DC), (Tabela 2). Esporadicamente e a ambos os tanques, foram fornecidos outros alimentos

como tentáculos de lula, mexilhão e poliquetas marinhas, que normalmente são comuns na dieta dos adultos da espécie *S. senegalensis*.

**Tabela 2-** Dados da composição das rações oferecidas aos dois tanques com os reprodutores de *Solea senegalensis* durante o ensaio, retirados da tabela nutricional da ração da Sparus®.

<b>Composição</b>	<b>Dieta Enriquecida (%)</b>	<b>Dieta Controlo (%)</b>
<b>Proteína</b>	54,8	54,8
<b>Proteína digestível</b>	50,9	50,9
<b>Gordura</b>	23,0	16,1
<b>Energia</b>	22,8	21,1
<b>ARA</b>	0,22	0,18
<b>EPA</b>	2,29	1,48
<b>DHA</b>	1,96	0,89

Os dados relativamente aos linguados dos dois tratamentos estão resumidos na Tabela 3.

**Tabela 3-** Dados de estabulação dos 44 reprodutores de *Solea senegalensis* nos tanques DE e DC.

	<b>Tanque DE</b>	<b>Tanque DC</b>
<b>Número de linguados</b>	22	22
<b>Comprimentos (cm)</b>	53,0 ± 2,37	51,9 ± 4,58
<b>Peso médio (g)</b>	1669,5 ± 319,19	1721,3 ± 470,44
<b>Densidade (kg/m<sup>3</sup>)</b>	2,0	2,1
<b>Biomassa (g)</b>	36,73	37,87
<b>Relação (macho:fêmea)</b>	1:1	1:1

Os tanques usados neste ensaio eram internamente revestidos de azulejos com 18 m<sup>3</sup> de volume de água tratada, vinda da Ria formosa (Figura 7). Estes tanques foram monitorizados de igual maneira, desde o início do ensaio, sendo limpos 3 vezes durante a semana e efetuadas, diariamente purgas de 2,5 m<sup>3</sup> ou maiores quando necessário.

### **3.1.2 Parâmetros físico-químicos**

Houve a necessidade de controlar diariamente a temperatura da água, níveis de saturação de oxigênio dissolvido na água e o nível de oxigênio em (mg/l), utilizando oxímetros “Oxy Guard” com as marcas Handy Gamma e Handy Mk III.

O fotoperíodo para os tanques dos linguados foi natural, com intensidades de luz solar entre 330 e 800 lux. Os tanques eram cobertos com rede sombreada para diminuir a entrada da luminosidade, já que os linguados são habitantes de regiões profundas, e para impedir que as variações de luminosidade que ocorrem durante os dias e entre as estações do ano os influenciassem diretamente. Também impediu que a incidência da luz favorecesse o desenvolvimento de algas, que resultaria na diminuição de oxigênio.

O sistema de água nos tanques era aberto com renovação de água em 500 l/h e a salinidade variou, ao longo do ensaio, de acordo com as condições ambientais da área em  $36,6 \pm 0,8$  ppt.



**Figura 7:** Tanque exterior de acondicionamento dos reprodutores de linguado (*Solea senegalensis*).

### **3.1.3 Recolha dos ovos e caracterização das posturas**

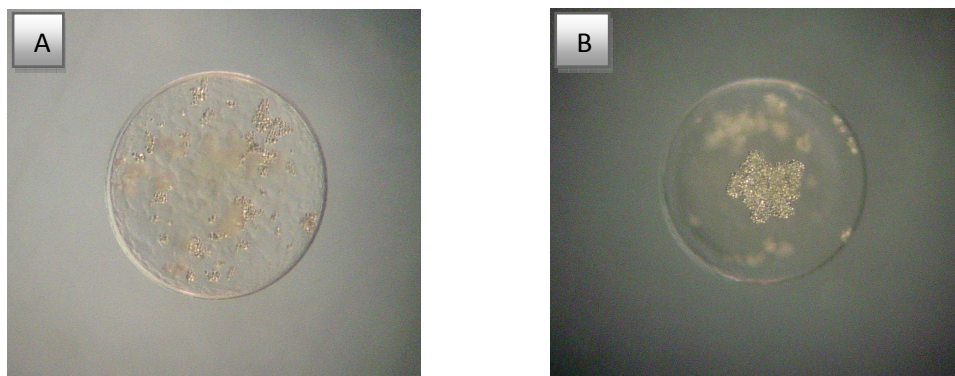
Para determinar a existência do ritmo de postura de *S. senegalensis*, em Outubro, um mês após ao início do ensaio, foram colocados à saída de água em ambos os tanques coletores de ovos externos (Figura 8). Diariamente foram verificados pela manhã (entre as 09h30 e as 11h00) a presença de ovos.

Quando a desova ocorria, os ovos eram recolhidos em ambos os coletores e transferidos para um recipiente com água salgada oriunda do tanque de desova. Eram separados ovos viáveis (Figura 9.a) dos não viáveis (Figura 9.b), através do método de decantação tendo em conta a sua flutuabilidade. Assim, os ovos viáveis mantinham-se a flutuar na superfície da água, enquanto os não viáveis se depositavam no fundo do recipiente.



**Figura 8:** Um dos coletores externos de ovos junto a um dos tanques utilizados no ensaio.

Depois de separados os ovos, as quantidades de ovos viáveis e de não viáveis eram determinadas. Da porção de ovos viáveis eram recolhidas amostras para observação à lupa do seu estado de desenvolvimento, determinação do diâmetro, peso seco, taxa de eclosão, viabilidade e análise das catepsinas. Dos ovos não viáveis, somente eram recolhidas amostras para a análise de catepsinas e, os restantes ovos eram descartados.



**Figura 9:** Ovos viáveis (A) e ovos inviáveis (B) de *Solea senegalensis*

- Estado de desenvolvimento e viabilidade

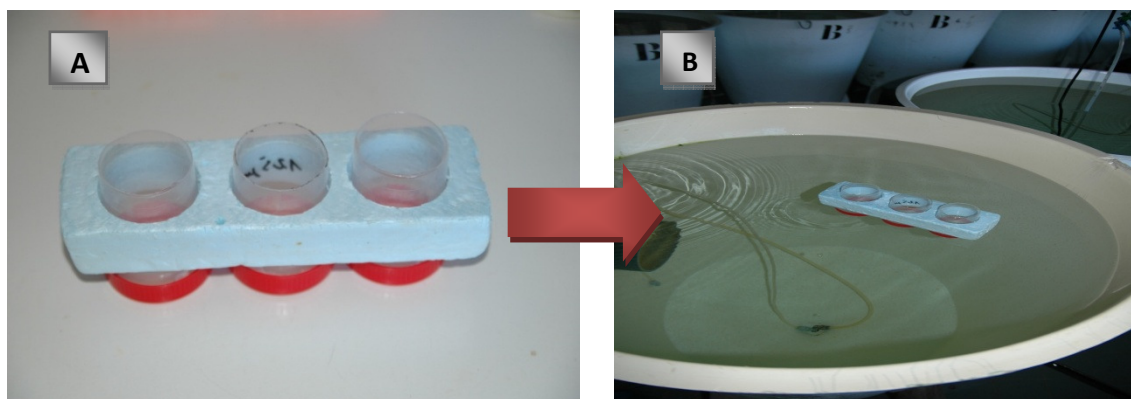
Para cada postura, eram colocados 30 ovos viáveis numa lâmina de vidro e, com auxílio de uma lupa, (em ampliação de 20x) eram observados e registados os estados de desenvolvimento dos ovos (morula, blastula, gástrula ou neurula) e calculada a viabilidade dos 30 ovos (percentagem de ovos viáveis).

- Taxa de eclosão

Para a determinação da taxa de eclosão, em cada postura foram colocados 90 ovos viáveis, divididos por igual em copos flutuadores em triplicado (Figura 10). E imediatamente eram postos a flutuar numa incubadora. Ao fim de 24h normalmente era possível determinar a percentagem dos ovos eclodidos, com auxílio de uma lupa (em ampliação de 20x).

- Peso seco

Para determinação do peso seco dos ovos e das larvas, eram recolhidos triplicados com 30 ovos viáveis em ependorfs de cada postura e triplicados com 5 larvas dos diferentes dias após a eclosão (DAE) até a abertura da boca. Eram conservados em camaras refrigeradas a (-22°C), depois eram liofilizadas, e através de uma balança de precisão em ( $\mu\text{g}$ ) eram os ovos e as larvas.



**Figura 10:** Flutuador de incubação **A** e do flutuador numa incubadora **B**.

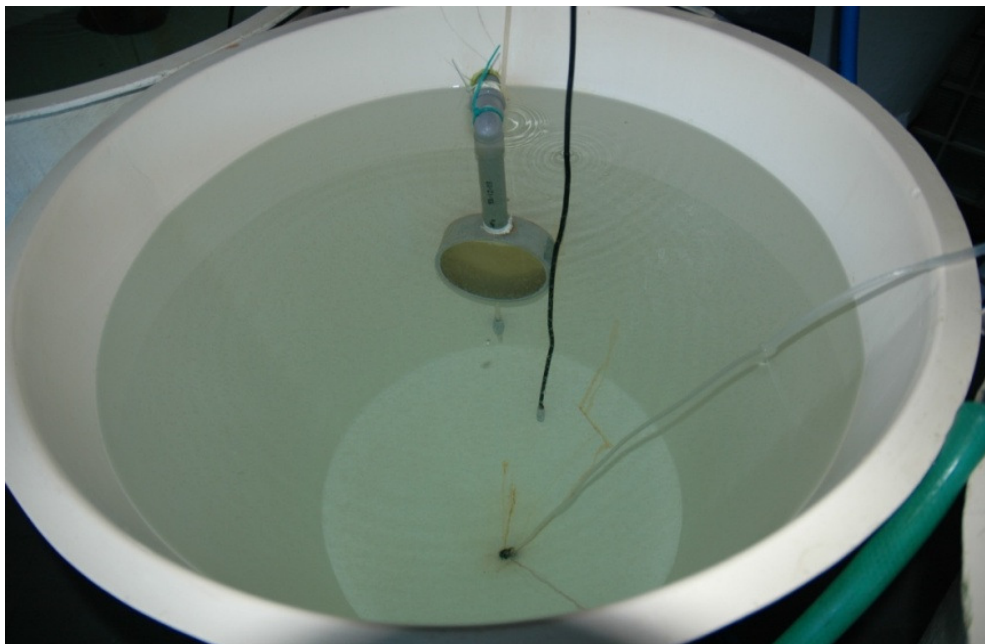
- Análises das catepsinas

Esta análise foi baseada na metodologia de Carnevali et al., (2008). Recolheram-se 22 amostras (viáveis/inviáveis) de 11 posturas, sendo 2 posturas do tanque DC e 9 posturas do tanque DE no estado de desenvolvimento embrionário blastula e com as taxas de eclosão a 100%. Recolheram-se aproximadamente 200 mg de ovos viáveis e não viáveis previamente limpos em água destilada e conservados em azoto líquido, para se determinarem os níveis de actividade das catepsinas B e D de acordo com o protocolo em anexo (Anexo I).

- Incubação dos ovos

Os restantes ovos viáveis de cada postura colocavam-se numa incubadora com volume de 200 l (Figura 11), para serem feitas as várias análises desde a eclosão até à abertura da boca das larvas.

Durante esse período, mantiveram-se as incubadoras com arejamento e higienizadas (aspiradas) duas vezes ao dia para evitar que alguns ovos abortados ou larvas mortas permanecessem no fundo do tanque, criando condição para o desenvolvimento bacteriano.



**Figura 11:** Incubadora – tanque cilíndrico branco de 200L.

- Ensaio à temperatura de 17°C desde a eclosão dos ovos até à abertura da boca, com ovos provenientes dos tanques DE e DC.

Para este ensaio, após a obtenção de posturas no mesmo dia em ambos os tanques, foram efetuados os procedimentos diários de cada postura. As características utilizadas para o ensaio encontram-se descritos na Tabela 5. Assim, controlou-se diariamente a temperatura da água para que permanecesse idêntica em ambos os tanques.

**Tabela 5-** Principais dados dos ovos (DE/DC) para o ensaio com temperatura a 17°C.

<b>Tanque</b>	<b>Ovos viáveis</b>	<b>Ovos não viáveis</b>	<b>Ovos incubados</b>	<b>Viabilidade</b>	<b>Estado de desenvolvimento</b>
<b>DE</b>	78 (g)	158 (g)	43 (g)	80%	50% Gástrula 50% Neurula
<b>DC</b>	69 (g)	86 (g)	43 (g)	90%	100% Gástrula

### 3.1.4 Análise estatística

Para o tratamento dos dados utilizou-se o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0® para avaliar a comparação das médias das taxas de eclosão recolhidas nos mesmos dias de posturas entre os tanques DE e DC.

Para avaliar se a dieta enriquecida possuía um efeito significativo na quantidade de posturas, na qualidade dos ovos da postura, na sobrevivência ao eclodirem, no tamanho, no peso e no desenvolvimento até a abertura da boca, foi realizado um teste T simples. Devido a alguns dados recolhidos estarem em percentagem, houve a necessidade de realizar transformações matemáticas corretivas de modo a corrigir os desvios da normalidade utilizando a fórmula  $X' = \arcsen. X^{1/2}$ , em que  $X$  é o dado original e o  $X'$  o dado transformado (Zar, 1996). Isso foi utilizado para o caso da relação entre as taxas de eclosão e a taxa de viabilidade dos ovos. O pressuposto de homogeneidade da variância foi avaliado com o teste de regressão.

Para os restantes tratamentos dos dados utilizou-se o programa Statistica 7 e foi também realizado o teste T simples.

Consideraram-se estatisticamente significativos os testes cujo valor  $p$  for igual ou inferior a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão.



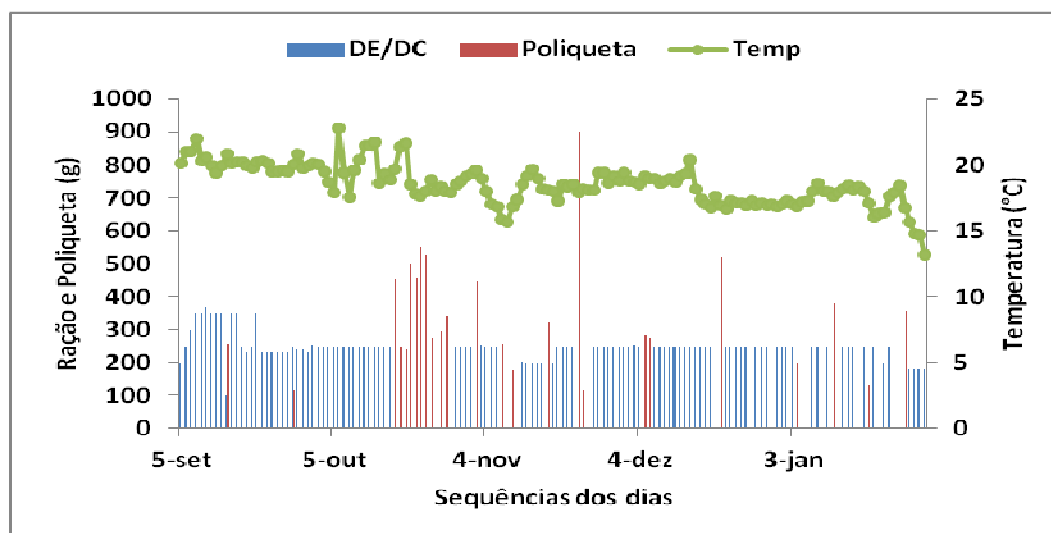
## IV.Resultados

## IV. Resultados

O objetivo principal do ensaio foi o de avaliar a quantidade dos ovos por postura e avaliar a qualidade dos ovos ao longo do ensaio sob o efeito da dieta enriquecida em DHA e EPA (DE) sobre a qualidade e quantidade das posturas.

### 4.1 Condições ambientais dos tanques e alimentação dos reprodutores

Na avaliação das características físico-químicas da água dos tanques com os reprodutores alimentados com a DE e a DC, foi observado que durante todo o ensaio, decorrido de Setembro (2011) a Janeiro (2012), a temperatura da água oscilou entre 9,8 e 21,8°C. O *ad libitum* alimentar dos reprodutores de ambos os tanques pela ração (enriquecida e a controlo), não sofreu grandes variações apresentando uma média e desvio padrão de  $236,54 \pm 67,62$  g (Figura 12).



**Figura 12:** Relação alimentar dos tanques DE e DC sob influência da temperatura, durante o ensaio.

Apresentou também valores entre 5,0 e 11,0 ml/g de oxigênio dissolvido na água e entre 70 e 118 de percentagem de saturação de oxigênio relacionados na Tabela 5.

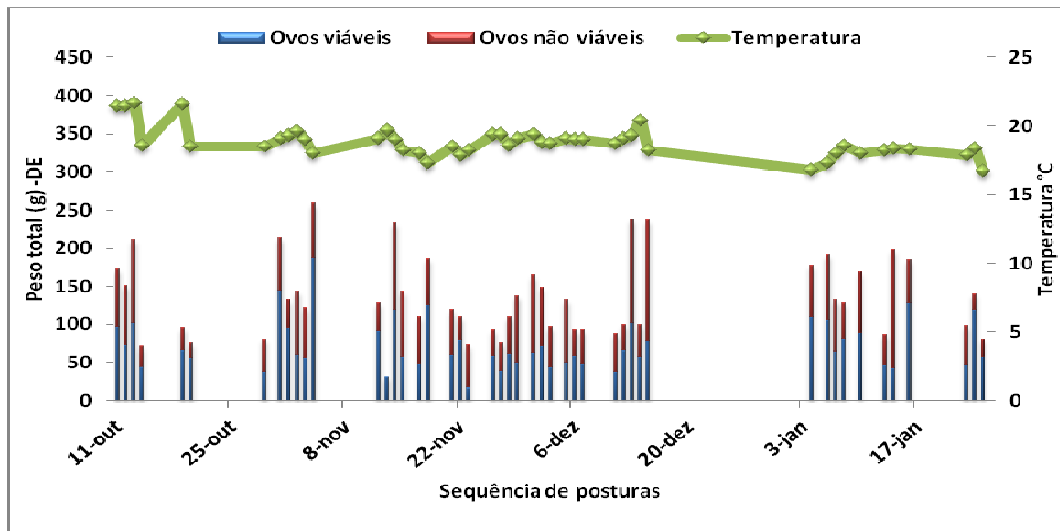
**Tabela 5-** Valores (média  $\pm$  desvio padrão) mensais dos parâmetros físico-químicos [O<sub>2</sub> em (ml/g), saturação de O<sub>2</sub> em (%) e temperatura (°C)] observados nos tanques (DE e DC) onde decorreram os ensaios de reprodução dos 44 reprodutores de *Solea senegalensis*.

	Set	Out	Nov	Dez	Jan
<b>O<sub>2</sub> (ml/g) DE</b>	6,8 $\pm$ 0,39	6,58 $\pm$ 0,56	7,11 $\pm$ 1,68	6,69 $\pm$ 0,61	7,07 $\pm$ 0,45
<b>O<sub>2</sub> (ml/g) DC</b>	6,7 $\pm$ 0,54	6,37 $\pm$ 0,83	6,85 $\pm$ 1,47	6,64 $\pm$ 0,59	6,88 $\pm$ 0,71
<b>O<sub>2</sub> Sat. (%) DE</b>	94,5 $\pm$ 4,92	89,26 $\pm$ 7,06	95,80 $\pm$ 10,24	88,0 $\pm$ 6,69	90,32 $\pm$ 5,01
<b>O<sub>2</sub> Sat. (%) DC</b>	92,6 $\pm$ 6,85	88,55 $\pm$ 4,95	94,23 $\pm$ 8,38	87,45 $\pm$ 6,44	87,34 $\pm$ 7,52
<b>Temp DE</b>	20,2 $\pm$ 0,59	19,34 $\pm$ 1,43	18,21 $\pm$ 1,03	18,0 $\pm$ 1,06	16,83 $\pm$ 1,67
<b>Temp DC</b>	20,2 $\pm$ 0,75	19,32 $\pm$ 1,30	18,50 $\pm$ 1,21	18,3 $\pm$ 1,56	16,92 $\pm$ 1,76

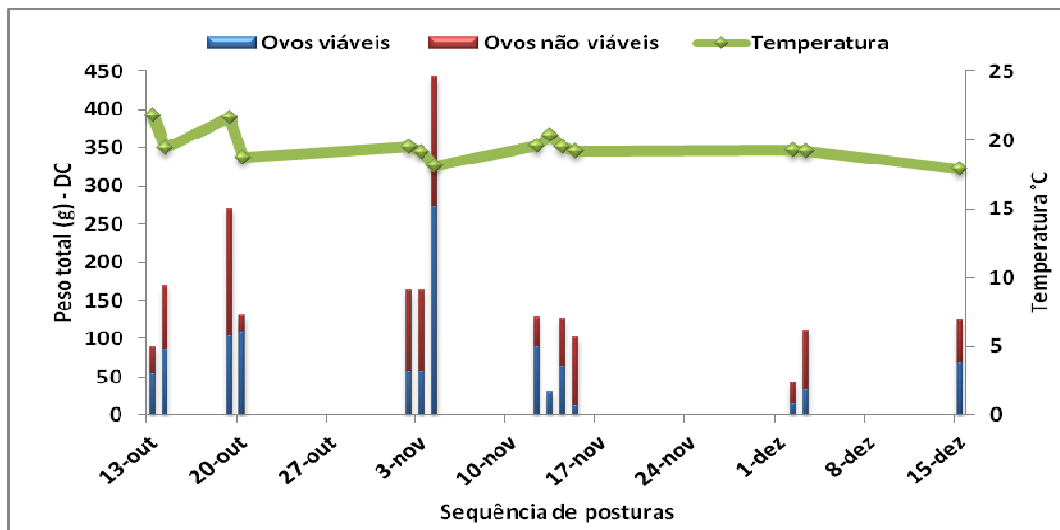
#### **4.2 Efeito das diferentes dietas (DE e DC) na quantidade e qualidade das posturas de *S. senegalensis***

Durante a fase das posturas deste ensaio obteve-se um total de sessenta e duas posturas, sendo que quarenta e sete destas posturas foram pertencentes aos reprodutores do tanque DE e quinze pertencentes aos reprodutores do tanque DC. Elas não foram diárias para ambos os tanques, mas para os reprodutores do tanque DE apresentaram um ritmo de posturas mais regular em relação ao tanque DC que tiveram paragens mais longas nas posturas, chegando a obter diferenças até 17 dias de uma postura para a outra.

O peso médio total de ovos (viáveis e não viáveis), imediatamente após terem sido recolhidos dos tanques variou entre 30 a 258 g para o tanque DE (Figura 13.a), e de 30 a 443 g para o tanque DC (Figura 13.b).



**Figura 13.a):** Peso total dos ovos (viáveis e não viáveis) dos reprodutores de *Solea senegalensis* recolhidos de quarenta e cinco posturas do tanque DE.

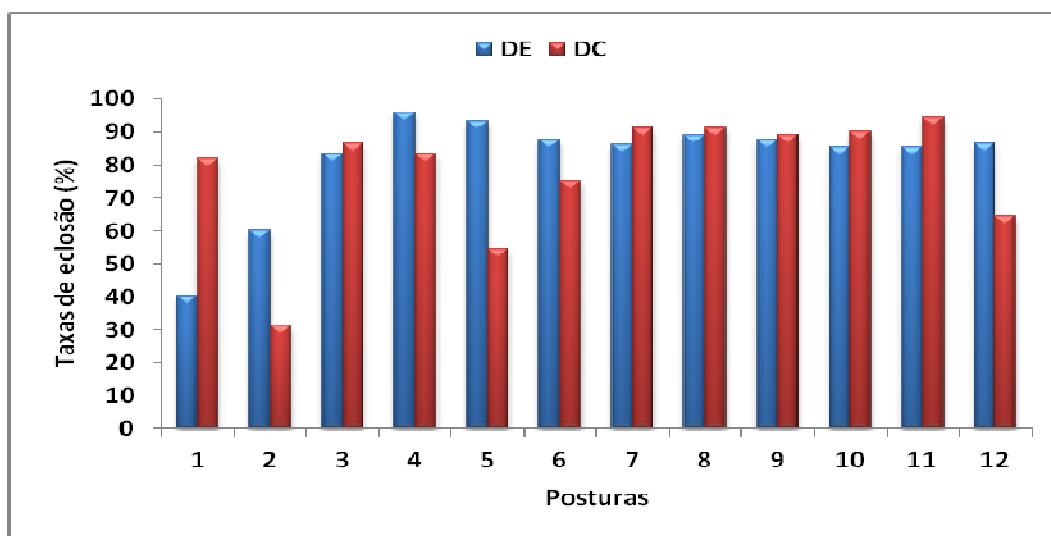


**Figura 13.b):** Peso total dos ovos (viáveis e não viáveis) dos reprodutores de *Solea senegalensis* recolhidos em 14 posturas do tanque DC.

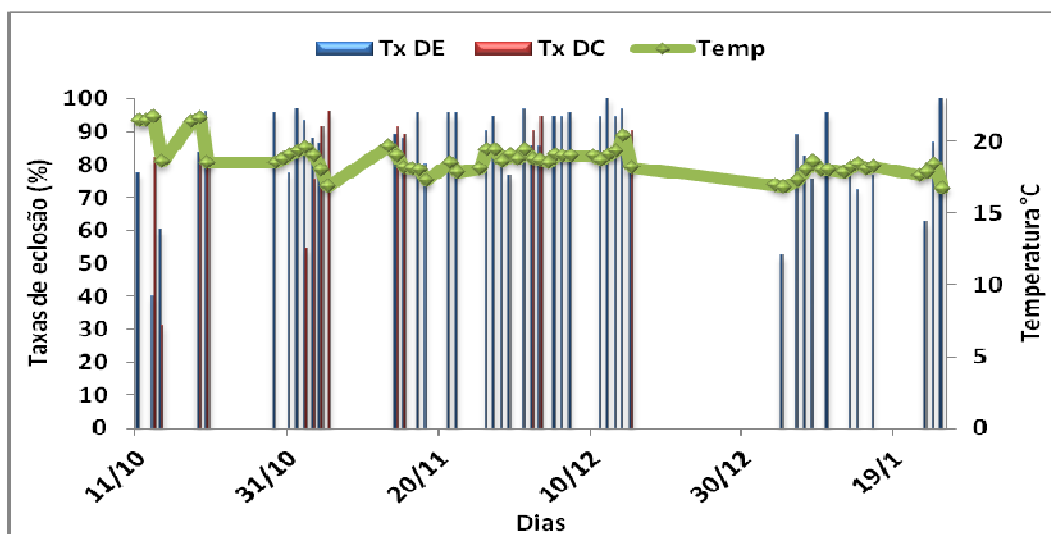
#### 4.2.1 Taxas de eclosão

A média do percentual das taxas de eclosão para os tanques ao longo das posturas variou entre 40,05 a 100% e apresentou uma média de  $85,05 \pm 13,44\%$  para o tanque DE e de 31,11 a 95,69% com uma média de  $79,10 \pm 18,79\%$  para o tanque DC, sendo que na maioria das posturas os valores apresentaram se acima dos 70%.

Ao se compararem as médias entre os dois tanques em sete posturas verificadas nos mesmos dias, 63,64% das taxas de eclosão foram superiores no tanque DC (Figura 14), sendo que a média para o tanque DE foi de  $81,71 \pm 15,7$  e para o tanque DC foi de  $77,71 \pm 18,9$ . Contudo as diferenças entre as taxas de eclosão dos diferentes tanques não foram estatisticamente significativas ( $p=0,52$ ),



**Figura 14:** Comparação das médias das taxas de eclosão, recolhidos nos mesmos dias em que ocorreram posturas dos reprodutores *Solea senegalensis* nos tanques (DE/DC).



**Figura 15:** Comparação das médias das taxas de eclosão de ambos os tanques dos reprodutores *Solea senegalensis* (DE/DC) em função da temperatura.

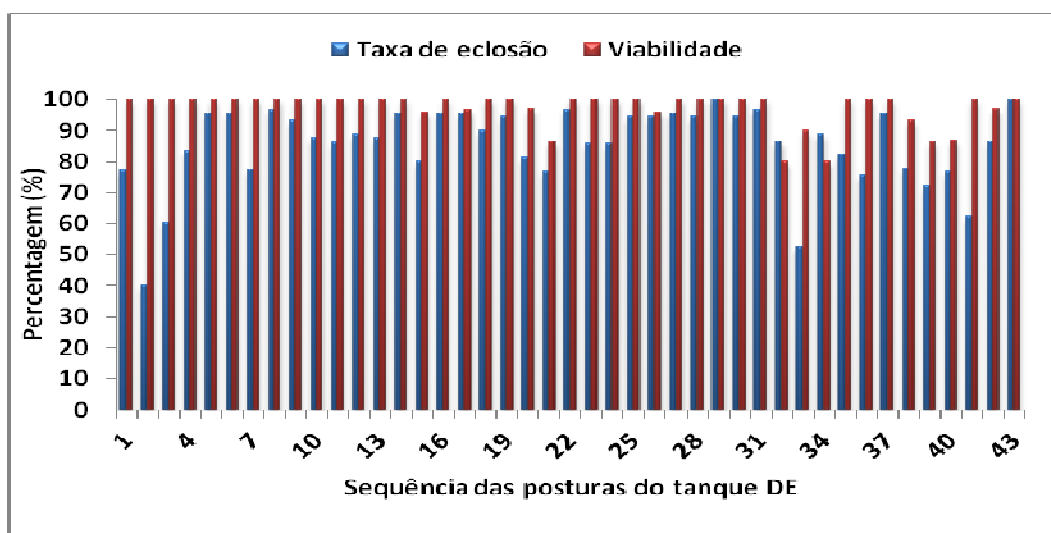
Comparando as médias das taxas de eclosão ao longo das posturas em função da temperatura, verificou-se que esta não teve influência nem correlação alguma ( $r^2=0,01$ ) sobre o percentual dos valores (Figura 15).

Compararam-se também as médias das taxas de eclosão com a viabilidade (quantidade de ovos viáveis/quantidade total de ovos) do total de posturas do tanque DE (Figura 16.a) e do tanque DC (Figura 16.b), não havendo interferência da viabilidade na taxa de eclosão.

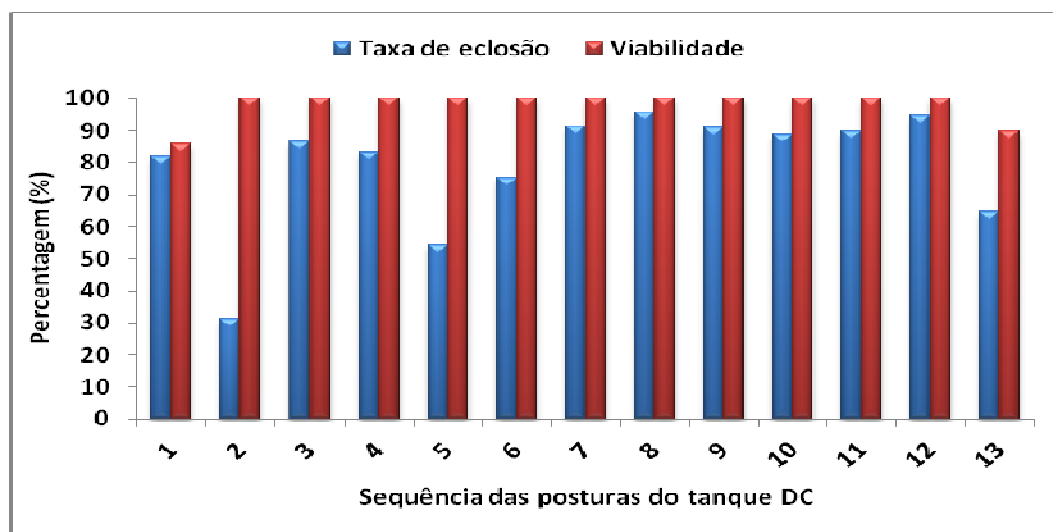
O gráfico de regressão linear para o tanque DE, diz que a relação entre a viabilidade total e a taxa de eclosão é significativa  $p>0,05$  com ( $r=0,293$ ;  $r^2=0,0086$  e  $p=0,056$ ), e para o tanque DC não houve correlação alguma, pois  $p>0,05$  com ( $r=0,164$ ;  $r^2=0,027$  e com  $p=0,592$ ).

As viabilidades das posturas do tanque DC mantiveram-se na maioria das vezes a 100% independentemente das taxas de eclosão oscilarem muito e em percentagens muito abaixo da viabilidade. A viabilidade das posturas do tanque DE, inicialmente até ao dia 22 de Novembro mantiveram-se a 100%, tendo diminuído para 80% em 2 vezes, voltando a aumentar para 100% e a diminuir para 90 e 85%, terminando o ensaio com as últimas 3 posturas a 100%.

a)



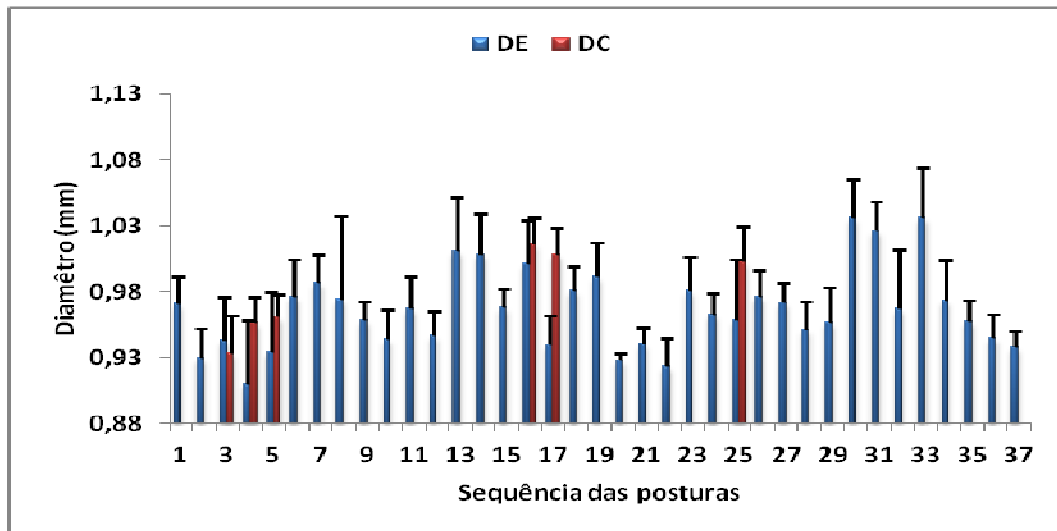
b)



**Figura 16:** Gráficos de comparação de porcentagem das taxas de eclosão e a viabilidade dos ovos de *Solea senegalensis* de quarenta e três das quarenta e sete posturas do tanque DE, a) e treze das quatorze posturas do tanque DC, b).

#### 4.2.2 Tamanhos dos ovos e das larvas

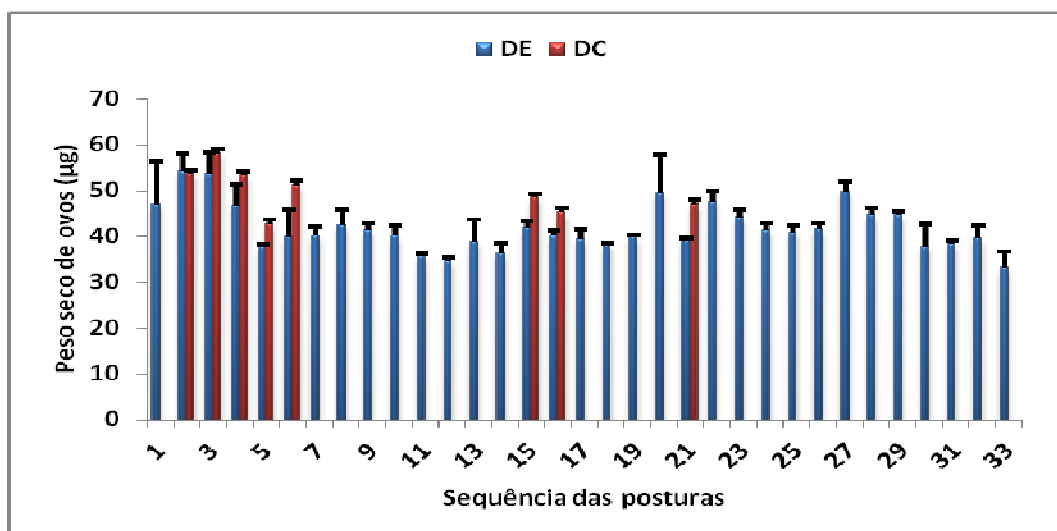
Durante o período de desova, foi possível verificar, variações no diâmetro dos ovos em ambos os tanques ao longo do tempo. No tanque onde os peixes foram alimentados com a dieta DE observou-se que o diâmetro médio dos ovos recolhidos em trinta e sete posturas, foi de  $0,96 \pm 0,026$  mm. No tanque com a dieta DC o diâmetro médio dos ovos recolhidos em seis posturas, foi de  $0,98 \pm 0,022$  mm, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre os diâmetros  $p=0,14$  (Figura 17).



**Figura 17:** Média diária dos diâmetros dos ovos de *Solea senegalensis* dos tanques DE/DC.

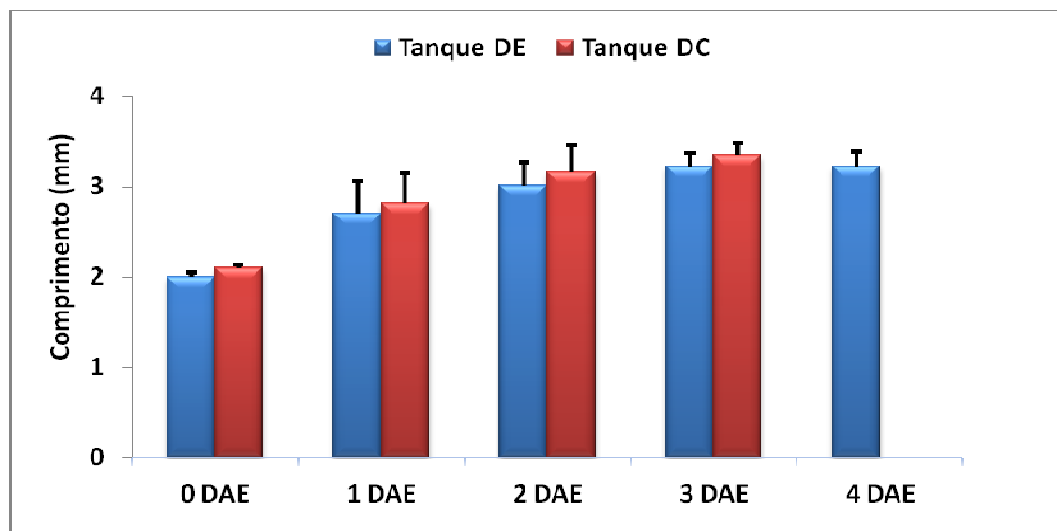
O peso seco médio dos ovos em trinta e três posturas do tanque DE foi de  $41,79 \pm 5,06 \mu\text{g}$  e de oito posturas do tanque DC foi de  $49,90 \pm 5,06 \mu\text{g}$ . Verificou-se que a diferença dos pesos secos dos ovos DE e dos DC não foram significativas sendo o  $p=0,35$  (Figura 18).

No entanto verificou-se, que apesar de as diferenças entre o diâmetro e o peso seco dos ovos não terem sido significativas, notou-se um maior número de posturas de ovos no tanque DE, e no DC que o diâmetro e o peso seco médio dos ovos foram ligeiramente maiores.



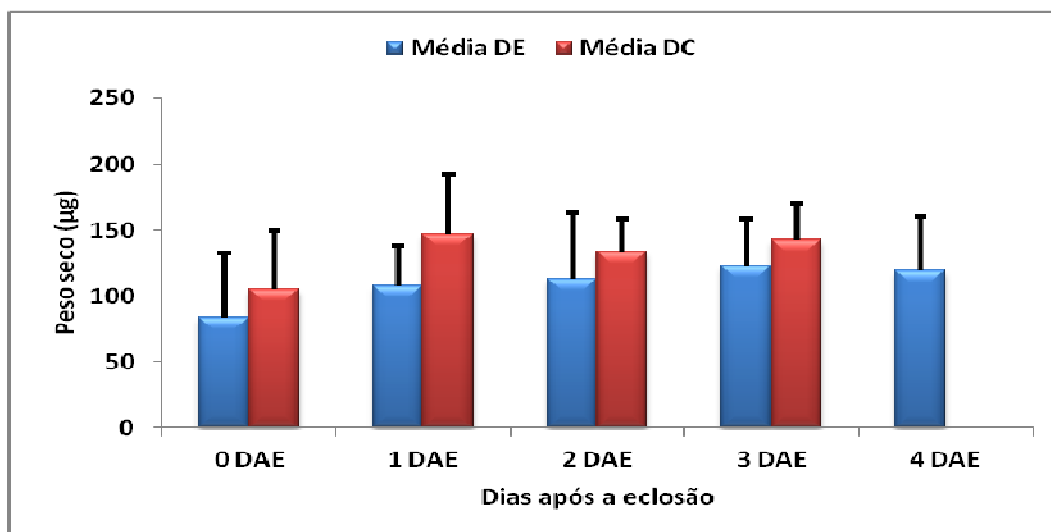
**Figura 18:** Média diária dos pesos secos dos ovos de *Solea senegalensis* dos tanques DE/DC.

Comparou-se a média geral do diâmetro dos ovos e do comprimento das larvas até a abertura da boca dos tanques em estudo. As larvas provenientes do tanque DC para os diferentes dias após a eclosão obtiveram comprimentos relativamente superiores em 0,12 mm para cada dias após a eclosão (DAE). As larvas provenientes do tanque DE, apresentaram em algumas posturas larvas que só abriram a boca aos 4 DAE (Figura 19).



**Figura 19:** Média e o desvio padrão geral dos comprimentos das larvas de *Solea senegalensis* dos tanques DE/DC.

Durante a sequência dos pesos secos das larvas até a abertura da boca, de todas as posturas as larvas provenientes do tanque DC apresentaram também valores relativamente superiores aos das larvas provenientes do tanque DE (20,9 - 0 DAE; 38,5 - 1 DAE; 20,3 - 2 DAE; 19,9 -3 DAE). (Figura 20).



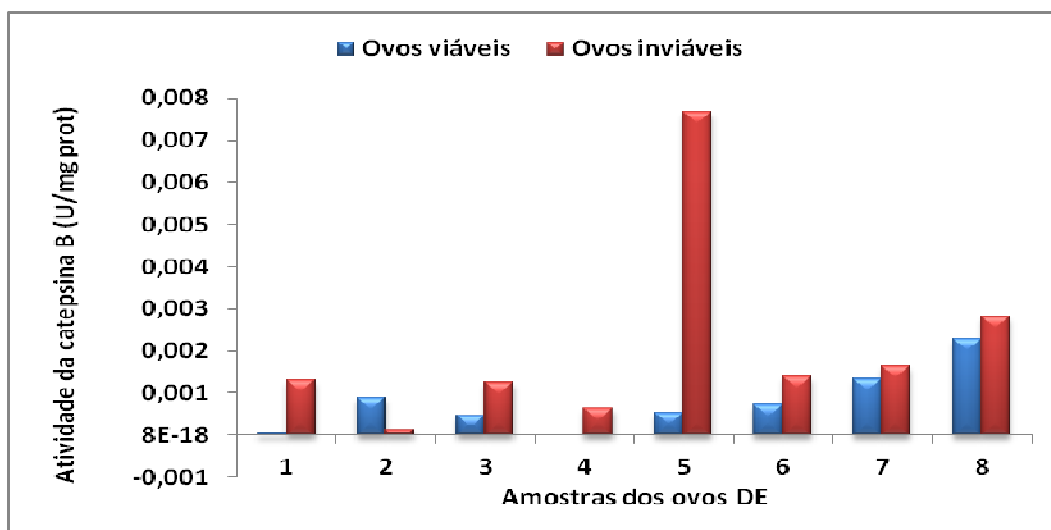
**Figura 20:** Média total de todas as posturas e o desvio padrão dos pesos secos das larvas de *Solea senegalensis* dos tanques DE/DC dos 0 DAE (Dia após a eclosão) a abertura da boca.

#### 4.2.3 Qualidade dos ovos através da atividade catepsina B e D

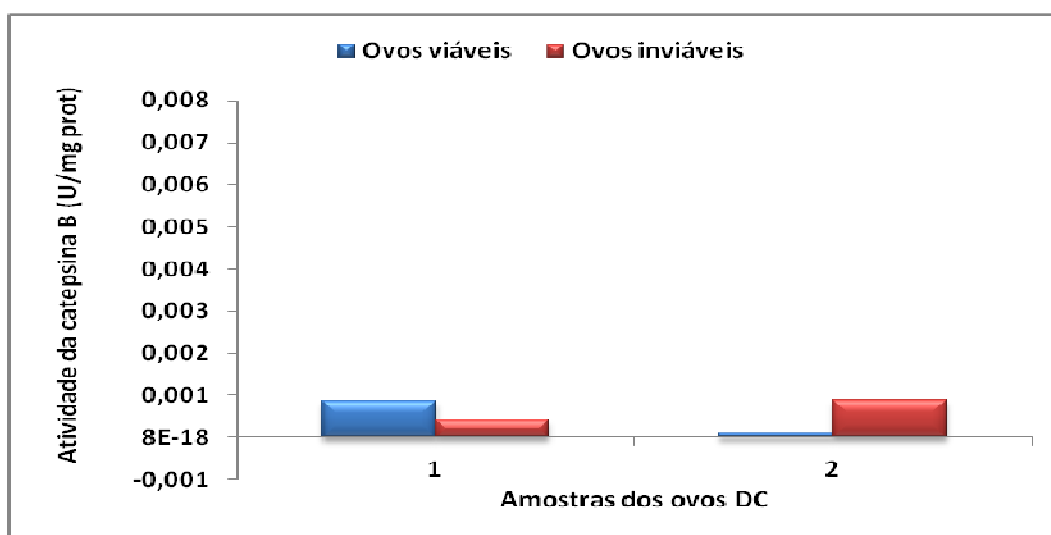
Durante este ensaio a atividade da catepsina B no tanque DE mostrou níveis entre 0 e 0,0023 U/mg nos ovos viáveis e entre 0,00062 e 0,0077 U/mg nos ovos inviáveis, tendo apresentado níveis mais altos de atividade nos ovos inviáveis, sendo que esta diferença não tenha sido significativa ( $p=0,16$ ).

Para o tanque DC a atividade da catepsina B teve os valores de 0,00011 e 0,00087 U/mg dos ovos viáveis e 0,0004 e 0,00087 U/mg de ovos inviáveis, tendo apresentado níveis mais altos de atividade nos ovos viáveis. Por tratarem-se de apenas duas amostras de cada (viáveis : inviáveis), não foi possível realizar alguma análise estatística (Figura 21).

a)



b)

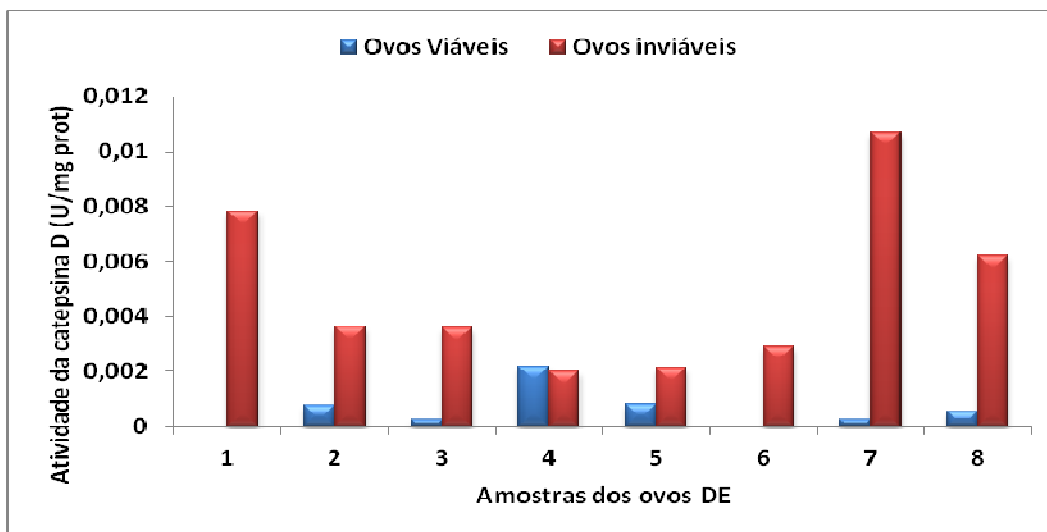


**Figura 21:** Atividade da catepsina B em 16 amostras de ovos (viáveis/inviáveis) de *Solea senegalensis* do tanque DE a) e em 4 amostras do tanque DC, expressos em U/mg de proteína b).

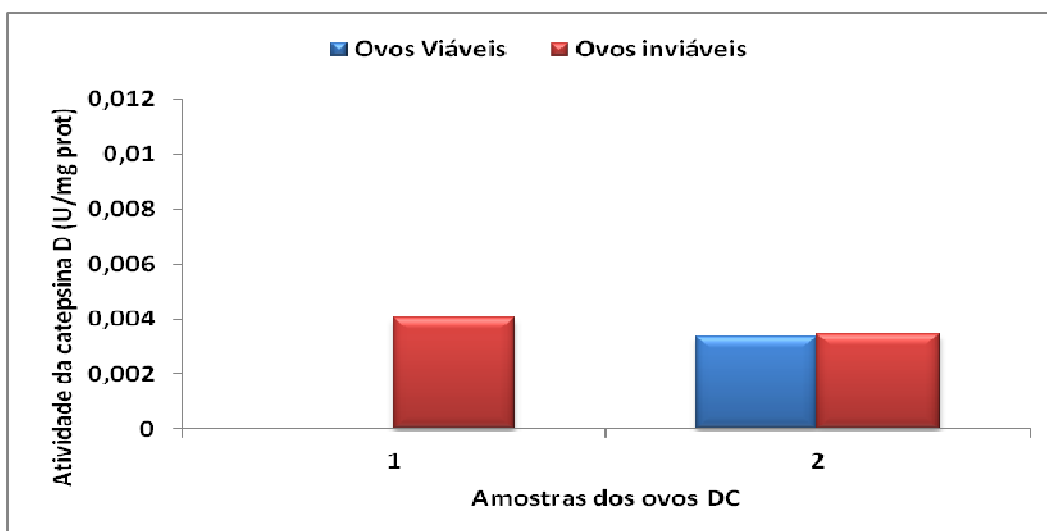
Para o ensaio da atividade da catepsina D, o tanque DE mostrou níveis entre 0 e 0,0023 U/mg nos ovos viáveis e entre 0,0078 e 0,0106 U/mg nos ovos inviáveis, tendo apresentado também níveis mais altos de atividade nos ovos inviáveis, sendo que esta diferença foi significativa ( $p=0,01$ ). Para o tanque DC que só teve também duas amostras de cada (viáveis:inviáveis) a atividade da catepsina D teve os níveis de 0 e 0,0034 U/mg dos ovos viáveis e entre 0,0034

e 0,004 U/mg dos ovos inviáveis, tendo apresentado níveis muito próximos de atividade nos ovos viáveis (Figura 22).

a)



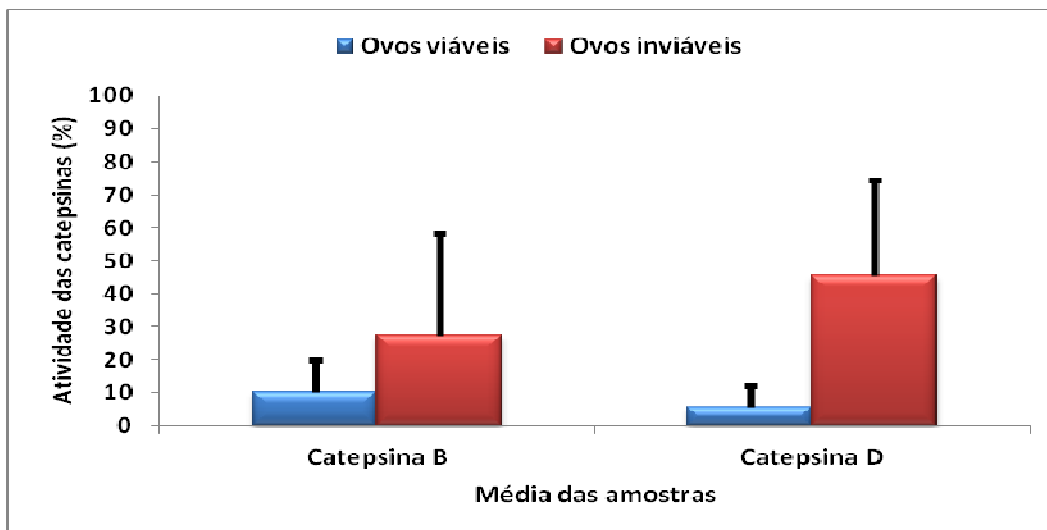
b)



**Figura 22:** Atividade da catepsina D em 16 amostras de ovos (viáveis/inviáveis) de *Solea senegalensis* do tanque DE a) e em 4 amostras do tanque DC, expressos em (U/mg) de proteína b).

Quando se compararam os valores dos níveis de atividade entre as catepsinas B e D nos ovos viáveis e nos inviáveis do tanque DE, foram observadas percentagens superiores da atividade da catepsina B em  $27,37 \pm 31,04\%$  e da catepsina D em  $45,60 \pm 28,95\%$  nos ovos inviáveis, a atividade da catepsina B foi menor se comparada a catepsina D, mas não sendo

significativa a diferença entre elas ( $p=0,11$ ). A atividade da catepsina B foi maior nos ovos viáveis, sendo também que esta diferença entre os ovos não significativa ( $p=0,66$ ) (Figura 23).



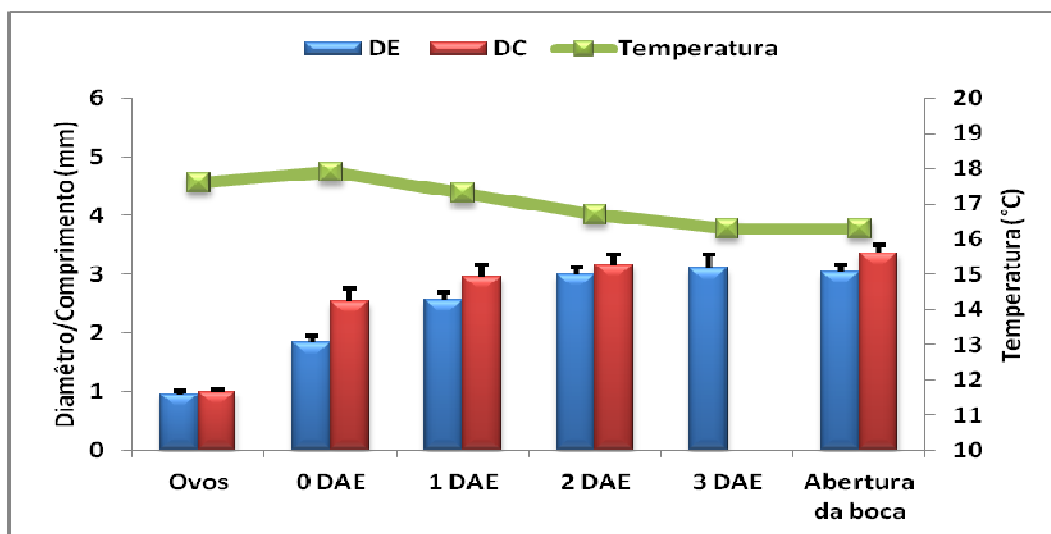
**Figura 23:** Catepsinas B e D em ovos viáveis e inviáveis no estado de desenvolvimento blástula. Para normalizar os valores, as atividades são expressas como percentagens, sendo 100% o valor máximo encontrado para cada enzima. Todos os pontos são em média de oito determinações  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.3 Ensaio à temperatura de 17°C desde a eclosão dos ovos até à abertura da boca, com ovos provenientes dos tanques DE e DC**

Nas condições de ensaio utilizadas aqui, os ovos dos tanques DE e DC tiveram níveis de taxa de eclosão de 86,64% para os ovos DE e 64,44% para os ovos DC. Os ovos provenientes do tanque DC eclodiram doze horas depois em relação aos ovos do tanque DE.

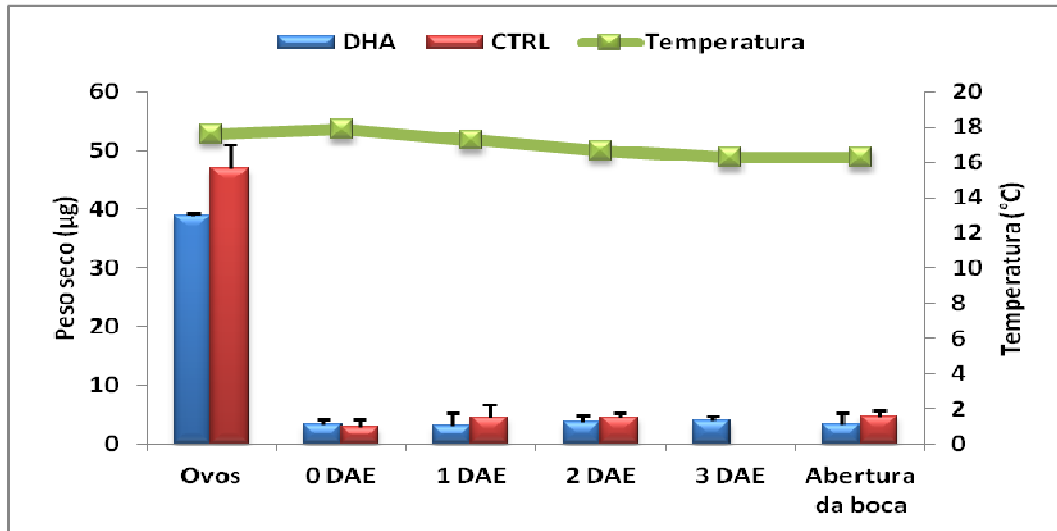
A média dos diâmetros dos ovos teve diferenças significativas ( $p=0,01$ ), sendo os ovos provenientes do tanque DC maiores que os do tanque DE. E o mesmo foi verificado para o comprimento durante o desenvolvimento das larvas até a abertura da boca, sendo houve diferenças significativas de

( $p=0,00001$ ) no comprimento das larvas no dia em que abriram a boca (Figura 24).



**Figura 24:** Sequência evolutiva do diâmetro (mm) de vinte ovos *Solea senegalensis* e os comprimentos (mm) de vinte larvas a cada dia após a eclosão (DAE) até a abertura da boca provenientes dos tanques DE/DC, mantidos a mesmas temperaturas em incubadoras diferentes.

O peso seco dos ovos do tanque DC apresentou valores de  $47 \pm 4,0 \mu\text{g}$  superior que a dos DE de  $40 \pm 0,5 \mu\text{g}$  embora essa diferença não tenha sido significativa ( $p=0,08$ ). Durante o desenvolvimento das larvas, verificou-se a mesma coisa e no dia em que as larvas abriram a boca o peso seco das larvas do tanque DC apresentaram se com pesos maiores, porém também não tenham sido significativas ( $p=0,32$ ) as diferenças apresentadas (Figura 25).



**Figura 25:** Sequência evolutiva dos pesos secos ( $\mu\text{g}$ ) de trinta ovos e cinco larvas de *Solea senegalensis* a cada dia após a eclosão (DAE) até a abertura da boca provenientes dos tanques DE/DC, mantidos a mesmas temperaturas em incubadoras diferentes.



## V. Discussão

## V. Discussão

A investigação efectuada sobre o controlo geral das posturas em peixes marinhos produzidos em aquacultura, têm vindo a produzir melhorias marcantes no que se refere à qualidade dos ovos e larvas em várias espécies. Sabe-se que a temperatura, o fotoperíodo e a salinidade desempenham um papel muito importante. No entanto, o desenvolvimento das gónadas e a qualidade das posturas depende da qualidade nutricional da dieta fornecida aos reprodutores.

Os componentes nutricionais de uma dieta, a taxa de ingestão, a duração do período de alimentação antes das posturas, afetam diretamente a qualidade das posturas de acordo com Fernández-Palacios & Izquierdo (2009), que realizaram ensaios com algumas espécies como: dourada (*Sparus aurata*), robalo (*Dicentrarchus labrax*), pargo japonês (*Pagrus major*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão atlântico (*Salmo salar*), tilápia (*Oreochromis niloticus*), carpa (*Cyprinus carpio*) e pregado (*Scophthalmus maximus*).

Para que os peixes tenham posturas de qualidade é fundamental a sincronia do tipo de alimento com a temperatura, a qual influencia na fisiologia em geral. A alimentação dos peixes é uma atividade imprescindível durante o cultivo visto que os mesmos estão confinados num ambiente com pouca hipótese de obtenção de nutrientes de outra fonte.

Assim, durante o período em que decorreu o ensaio, a ração diária foi em média de  $236,54 \pm 67,62$  g nos tanques alimentados pela dieta enriquecida e pela dieta de controlo, respectivamente. Observou-se um baixo consumo diário das rações no início e no fim do ensaio com uma diferença de 100 g em relação à média registrada no decorrer do ensaio. No início, o baixo consumo

da ração foi possivelmente causado pelo *stress* que os peixes tiveram pela amostragem de separação e divisão dos lotes. E no fim do ensaio, a redução do consumo pode ter sido causada pela descida de temperatura da água para valores inferiores a 15°C.

Os peixes entre os vertebrados são conhecidos por terem uma elevada quantidade de ovos numa só postura, libertando centenas a milhões de ovócitos. Neste ensaio a época de posturas ocorreu entre os meses de Outubro e Janeiro, quando a temperatura da água nos tanques apresentavam médias adequadas às posturas, entre 21,5°C a 16,7°C.

A emissão de ovos é influenciada ou comprometida por fatores abióticos principalmente a temperatura da água, que segundo Dinis *et al.* (1999), a emissão de ovos pára a temperaturas abaixo dos 16°C e como argumenta Le François *et al.* (2010) que temperaturas superiores a 21°C influenciam na qualidade das gâmetas e proporcionam maiores probabilidades na incidência de ovos com malformações, anomalias e abortos.

Vários autores, como Carnevali *et al.* (2001), afirmam que o início das posturas dos linguados está relacionado com o aumento da temperatura da água na primavera. No presente trabalho não foi observado esse aumento da temperatura mais sim uma ligeira descida da temperatura, por se tratar de um início de Outono e de uma região com o clima mais quente. O fotoperíodo foi natural embora os tanques apresentassem uma tela de sombreamento, mas a temperatura foi manipulada a ponto de não descer nem subir a níveis indesejados e inadequados à reprodução e ao bem-estar dos reprodutores.

Segundo Agulheiro, *et al.* (2006), as condições de cultivo afetam o desenvolvimento das gónadas durante a fase da vitelogénese, induzem a reabsorção de ovócitos maduros ou podem mesmo impedir a sua formação.

Por isso, e pela sanidade animal, houve a necessidade de manter os tanques limpos e com sombra, para evitar o desenvolvimento de algas, variações bruscas de temperatura da água e com melhores condições de arejamento. Por outro lado Cañavate (2009) atribui uma especial importância à temperatura da água durante o período invernal, em que ocorre a maturação sexual da espécie *Solea solea*, produzindo uma quantidade de ovos reduzida a temperaturas inferiores a 10°C.

As dietas estabelecidas para a alimentação dos dois lotes dos reprodutores durante o ensaio tiveram níveis de proteína digestiva semelhantes e em níveis de lípidos diferentes (2,29% de EPA e 1,96% de DHA) para a dieta enriquecida e (1,48% de EPA e 0,89% de DHA) para a dieta controlo. Deste modo, verificaram-se grandes diferenças na quantidade de posturas entre os tanques, sendo a maior quantidade de posturas pertencentes aos reprodutores do tanque DE. Estes resultados podem ter sido influenciados pela composição da dieta, nomeadamente no teor, em lípidos, o que pode ter influenciado o desenvolvimento das gónadas e criando condições fisiológicas mais favoráveis para a reprodução dos peixes, nomeadamente cobrindo algumas exigências nutricionais específicas.

Segundo Navarro, *et al.* (2010) ao aumentarem-se os níveis de lípidos (de 12% para 18%) na dieta de reprodutores de peixe coelho (*Siganus guttatus*), promoveu a um aumento na quantidade de posturas. Contudo, uma dieta com boa qualidade lipídica associada à qualidade proteica também seria responsável por efeitos positivos no desempenho reprodutivo em várias espécies de peixes.

As posturas dos linguados neste ensaio não sofreram indução reprodutiva. Essa técnica de indução, segundo Dinis, *et al.* (1999), não parece

viável na espécie *solea spp.*, mesmo tendo tido bons resultados em relação à postura de alguns peixes planos eg. O peixe pregado (*Scophthalmus maximus*), utilizando hormonas que estimulam a maturação dos ovócitos. Sendo o acondicionamento natural e a postura nos tanques como sendo uma das formas de obter ovos viáveis.

Para a maioria das espécies de peixes ósseos, a quantidade de ovos produzidos em época de postura está relacionada com a quantidade da população existente por lote, e por se tratar de um habitat não natural o excesso de peixes leva ao *stress*. Para o ensaio optou-se por trabalhar com uma densidade de 2,0 kg/m<sup>3</sup>, e mesmo assim os reprodutores do lote alimentado com a dieta controlo teve melhor média total em produção de ovos de 149,36 ± 102,48 g em poucas posturas e os reprodutores pertencentes ao tanque DE obtiveram uma média de 134,57 ± 52,62 g.

De acordo com Araújo (2009), as frequências da libertação dos ovos podem ser totais (que maturam em lote único) ou parceladas (que maturam em vários lotes durante a estação de postura), o que contribui para o aumento da probabilidade de sobrevivência da espécie.

As taxas de eclosão ao longo do ensaio oscilaram para ambos os tanques, sendo que o pico mais alto foi verificado em umas das posturas dos ovos do tanque DC de 95,69%. As diferenças ao longo do ensaio não foram significativamente entre os dois tanques ( $p=0,52$ ).

Nos dias em que os ovos do tanque DC apresentaram taxas de eclosão superiores que as do tanque DE, esse facto pode ter sido causado pelo facto de os ovos do tanque DC apresentarem diâmetros ligeiramente superiores que aos dos ovos do tanque DE. Que segundo Ribeiro (2003), afirma serem sempre maiores as possibilidades de sobrevivência das larvas oriundas de

ovos com maiores tamanhos. Assim, terá determinado que os ovos do tanque DC, submetidos às mesmas densidades nos copos flutuantes e às mesmas condições térmicas, tivessem melhores resultados que os ovos do tanque DE.

Estes resultados são discordantes aos obtidos por Izquierdo, *et al.* e por Carnevali, *et al.* (2001), os quais em casos de descendentes de reprodutores alimentados com dietas ricas em ácidos gordos, influenciariam na composição proteica do saco vitelino, aumentando a percentagem da taxa de eclosão, o que foi verificado num ensaio com robalos, apresentando estes, melhores resultados na sobrevivência das larvas durante os primeiros momentos.

Fernández-Palacios & Izquierdo (2009), afirmam que em algumas espécies marinhas como da dourada e do pargo japonês, a composição do ovos é afetada pela dieta em poucas semanas de alimentação dos reprodutores, em sargos do golfo (*Lutjanus campechanus*) é necessária a alimentação com dietas ricas em PUFAs com dois meses de antecedência ao período de posturas. Desse modo é possível também melhorar a qualidade dos ovos e com a percentagem de taxa de eclosão do robalo alimentando os seus reprodutores com níveis apropriados de ácidos gordos durante o período da vitelogénese.

Neste ensaio durante a análise da influência da temperatura da água sobre os resultados da taxa de eclosão nos dias após a postura, verificou-se que não houve correlação alguma, não tendo sido a temperatura a principal responsável pelos valores obtidos. Pois a temperatura esteve em intervalos que favoreceram a ocorrência de posturas (entre 16,8 e 21,7°C) que era adequado pra que os ovos eclodissem e as larvas sobrevivessem.

Geffen & Nash (2012) afirmam que a qualidade dos ovos, está relacionada com um conjunto de indicadores (extrínsecos e intrínsecos) que na

aquacultura são utilizados para determinar a qualidade de um lote. A taxa de eclosão, a viabilidade e o tamanho dos ovos e das larvas são alguns dos indicadores. Dependendo da espécie marinha estes indicadores teriam um efeito diferenciado, não sendo somente eles os principais factores influenciadores, mas também a temperatura que, dependendo dela, pode influenciar no tamanho da larva durante o seu desenvolvimento durante a fase de incubação e na eficiência de utilização das reservas vitelinas até à abertura da boca.

Os ovos provenientes dos reprodutores alimentados com a dieta DC tiveram maiores diâmetros, comprimentos e pesos secos dos ovos e das larvas, embora somente com diferenças significativas entre os pesos secos e não nos diâmetros registrados. É observado que ovos mais pesados tenham maior tamanho, e que isso signifique possuírem maior reserva de nutrientes para garantirem a alimentação intrínseca, até que a larva esteja em condições de se alimentar exogenamente.

Em ambos os lotes de reprodutores durante o ensaio verificou-se que o diâmetro dos ovos não decresceu ao longo do tempo, mas oscilou com o decorrer deste período de posturas, resultado este que foi contrário ao observado por Baynes, *et al.* (1995), onde afirmam que as médias dos diâmetros em posturas de linguados, diminuiu progressivamente durante o período reprodutivo.

Segundo Bagenal, (1971) a variabilidade no tamanho dos ovos ao longo de um período de posturas, está relacionada com o tempo da postura, com a idade das fêmeas e as variações ambientais que os peixes forem sujeitos.

Por outro lado, como não foi feita a identificação genética dos ovos, logo não se sabe quais as fêmeas teriam originado as posturas e em que

quantidade e, possivelmente provocado a oscilação, sabendo que segundo Brooks *et al.* (1997), os genes parentais influenciam na qualidade dos ovos.

Neste estudo sobre a qualidade dos ovos, focou-se a atenção em duas enzimas lisossomais, as catepsinas B e D. Em particular as atividades destas enzimas foram estudadas durante o estado de desenvolvimento embrionário blástula dos ovos de *S. senegalensis*, provenientes de lotes alimentados com diferentes dietas (Enriquecida e Controlo). A catepsina B apresentou níveis de atividade ligeiramente mais altos nos ovos inviáveis do tanque DE, embora não tenham sido significativas as diferenças quando comparados com os ovos viáveis.

A atividade da catepsina B é visível em todos os estados de desenvolvimento embrionário e durante o ensaio realizado com ovos de robalo, Carnevali, *et al.* (2001), verificaram que os níveis de atividade da catepsina B foram superiores nos ovos inviáveis quando comparados com os ovos viáveis no estado de blástula, porém não sendo significativas as diferenças encontradas.

A catepsina D em amostras do tanque DE apresentou níveis altos de atividade nos ovos inviáveis, existindo diferenças significativas quando comparados com os ovos viáveis. A catepsina D é muito importante na produção de ovos viáveis, e segundo Carnevali, *et al.* (1999) numa pesquisa com ovos na fase de blástula do desenvolvimento embrionário de douradas, os níveis de atividade da catepsina D também foram significativamente altos nos ovos inviáveis em relação aos viáveis.

Isto provavelmente ocorre pelo facto da catepsina D se encontrar em muitos tipos de células e segundo várias pesquisas como a de Carnevali, *et al.* (1999), está envolvida no processo apoptótico. Tratando-se de ovos inviáveis

sem qualidade, a apoptose aumenta mais no processo de eliminação das células danificadas. Nos ovos viáveis esta catepsina é importante para o desenvolvimento embrionário, eg. na eliminação do tecido larval durante a metamorfose dos anfíbios e insectos; na regressão da cauda do girino; eliminação de tecidos entre os dedos.

A atividade de ambas catepsinas B e D são visíveis nos dois tipos de ovos (viáveis e inviáveis). Comparando-se com o nível de atividade das catepsinas B e D nos ovos viáveis e nos inviáveis do tanque DE, foram vistos níveis mais elevados de atividade da catepsina D nos ovos inviáveis e menor atividade nos ovos viáveis em relação a catepsina B.

Durante o ensaio sobre a atividade das catepsinas em robalos, Carnevali, *et al.* (2001) observaram que as catepsinas B e D em ambos os ovos viáveis e inviáveis. Durante o desenvolvimento embrionário de ovos de douradas no mesmo ensaio, o nível da catepsina B, foi máxima durante a fase inicial do desenvolvimento embrionário, altura em que não há modificações do padrão de electroforese (migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito) de proteínas do vitelo. Especula-se que esta proteinase pode estar envolvida na activação inicial da catepsina D, ambas estão também relacionadas com a produção de ovos viáveis em ovos do peixe zebra (*Danio rerio*) e no final da fase reprodutiva estão também envolvidas com a reabsorção dos ovócitos segundo Carnevali, *et al.* (2006).

Durante o ensaio específico de incubação dos ovos dos dois tanques à temperatura de 17°C, as larvas apresentaram diferenças significativas, relativamente ao período de tempo que levaram a eclodir, sendo que as larvas do tanque DC levaram 12h mais que as larvas de DE para eclodirem. Tal como

Godinho (2007) afirma que a duração da embriogénese é influenciada pela temperatura, sendo que em temperaturas mais altas a duração é menor. Segundo Angius & Cañavate, (2004), a temperatura da água é um dos responsáveis pelo sucesso durante o desenvolvimento larvar nos primeiros dias após a eclosão dos ovos. Dinis *et al.* (1999), afirmam que os ovos de *S. senegalensis* tornam-se mais lentos a eclodirem e a desenvolverem, em certas temperaturas, normalmente as inferiores que 16°C.

Durante o ensaio geral observou-se que os ovos de linguados, normalmente eclodiam em até 12h após a incubação, e em poucos casos é que levaram mais tempo. A oscilação do período de tempo para a eclosão dependeu mesmo da temperatura e do estado de desenvolvimento do ovo em que foi colocado a incubar. Segundo Ozacan (2010) os linguados podem levar até 42h para eclodirem a 19°C e segundo Godinho (2007) e Bolzalgo (2008) as larvas podem levar até uma semana para a abertura da boca dentro de renovação contínua de ar de 0,50 a 0,65 min<sup>-1</sup>. Sendo que para Simões (2011) a temperatura ideal para o desenvolvimento larval está entre o intervalo de 16,5 ± 0,5 °C e 22 ± 1°C.

## VII. Conclusões

Tendo em conta as condições em que este trabalho foi desenvolvido, podemos inferir que os componentes nutricionais (DHA/EPA) desta dieta enriquecida afetaram positivamente na qualidade das posturas no desenvolvimento das larvas.

Sendo que os peixes pertencentes ao tanque DE tiveram uma quantidade de posturas (quarenta e sete posturas) superior ao tanque DC (quinze posturas).

A temperatura influenciou a ingestão de alimento por parte dos reprodutores e na emissão dos ovos, sendo que em temperaturas entre 16,7°C a 21,5°C foram as adequadas para o período reprodutivo e para um maior estímulo alimentar dos peixes.

O diâmetro dos ovos do tanque DC, o comprimento e peso seco das larvas, foi influenciado pelo tipo de dieta, sendo sempre maior comparativamente com o tanque DE.

As catepsinas B e D são indicadores de qualidade dos ovos e a atividade de ambas as catepsinas é visível tanto nos ovos viáveis como nos inviáveis.

Os níveis de atividade da catepsina D para os ovos do tanque DE foram significativamente altos para os ovos inviáveis em relação aos viáveis, para os ovos viáveis e inviáveis do tanque DC hoveram níveis proximos de atividade.

Contudo, é necessaria a elaboração de mais estudos nesta área, abrangendo mais tanques com reprodutores alimentados com a mesma dieta e com maior duração temporal, de forma a englobar todas as épocas de postura anuais, para que melhor se possa verificar se existem diferenças com as variações do ano.

## VIII. Referências Bibliográficas

Anguis, V., Cañavate, J.P., (2004). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243. Pag.133-145.

Antunes, J.C.S., (2011). *Solea senegalensis* como bioindicador da qualidade sedimentar estuarina.

Araujo, R.,B., (2009). Desova e fecundidade em peixes de água doce e marinhos. *Revista de biologia e ciências da terra*. Vol.9, nº 2. Pag. 25-31.

Bagenal, T.B., (1971). The interrelation of the size of fish eggs, the date of spawning and the production cycle. *Fish Biol.*, Vol. 3. Pag. 207-219.

Beirão, J., Soares, F., Herráez, M.P., Dinis, M.T., Cabrita E., (2009). Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. Pag. 63-81.

Beirão, J., Soares, F., Herráez, M.P., Dinis, M.T., Cabrita E., (2011). Changes in *Solea senegalensis* sperm quality throughout the year. *Animal Reproduction Science*, Vol. 126, Issues 1-2, Pag. 122-129.

Bobé, J., Labbé, C., (2010). General and comparative endocrinology. *Elsvier*. Pag. 535-548.

Bock, C.L., Padovani, C.R., (2000). Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. *Acta Scientiarum*, Pag. 495-501.

Borges, R., Ré, P., Azevedo, C., (2001). *Ichthyodinium chabelardi* (Hollande & Cachon, 1952), dinoflagelado parasita dos ovos de sardinha. *Ciência Biológica. Ecology and Systematics (Portugal)*, Pag. 227-243.

Branco, M.A.C., (2003). Estudo da produção de linguado (*Solea senegalensis* KAUP, 1858) em tanques de terra. Trabalho apresentado ao IPIMAR no âmbito das Provas Públicas de acesso à Categoria de Investigador auxiliar da Carreira de Investigação Científica.

Brooks, S., Tyler, C.R., Carnevali, O., Coward, K., Sumpter, J.P., (1997). Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* 201, Pag. 45- 54.

Cabrita, E., Soares, F., Dinis, M.T., (2006). Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* 261, Pag. 967-975.

Cabrita, E., Roblesand, V., Herráez, P., (2009). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater Species**, Sperm quality assessment. Pag. 93-147.

Cañavate, J.P., (2009). Relevancia de la reproducción en la diversificación de la piscicultura marina en España. **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Fundación observatorio español de acuicultura consejo superior de investigaciones científicas ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. Madrid. Pag. 600-642.

Carnevali, O., Centonze, F., Brooks, S., Marota, I., Sumpter, J.P., (1999). Molecular Cloning and Expression of Ovarian Cathepsin D in Seabream, *Sparus aurata*. *Biology of reproduction* 61. Pag. 785-791.

Chwieralski C.E., Welte T., Bühling F., (2006). Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*. Pag. 143-149.

Conceição, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Cláudia, A., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F., Dinis, M.T., (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Science Direct.

Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., Conceição, L.E.C., Gomes, E. F., Dinis, M.T.,(2004). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). Aquaculture Research, 35, Pag. 1122-1130.

Dinis, M.T, Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C.,(1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. Aquaculture 176. Pag. 27-38.

Diniz, M., (1998). **Manual de Aquacultura**. A aquacultura. Pag. 19-21.

Ferreira, P.M.P., (2009). Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P.

Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., (2009). Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta. **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Fundación observatorio español de acuicultura consejo superior de investigaciones científicas ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. Madrid. Pag.338-400.

FAO, (1996). The State of World Fisheries and Aquaculture. Sofia Report, Pag.1-30.

Fu, Y.H., Nishinaka, T., Yokoyama, K., Chiu, R., (1998). A retinoblastoma susceptibility gene product RB, targeting protease is regulated through the cell cycle. *FEBS Letters*. Pag. 89-93.

Furuya, W.M., (2001). Nutrição de Peixes. **Fundamentos da Moderna Aqüicultura**. Ulbra, Pag.50-68.

Geffen, A.J., Nash, R.D.M., (2012). Egg development rates for use in egg production methods (EPMs) and beyond. *Fisheries Research*. Pag. 48-62.

Godinho H.P., (2007). Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.3. Pag.351-360.

Gozalbo, M.J.A., (2007). Fisiología de la reproducción del lenguado Senegalés (*solea senegalensis*): mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura. Tesis Doctoral. Universitat de valencia. Spain.

Guzmán, J.M., Ramos, J., Mylonas, C.C., Mañanós, E.L., (2011). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture* 316. Pag. 121-128.

Iseki, K.K., Negrão, J.A., Castrucci, A.M.L., (2008). Localização e histologia da glandula Pineal de Pacu, *Piaractus mesopotanicus* (Teleostes, characiforme, characidae).

Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon A.G.J., (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197. Pag. 25-42.

Izquierdo, M.S., (2002). Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes*, Volume 63. Pag. 91-102.

Kos, J.:Lah, T.T., (1998). Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: Target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in câncer. Pag.1349-1361.

Le François, N.R., Jobling, M., Carter, C., Blier, P.U., Savoie, A., (2010).  
Finfish aquaculture diversification. Pag. 51.

Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C., (2009). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater Species**, Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. Pag. 3-80.

Meneses, I., (2003). Estimação de factores que condicionam a variabilidade do recrutamento de peixes da costa Atlântica da península Ibérica. Dissertação original apresentada para acesso à categoria de Investigador auxiliar. Departamento de ambiente aquático INIAP/IPIMAR.

Mendes, A.I.C., (2008). Influência da dieta parental na qualidade lipídica dos ovos e no desenvolvimento embrionário de Camarinha, *palaemonetes varians*. Mestrado em Biologia Marinha Especialização em Pescas e Aquacultura. Universidade do Algarve. Portugal.

Muniz, J.A.S.M., Castanho, M.T.J.A., Santos, A.J.G., (2008). Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Pag. 205-211.

Nagler, D.K., Storer, A.C., Portaro, F.C.V., Carmona, E., Juliano, L & Ménard, R., (1997). Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* 36. Pag. 12608-12615.

Navarro, R.D., Navarro, F.K.S.P., Filho, J.T.S, Filho, O.P.R., (2010). Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. Revista Augustus. Ano 15, nº 30. Pag. 108-118.

Nomura, I., (2010). O futuro da pesca e da aquacultura marinha no mundo. *Ciência do mar*. Vol.62, nº 3. Pag. 28-32.

Özcan, F., (2010). Efecto de la *artemia* enriquecida con distintas Emulsiones comerciales sobre el crecimiento y desarrollo esquelético de larvas del Lenguado senegalés (*solea senegalensis* kaup, 1858). Master oficial en cultivos marinos. Las Palmas de Gran Canarias.

Paiva, P.C., (2006). **Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira**. Filo Annelida Classe Polychaeta. nº18. Pag. 261-298.

Pillay, T.V.R., Kutty, M.N., (2007). Aquaculture: Principles and Practices. Volume 15, nr.6. 2ª Edição.

Porta J, (2006). Desarrollo de microsatélites y su aplicación al cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Tesis doctoral. Universidad de Málaga.

Ré, P.M.A.B., (1984). Ictioplâncton da região central da costa portuguesa e do estuário do tejo. Ecologia da postura e da fase planctónica de sardina pilchardus (walbaum, 1792) e de engraulis encrasicolus (linné, 1758). Lisboa.

Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T., (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquiculture.

Ribeiro, R.P., Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro, R.P., Zimmermann, S.(Org.), (2001). **Fundamentos da Moderna Aqüicultura**. Espécies exóticas: Criação de Tilápias. Ulbra. Pag. 91-96.

Riveiro, I. Guisande, C., Franco, C., Lago de Lanzós, A., Maneiro, I., Vergara, A.R.,(2003). Egg and larval amino acid composition as indicators of niche resource partitioning in pelagic fish species. Vol. 260. Pag. 255–262.

Santos, J.B., (2011). Sperm quality in marine teleosts: applications to broodstock management and sperm storage in two farmed species *Solea*

*senegalensis* and *Sparus aurata*. Thesis presented for the obtention of PhD grade. Universidad de León. Pag. 9-51.

Sarasquete, J.M.A.C., (2005). Atlas histológico del Lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid.

Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling.

Simões, I.J.V., (2011). Aplicação de protocolos experimentais para o estudo da infecção do linguado (*Solea senegalensis*) por *Tenacibaculum maritimum*. Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar e Recursos Marinhos - Esp. em Aquacultura e Pescas. Universidade do Porto. Portugal.

Souza, S.M.G., Anido, R.J.V., Tognon, F.C., (2007). Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes—fontes e relações. Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v.6, n.1. Pag. 63-71.

Tingaud-Sequeira, A., Carnevali, O., Joan Cerdà, J., (2010). Cathepsin B differential expression and enzyme processing and activity during *Fundulus heteroclitus* embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 158. Pag. 221–228.

Tomé, J.R.S., (2008). Desenvolvimento de critérios para a atribuição do rótulo ecológico a produtos de aquacultura da reserva natural do estuário do sado. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil Gestão e Sistemas Ambientais. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

Villalta, M., Estevez, A., Bransdenb, M.P., Bell, G., (2005). The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. Science direct. Aquaculture 249.

Zar, J.H., (1996). Biostatistical analysis. 3ª Edição.

## **IX. Anexos**

### **9. 1 Anexo I**

#### 1. Preparação das amostras:

Após a limpeza dos ovos em água destilada, as amostras foram mergulhadas em azoto líquido e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram posteriormente submetidas a um processamento de modo a separar a fracção solúvel e insolúvel.

Foram colocados 200 mg de ovos em três partes de água destilada;

Do extracto bruto a partir dos ovos para os ensaios enzimáticos foi feita por homogeneização das amostras com água destilada (1:2, w:v), a frio durante 60 segundos com uma pausa de 10 segundos ao atingir os primeiros 30 segundos;

O homogenado foi centrifugado a 14 000 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ;

Recolheu-se o sobrenadante o qual foi utilizado na determinação da atividade das catepsinas através dos estudos electroforéticos.

#### a) Para análise de catepsina B

As condições de reacção óptimas foram de  $40^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0; utilizando 10 $\mu\text{l}$  de extracto em bruto durante 20 minutos:

10 $\mu\text{l}$  de extracto bruto foi diluído com 0,1% brij 35 e adicionado a 375 $\mu\text{l}$  de tampão de activado (88mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,33mM de disodium EDTA, 2,7mM de cisteína, pH 6,0; mantida a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para permitir a ativação da enzima.

O substrato específico Z-Arg-Arg-NNap (20mM em água) foi adicionado para atingir 500 $\mu\text{l}$  de volume total. A reacção foi conduzida durante 20 minutos a

40°C e depois paráda com 500µl de reagente de acoplamento (5µl de NaNO<sub>2</sub> 0,2M, 50µl de Base Solução stock<sup>1</sup> e encher até 5ml com Color reagent<sup>2</sup>).

A reacção foi lida a 520 nm.

b) Para a análise de catepsina D

As condições ótimas foram 37°C e pH 3,2 e o tempo de reacção óptimo de 30 minutos.

40µl de extrato em bruto foi incubado com 460µl de tampão de formiato sódio a 0,25M num volume final de 500µl.

A reacção começou com a adição de 125µl de hemoglobina a 5%. Após 30 minutos a reacção foi parada com a adição de 500µl de 10% ácido Tricloroacetico (TCA), depois centrifugou-se esta mistura a 14.000 g durante 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi lido na 280nm.

## 2. Quantificação de proteínas totais

Para a determinação das proteínas totais para avaliação da atividade das catepsinas B e D foi utilizado o método de Lowry.

Foi da fracção solúvel que se recolheram o extrato bruto, que determina a concentração de proteínas totais. Após o processamento e até à determinação da concentração de proteínas totais, a fracção solúvel foi conservada a -20°C. Este procedimento foidescrito no protocolo de processamento dos tecidos para determinação de metalotioninas, metais e peroxidação lipídica.

Para a determinação da recta de calibração foi-se utilizado as seguintes concentrações para a recta de calibração (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500) da solução proteica de BSA (Bovine Serum Albumin).

- <sup>1</sup>Base Solução stock: 11,25 mg <sup>3</sup>Fast Garnet Salt em 2,5 ml etanol, 1,5 ml HCl 1M perfazer até 5 ml com água e manter a 4°C.
- <sup>2</sup>Color Reagent: 36,45 mg Mersalyl Acid em 0,9 NaOH 0.5 M, 4,5 mg dissodium EDTA, em pH 4 com HCl 1M e com 7,5 ml com água. Adicionar 7,5 ml Brij 35 a 4%.
- <sup>3</sup>Fast Garnet Salt (1mg/ml): 10 mM pCMB + 50 mM EDTA, pH 6.