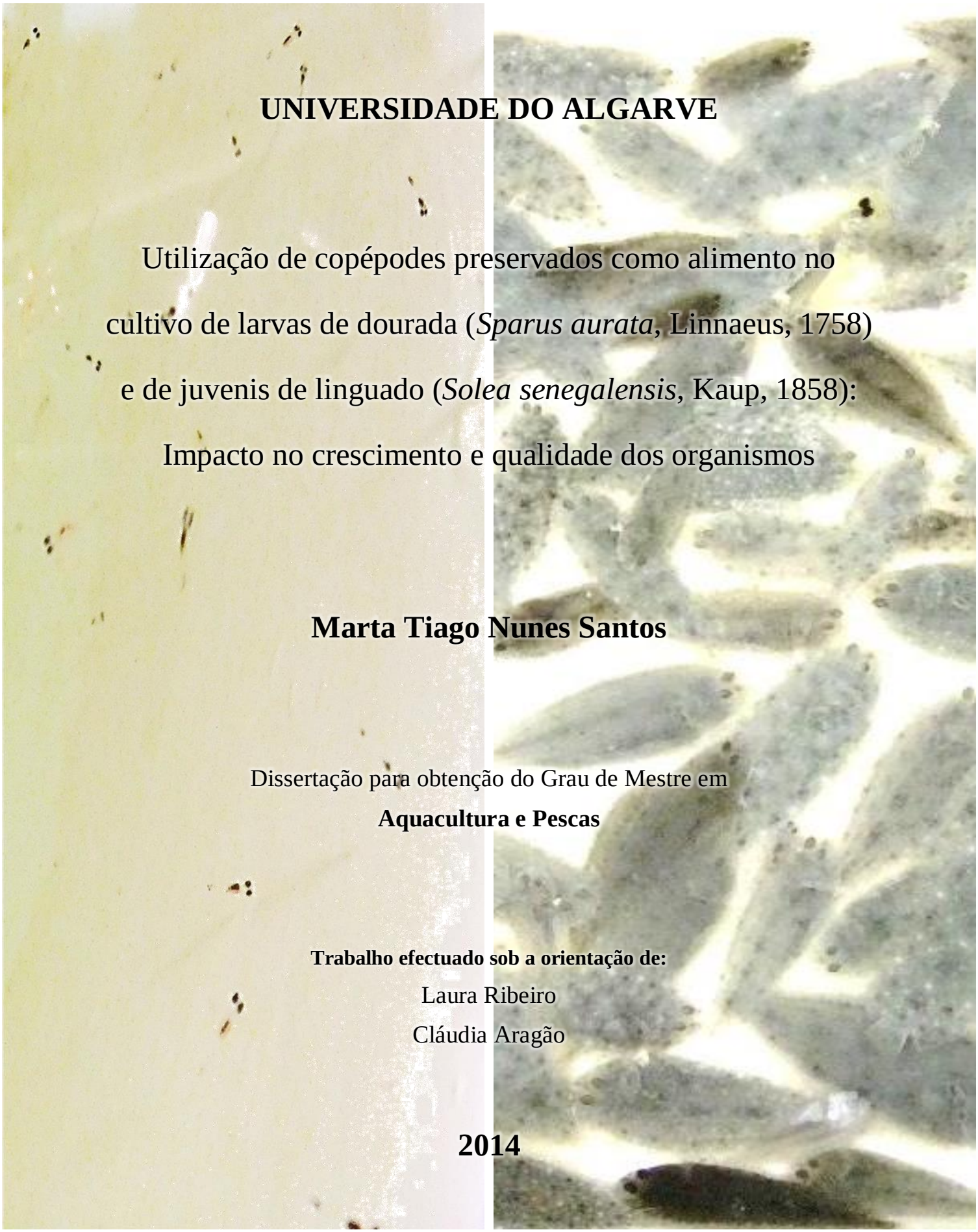

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Utilização de copépodes preservados como alimento no cultivo de larvas de dourada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) e de juvenis de linguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858): Impacto no crescimento e qualidade dos organismos

Marta Tiago Nunes Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Aquacultura e Pescas

Trabalho efectuado sob a orientação de:

Laura Ribeiro

Cláudia Aragão

2014

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Utilização de copépodes preservados como alimento no cultivo de larvas de dourada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) e de juvenis de linguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858): Impacto no crescimento e qualidade dos organismos

Marta Tiago Nunes Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Aquacultura e Pescas

Trabalho efectuado sob a orientação de:

Laura Ribeiro
Cláudia Aragão

2014

Utilização de copépodes preservados como alimento no cultivo de larvas de dourada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) e de juvenis de linguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858): Impacto no crescimento e qualidade dos organismos

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright Marta Tiago Nunes Santos

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Design da capa: Marta Santos Fotografias: Marta Santos

Para os meus Pais

Índice

Agradecimentos ..... **iii**

Resumo ..... **iv**

Abstract ..... **v**

1. Introdução **1**

2. Material e Métodos **6**

2.1. Origem do material biológico **6**

2.2. Desenho experimental **6**

2.2.1. Substituição parcial do alimento vivo por copépodes preservados no cultivo larvar de dourada **6**

2.2.1.1. Protocolos alimentares 6
2.2.1.2. Cultivo **10**
2.2.1.3. Amostragens **11**

2.2.2. Introdução de copépodes preservados como ingrediente na formulação de dietas inertes no cultivo juvenil de linguado **11**

2.2.2.1. Dietas **11**
2.2.2.2. Cultivo **12**
2.2.2.3. Amostragens **13**

2.3. Componente analítica **13**

2.3.1. Biometria **13**
2.3.2. Testes de *stress* **14**
2.3.3. Malformações **15**
2.3.4. Enzimas digestivos **16**
2.3.5. Histologia **17**
2.3.6. Cortisol **19**

2.4. Análise estatística **20**

3. Resultados **22**

3.1. Substituição parcial do alimento vivo por copépodes preservados no cultivo larvar de dourada **22**

3.1.1. Crescimento **22**

3.1.2. Sobrevivência **28**

3.1.3. Teste de *stress* **29**

3.1.4. Malformações **29**

3.2.4.1. Incidência de malformações **30**
3.2.4.2. Nível de severidade **31**
3.2.4.3. Fenótipo **32**
3.2.4.4. Carga de malformações **33**
3.2.4.5. Distribuição das malformações por área anatómica **34**

3.1.5. Enzimas Digestivos **36**

3.2.4.1. Tripsina **36**
3.2.4.2. Aminopeptidase **37**
3.2.4.3. Amilase **38**
3.2.4.4. Fosfatase ácida **40**
3.2.4.5. Fosfatase alcalina **41**

3.1.6. Histologia **43**

3.1.7. Cortisol **48**

3.2. Introdução de copépodes preservados como ingrediente na formulação de dietas inertes no cultivo juvenil de linguado **49**

3.2.1. Crescimento **49**

3.2.2. Sobrevivência **54**

3.2.3. Teste de *stres* **54**

3.2.4. Enzimas Digestivos **55**

3.2.4.1. Tripsina **55**
3.2.4.2. Aminopeptidase **56**
3.2.4.3. Amilase **57**
3.2.4.4. Fosfatase ácida **58**
3.2.4.5. Fosfatase alcalina **59**

3.2.5. Histologia **60**

3.2.6. Cortisol **63**

4. Discussão 64

Substituição parcial do alimento vivo por copépodes preservados no cultivo larvar de dourada **64**

Introdução de copépodes preservados como ingrediente na formulação de dietas inertes no cultivo juvenil de linguado **77**

5. Considerações finais 84

6. Referências 86

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Pedro Pousão Ferreira, responsável da Estação Piloto de Piscicultura em Olhão (EPPO) e à Faculdade de Ciências da Universidade do Algarve por me terem dado a oportunidade de elaborar este trabalho e enriquecer o meu conhecimento nesta e outras áreas.

De seguida, agradeço às minhas orientadoras, Professora Doutora Laura Ribeiro e Doutora Cláudia Aragão por toda a atenção e apoio ao longo da elaboração desta tese.

Um agradecimento em especial à Professora Dra. Laura por me ter aturado, posto na linha sempre que necessário, ouvido até os meus disparates, mostrar sempre disponibilidade mesmo quando atulhada em trabalho, entre muitas outras coisas… No fundo, um MUITO OBRIGADA por ter tornado esta tese possível.

Agradeço a todos os trabalhadores, estagiários e afins, que passaram pela EPPO e directa ou indirectamente tiveram um papel importante neste trabalho e sempre tinham uma palavra amiga ou crítica construtiva a fazer.

Particularmente agradeço à Inês Santos (minha parceira de ensaios) e a todos os que tiveram a paciência para me apoiar e dizer: "Estás a fazer isso mal" ou "Fizeste bem assim. Continua!", quando eu mais precisava, ao longo dos ensaios e elaboração deste trabalho.

Agradeço a todos os que me ajudaram na Faculdade de Ciências, em particular ao Professor Doutor Gavaia, que mesmo na minha curta passagem, arranjaram tempo nas suas vidas agitadas e cheias de trabalho para me ensinarem e ajudar sempre que algum problema surgia.

Para aqueles que estiveram mais próximos de mim e aguentaram o meu mau humor, *stress* e alguns momentos menos bonitos…, um OBRIGADA do fundo do meu coração, e a vocês vos digo: não seria DE TODO possível sem a vossa ajuda e companhia nos altos e baixos que foi esta experiência.

Estou muito grata a este trabalho e a tudo o que a ele se relaciona porque me possibilitou conhecer algumas das pessoas que se tornaram minhas grandes amigas, adquirir conhecimentos essenciais para o meu futuro e, acima de tudo, me permitiu crescer bastante. Muito obrigada minhas douradinhas, meus linguadinhos e copépodezinhos!!

A ti, João, obrigada por TUDO o que fizeste, aturaste e apoiaste e por simplesmente seres a pessoa que és.

Por fim, mas **seguramente**, não menos importante, agradeço aos meus GRANDES Pais, a quem dedico este trabalho e (ESPERO!!!) os muitos que ainda estão para vir porque vocês são os meus grandes pilares, sem vocês nada disto era possível e são as pessoas que eu mais **AMO** e **ADMIRO** por fazerem tudo por mim e estarem sempre lá seja a que distância for.

A todos, um sincero MUITO OBRIGADA!

Resumo

A utilização de copépodes em fases críticas do desenvolvimento de várias espécies de peixes pode ser vantajosa devido à sua composição nutricional equilibrada.

A dourada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), e o linguado do Senegal, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), são duas espécies produzidas em aquacultura com elevado valor comercial, existindo práticas de cultivo bem estabelecidas e tecnicamente dominadas. Todavia estas espécies apresentam períodos críticos no seu desenvolvimento, nomeadamente a fase larvar na dourada e a adaptação ao alimento inerte no linguado.

Com este trabalho pretende-se avaliar o potencial da introdução de copépodes preservados na qualidade de larvas de dourada e juvenis de linguado e contribuir para o estabelecimento de um protocolo alimentar adequado que inclua este alimento experimental, de forma a ser adoptado pelas maternidades de peixes marinhos.

Realizaram-se dois ensaios distintos: 1º - Substituição parcial do alimento vivo por copépodes preservados no cultivo larvar de dourada e 2º - Introdução de copépodes preservados como ingrediente na formulação de dietas inertes no cultivo juvenil de linguado. No primeiro ensaio foram testados dois protocolos alimentares, com diferentes percentagens de copépodes, contra o protocolo Controlo habitualmente utilizado no cultivo larvar de dourada. No segundo ensaio foi testada uma dieta formulada com copépodes contra uma dieta comercial (Controlo), adequada para o cultivo de linguado.

Foram avaliados parâmetros de qualidade como a biometria, a actividade enzimática digestiva, a morfologia digestiva e os níveis de cortisol como resultado da indução aguda de *stress*, para as duas espécies. Adicionalmente, as malformações esqueléticas e insuflação da bexiga gasosa nas larvas de dourada e a pigmentação cutânea dos juvenis de linguado foram também estudados.

Concluiu-se que a introdução de copépodes preservados permitiu obter indivíduos de qualidade semelhante em termos da sua capacidade e morfologia digestiva, resistência ao *stress*, incidência de malformações e pigmentação, apesar do menor crescimento observado quando comparado com os grupos controlo.

Contudo, são imprescindíveis melhoramentos neste produto para que a sua utilização possa ser ainda mais rentável e proveitosa, com rumo a uma produção sustentável e de qualidade.

Abstract

The use of copepods in critical stages of fish species development may be advantageous due to its nutritional balance.

The seabream, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), and the Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), are two species mainly produced in aquaculture with high commercial value and well-established, technically dominated, farming practices. However, this species exhibit critical periods being the larval stage at seabream and the adaptation to inert food in sole.

This work aims to evaluate the potential of dietary introduction of preserved copepods on seabream larvae and sole juveniles' quality and to contribute to the establishment of an adequate feeding protocol to this experimental food, in order to be adopted by other marine fish hatcheries.

Two distinct trials were performed: 1st - Partial replacement of live food by preserved copepods in seabream larval rearing, and 2nd -. Introduction of preserved copepods as an inert diet formulation ingredient for sole juvenile rearing. In the first trial, two feeding protocols with different percentages of copepods were tested against de feeding protocol usually applied (Control) on seabream larval rearing. In the second trial, a diet formulated with preserved copepods was assayed alongside a commercial diet (Control), suitable for sole culture.

Quality parameters such as biometrics, digestive enzyme activity, digestive morphology and cortisol levels as a result of acute stress induction, were evaluated for both species. Additionally, skeletal malformations and swimbladder inflation in seabream and skin pigmentation on sole were also studied.

It was found that the introduction of preserved copepods led to fish similar in quality regarding its digestive capacity and morphology, *stress* resistance, skeletal malformation incidence and pigmentation, despite the lower growth observed when compared to the control groups.

However, improvements are essential in this product for its use may be even more suitable and profitable to reach a sustainable and high quality production.

1. *Introdução*

A exaustão ou aparente declínio de muitos recursos pesqueiros tem vindo a traduzir-se numa diminuição das capturas tendo, assim, a aquacultura um papel crucial na garantia de continuidade do consumo de pescado (Piccinetti *et al*., 2014; ARH Centro, 2012; Dinis *et al*., 1999). O avanço na produção em aquacultura e a possibilidade de cultivar novas espécies de elevado valor económico (Imsland *et al*., 2003) estão dependentes do sucesso em produzir larvas e juvenis em cativeiro (Rocha, 2009), saudáveis e de elevada qualidade (Piccinetti *et al*., 2014; Conceição *et al*., 2009). Uma nutrição adequada é um factor considerado crítico para a promoção de um crescimento normal e saudável em peixes (Halver e Hardy, 2002).

No cultivo larvar, a qualidade do alimento é determinante para que as larvas obtenham os nutrientes necessários ao seu normal desenvolvimento. Como as larvas de peixes marinhos têm um elevado potencial de crescimento, têm igualmente necessidades nutritivas específicas (Ajiboye, *et al*. 2011; Van der Meeren *et al.* 2008; Rønnestad *et al.* 1999), obrigando a que o valor nutritivo do alimento seja adequado à espécie em cultivo. Por norma, é necessário recorrer a técnicas de bioencapsulação ou enriquecimento nutritivo que permitem a produção de presas com requisitos nutricionais elevados, principalmente em ácidos gordos da série *n*-3 e em aminoácidos (Pousão-Ferreira, 2009).

Devido às suas reduzidas dimensões e comportamento passivo, as larvas precisam de ter à sua disposição presas vivas com movimentos compatíveis com os seus mecanismos de predação e com dimensões adequadas à proporção das suas bocas, permitindo a sua fácil ingestão e captura. Nesta fase, é necessário ter em conta não só o tamanho das presas mas também a quantidade, que deve ser suficiente, de forma a facilitar o encontro e a alimentação pelos peixes (Pousão-Ferreira, 2009).

Contudo, o alimento vivo acarreta, geralmente, muitos custos e representa uma porção significativa na totalidade dos custos operacionais de uma aquacultura (Langdon, 2003; Person Le Ruyet *et al*., 1993). Adicionalmente, quebras das culturas devido a contaminações podem levar ao aumento do risco de doenças nos organismos cultivados (Langdon, 2003). Assim, a procura por um alimento capaz de suportar o crescimento e desenvolvimento larvares desde a primeira alimentação tem crescido em importância, com o principal objectivo de manter a qualidade do peixe reduzindo ao mínimo a necessidade de organismos vivos nas maternidades, tais como microalga, rotíferos e *Artemia* (Piccinetti *et al*., 2014; Guerreiro, *et al*., 2010; Yúfera *et al*., 2005).

No cultivo juvenil, as dietas artificiais formuladas a partir de vários ingredientes são a principal fonte nutritiva em aquacultura (Halver e Hardy, 2002). A formulação de dietas adequadas tem sofrido várias alterações, motivadas pelas crescentes exigências de cultivo e necessidades nutricionais dos peixes (Halver e Hardy, 2002). Quando equilibradas, estas dietas providenciam os nutrientes requeridos para um funcionamento fisiológico adequado e podem influenciar positivamente a saúde dos peixes que dela se alimentam (Halver e Hardy, 2002).

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

No meio natural, a maioria da dieta das larvas de peixes marinhos é constituída por copépodes (Piccinetti *et al*., 2014; Olivotto *et al*., 2010a; Holt, 2003) que possuem um perfil nutricional adequado às necessidades das larvas (Evjemo *et al*., 2003). Os copépodes são fontes notáveis de ácidos gordos altamente insaturados (HUFAs) tais como ácido docosahexanóico (DHA), ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido araquidónico (ARA) (Piccinetti *et al*., 2014; Watanabe *et al*., 1983; Støttrup e Jensen, 1990), essenciais para o crescimento e sobrevivência larvar (Piccinetti *et al*., 2014). São, também, fontes naturais de, astaxantinas, vitaminas C e E e antioxidantes (Van der Meeren, 2003), podendo, estes últimos, proteger os HUFA contra a peroxidação, sendo considerados benéficos para a saúde das larvas de peixe (McKinnon *et al*., 2003).

As características bioquímicas dos copépodes transformam-nos numa boa alternativa, ou suplemento, ao alimento vivo para cultivo larvar (Ajiboye *et al*., 2011; Schipp, 2006; Evjemo *et al*., 2003; Hernandez *et al*., 2003; Støttrup, 2000; McEvoy *et al*., 1998; Rønnestad *et al*., 1998; Shansudin *et al*., 1997: Støttrup e Norsker 1997). Segundo Hernandez *et al*. (2003) e Schipp (2006), os copépodes têm um valor nutricional excelente quando comparado aos rotíferos (*Brachionus* spp.) e *Artemia* spp., pois os conteúdos em *n*-3 HUFA destes alimentos são baixos, a não ser que sejam enriquecidos com emulsões (Ajiboye *et al*., 2011; Evjemo *et al*., 1997; Rainuzzo *et al*., 1994; Dhert *et al*., 1993; Léger *et al*., 1987, 1986). Adicionalmente, devido ao seu local de armazenamento (Bell *et al*., 2003), os lípidos dos copépodes estão biologicamente mais disponíveis (McKinnon *et al*., 2003) para as larvas que se alimentam deles, do que os lípidos constituintes da artémia (Nanton e Castell, 1999). Para

além do cultivo larvar, os copépodes também podem melhorar a qualidade de peixes juvenis se incorporados na sua dieta de forma adequada e equilibrada com os restantes componentes.

O interesse da introdução de copépodes na alimentação em aquacultura tem crescido desde 1980, devido à melhoria das taxas de sobrevivência no cultivo larvar de várias espécies de peixes marinhos (Ajiboye *et al*., 2011). Com base na bibliografia não existe qualquer dúvida que os copépodes são uma fonte potencial de alimento vivo para a larvicultura de peixes marinhos. Apesar do potencial deste zooplâncton na natureza, tanto quantitativa como qualitativamente, existe um risco de infeções parasitárias no seu uso quando oriundos de meios naturais, que tem limitado a aplicação deste alimento em aquacultura (Ajiboye *et al*., 2011). Além disso, a composição bioquímica destes organismos ainda se encontra em estudo (Ajiboye *et al*., 2011; Van der Meerren *et al*., 2008; Fyhn *et al*., 1993, 1995; Helland *et al*., 2003) assim como a sua *performance* quando comparado a outros alimentos vivos normalmente usados em aquacultura marinha (Ajiboye *et al*., 2011). Outra razão que justifica a reduzida utilização destes organismos em aquacultura prende-se com o desafio da produção de culturas de grandes volumes, cuja tecnologia ainda não é totalmente conhecida (Ajiboye *et al*., 2011). Por isto, a possibilidade de preservar copépodes após a captura no meio natural, surge como uma boa oportunidade de obter um alimento de elevada qualidade nutricional que mantenha ao longo do tempo a sua composição bioquímica (Piccinetti *et al*., 2014, 2012; Olivotto *et al*., 2010b) e seja economicamente rentável, disponível todo o ano.

O crescimento e sobrevivência são os critérios mais aplicados na determinação da adequabilidade de um regime alimentar para uma determinada espécie (Engrola, 2008; Dinis *et al*., 2000). Apesar de já serem produzidas grandes quantidades de larvas de peixe de várias espécies, as taxas de sobrevivência nesta fase são geralmente baixas ou extremamente variáveis e o potencial de crescimento não é, em muitos casos, completamente aproveitado (Conceição *et al*., 2003; Shields, 2001). Na fase juvenil sabe-se que são vários os agentes que contribuem para a redução dos potenciais de crescimento e de cultivo comercial (Gatta *et al*., 2011; Ribeiro *et al*., 2002, 1999b). Embora haja pouca informação focada no processo de transição para o estádio juvenil (Rema *et al*., 2008; Dias *et al*., 2004; Fernández-Díaz *et al*., 2001), a alimentação e nutrição são pontos considerados particularmente críticos para um bom desenvolvimento (Gatta *et al*., 2011).

Outros problemas de qualidade como as malformações esqueléticas (Cahu *et al*., 2003; Koumoundouros *et al*., 1997a, b) e problemas de não insuflação ou sobre-insuflação da bexiga gasosa ainda constituem um problema a resolver em muitas maternidades (Conceição *et al*., 2009; Divanach *et al*., 1996; Chatain e Dewavrin, 1989; Chatain, 1987). Estas

anomalias diminuem a *performance* dos peixes cultivados reduzindo a capacidade natatória, taxa de crescimento e sobrevivência, aumentando a susceptibilidade ao *stress* e a infecções (Engrola *et al*., 2009; Boglione *et al*., 2001; Matsuoka, 1987; Koumoundouros *et al*., 1997a). A pigmentação cutânea também é um elemento de qualidade muito utilizado em peixes mais velhos, fortemente relacionado com a nutrição e os constituintes de uma dieta (Engrola, 2008; Bolker e Hill, 2000). Estes problemas têm uma importância económica considerável no valor de mercado e custo de produção do peixe comercializado (Divanach *et al*., 1996), por provocarem a alteração do seu aspecto visual (Engrola *et al*, 2009; Lall e Lewis-McCrea, 2007; Boglione *et al*., 200l; Koumoundouros *et al*., 1997a, b; Loy *et al*., 1998; Divanach *et al*., 1996) e consequentemente a exclusão do produto por parte dos consumidores.

É durante a ontogénese do sistema digestivo que se registam importantes marcos de desenvolvimento (Ribeiro *et al*., 1999a) e são observadas grandes alterações nos órgãos internos, directamente influenciadas pelos hábitos alimentares (Piccinetti *et al*., 2014; Elbal *et al*., 2004; Arellano *et al*., 2002; Luizi *et al*., 1999; Roo *et al*., 1999). Assim, o conhecimento da morfologia e fisiologia do tracto digestivo constitui um importante modelo de qualidade de um peixe (Martínez-Lagos *et al*., 2014; Guerreiro *et al*., 2010; Papadakis *et al*.,2009; Arellano *et al*., 2002; Ribeiro *et al*., 1999a).

A determinação da presença e nível de actividade dos enzimas digestivos, consoante diferentes protocolos alimentares, pode ser usado como um indicador comparativo do grau de desenvolvimento larvar com o objectivo de promover um melhor crescimento e facilitar a regularização de um modo adulto de digestão. (Castro *et al*., 2013; Pradhan *et al*., 2012; Galaviz *et al*., 2011; Engrola, 2008; Zambonino Infante *et al*., 2008; Ribeiro *et al*., 2002; Cahu *et al*., 2003; Kolkovski, 2001; Martínez *et al*., 1999; Baglole *et al*., 1997; Zambonino Infante *et al*., 1997; Moyano *et al*., 1996; Zambonino Infante e Cahu, 1994; Moyano e Sarasquete, 1993). Da mesma forma, o conhecimento da digestão e assimilação de uma dieta em peixes juvenis pode explicar a aceitação e qualidade da mesma pela forma como os seus componentes são incorporados pelo peixe (Kolkovski, 2001).

Deficiências dietéticas na alimentação de peixes cultivados podem originar uma maior susceptibilidade a factores causadores de *stress* e menor capacidade de resposta perante os mesmos (Van Anholt *et al*., 2004; Koven *et al*., 2003, 2001; Mommsen, 1986). O indicador mais utilizado para a detecção de *stress* é a presença de cortisol (Mommsen *et al*., 1999). O nível de concentração desta hormona, directamente relacionada com a resposta ao *stress*, tem um papel importante também no crescimento e sobrevivência, sendo afectada pelo regime alimentar (Mommsen *et al*., 1999).

A dourada, *Sparus aurata*, (Linnaeus, 1758), é uma espécie de elevada importância económica amplamente cultivada no Mediterrâneo e em Portugal, (Piccinetti *et al*., 2014; Dimitroglou *et al*., 2010; Guerreiro *et al*., 2010; Rocha, 2009; Elbal *et al*., 2004; Boglione *et al*., 2001; Faustino e Power, 2001, 1999, 1998; Koumoundouros *et al*., 1997a, b; Sarasquete *et al*., 1993), que se destaca na área da produção devido à excelente adaptabilidade a condições de cultivo intenso. Actualmente existem práticas de cultivo bem estabelecidas para dourada (FAO, 2013). Contudo, todas elas sofrem de um problema comum: a dificuldade em prever adequadamente quais os requisitos quantitativos nutricionais necessários para que a larva de dourada alcance um crescimento óptimo (Papandroulakis *et al*., 1999).

O linguado do Senegal, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), é um peixe plano muito cultivado em aquacultura extensiva em Portugal e Espanha, de elevado valor económico (Wunderink *et al*., 2011; Borges *et al*., 2009; Dias *et al*., 2004; Ribeiro *et al*., 2002; Imslan *et al*., 2003; Dinis *et al*., 1999; Drake *et al*., 1984). Esta espécie tornou-se prioritária para a diversificação da aquacultura nos países banhados pela costa mediterrânea (Dinis *et al*., 1999). Apesar da cultura desta espécie estar tecnicamente dominada, ainda existem elevadas taxas de mortalidade aquando da passagem para a alimentação inerte, o que tem impedido o desenvolvimento da cultura de linguado a nível comercial (Conceição *et al*., 2007; Ribeiro *et al*., 2002, 1999b; Branco, 2003; Dinis *et al*., 1999, 1992).

Tendo em consideração os principais problemas no cultivo dos períodos críticos de dourada (fase larvar) e linguado (fase juvenil) acima indicados, neste estudo foram analisados vários parâmetros que têm uma influência importante na qualidade larvar e juvenil. A biometria, a actividade enzimática digestiva, a morfologia digestiva e os níveis de cortisol plasmático como resultado da indução aguda de *stress* foram parâmetros examinados em ambas as espécies. Adicionalmente, as malformações esqueléticas e insuflação da bexiga nas larvas de dourada e a pigmentação cutânea dos juvenis de linguado foram também estudados.

Os principais objectivos deste trabalho consistem em avaliar o potencial da introdução de copépodes preservados na qualidade de larvas de dourada e juvenis de linguado e contribuir para o estabelecimento de um protocolo alimentar adequado que inclua este alimento experimental, de forma a ser adoptado pelas maternidades de peixes marinhos.

2. *Material e Métodos*

Os ensaios decorreram na Estação Piloto de Piscicultura em Olhão (EPPO) do Instituto Português do Mar e do Ambiente (IPMA). Num primeiro ensaio pretendeu-se observar a introdução parcial de copépodes preservados no protocolo alimentar e avaliar os efeitos no desenvolvimento larvar da dourada. No segundo ensaio procedeu-se à inclusão de copépodes preservados como ingrediente nas dietas formuladas para pós-larvas de linguado e ao estudo do crescimento destes peixes.

2.1. Origem do material biológico

As larvas de dourada foram obtidas através de postura natural de reprodutores de dourada mantidos em cativeiro na EPPO, cujos ovos foram mantidos em incubadoras cilindrocónicas de 200L de cor branca, com água salgada filtrada a uma temperatura de 18^{o}C, durante 2 dias até à sua eclosão. Aquando da eclosão, foi feita uma amostragem para estimar o número de larvas eclodidas, que depois foram igualmente divididas pelos tanques de ensaio.

As pós-larvas de linguado, com 59 DAE (dias após eclosão), foram fornecidas pelo Centro de Ciências do Mar (CCMar) da Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, e transportadas para a EPPO. Os peixes foram contados e divididos igualmente pelos tanques de ensaio, onde foram aclimatados durante sensivelmente uma semana às condições de cultivo, sendo alimentados 4 vezes por dia com a mesma ração controlo a que estavam sujeitos.

2.2. Desenho experimental

2.2.1. Substituição parcial do alimento vivo por copépodes preservados no cultivo larvar de dourada

2.2.1.1. *Protocolos alimentares*

Neste ensaio testaram-se dois protocolos alimentares em comparação com o protocolo Controlo onde as larvas foram somente alimentadas com alimento vivo, seguindo o protocolo *standard* da EPPO para larvas de dourada.

Protocolo alimentar 50/50: Neste protocolo as larvas foram co-alimentadas com 50% de alimento vivo e 50% de copépodes preservados (**Figura 2.1.**). Desde o 3º até ao 25º DAE, as larvas foram alimentadas com rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos, com uma densidade média diária de 6 rotíferos/ml, ao longo do ensaio. Os náuplios de artémia (*Artemia* spp. estirpe A.F.) foram introduzidos desde o 15º até ao dia 25º dia, com uma média diária de 0,5 náuplios de artémias/ml. Os metanáuplios de artémia (*Artemia* spp. estirpe E.G.) foram administrados desde o 25º dia de ensaio e permaneceram até ao final do cultivo, com uma média de 1,4 artémias/ml por dia. Os copépodes da classe 100-200 µm foram introduzidos ao 8º DAE e permaneceram até ao 26º DAE numa densidade diária média de 7 copépodes/ml. No 20º dia de ensaio iniciou-se a administração de copépodes da classe de tamanho intermédio, 200-300 µm, que perduraram até ao final do ensaio, com uma densidade média de 3 copépodes/ml diários. A última classe de tamanho de copépodes utilizada foi a de 300-400 µm, introduzida ao 32º dia, com uma média de 2 copépodes/ml por dia.

Protocolo alimentar 20/100: Neste protocolo não foram introduzidas artémias e 20% do alimento vivo (rotíferos) começou a ser substituído por copépodes preservados aos 8 DAE, aumentando a percentagem de substituição gradualmente até atingir os 100% aos 25 DAE (**Figura 2.1.**). Os rotíferos foram introduzidos desde o 3º até ao 25º dia, com uma densidade média por dia de 7 rotíferos/ml. Após este dia as larvas foram alimentadas exclusivamente com copépodes preservados. A inclusão de copépodes da primeira classe de tamanho, 100-200 µm, foi feita aos 8 dias e terminou no 26º dia de cultivo, com uma média de 6 copépodes/ml dia. A classe de tamanho intermédio, 200-300 µm, foi introduzida no 20º dia de ensaio e manteve-se até ao final com uma densidade média de 6,4 copépodes/ml diária. A maior classe de tamanho utilizada, 300-400 µm, foi apenas iniciada aos 32 DAE e manteve-se, em média com 4 copépodes por ml diariamente, até ao término do ensaio.

Protocolo alimentar Controlo: Protocolo habitualmente utilizado na EPPO, o qual consiste em administrar apenas rotíferos e artémia (**Figura 2.1.**). Os rotíferos foram introduzidos desde o 3º até ao 25º DAE, com 9 rotíferos/ml em média, por dia. Os náuplios de artémia foram iniciados ao 15º dia de cultivo e fizeram parte da alimentação até ao 25º dia, em média com 1 indivíduo/ml ao dia. Aos 25 dias introduziram-se os metanáuplios de artémia que permaneceram até ao final do ensaio com uma densidade média de 3 artémias/ml diárias.

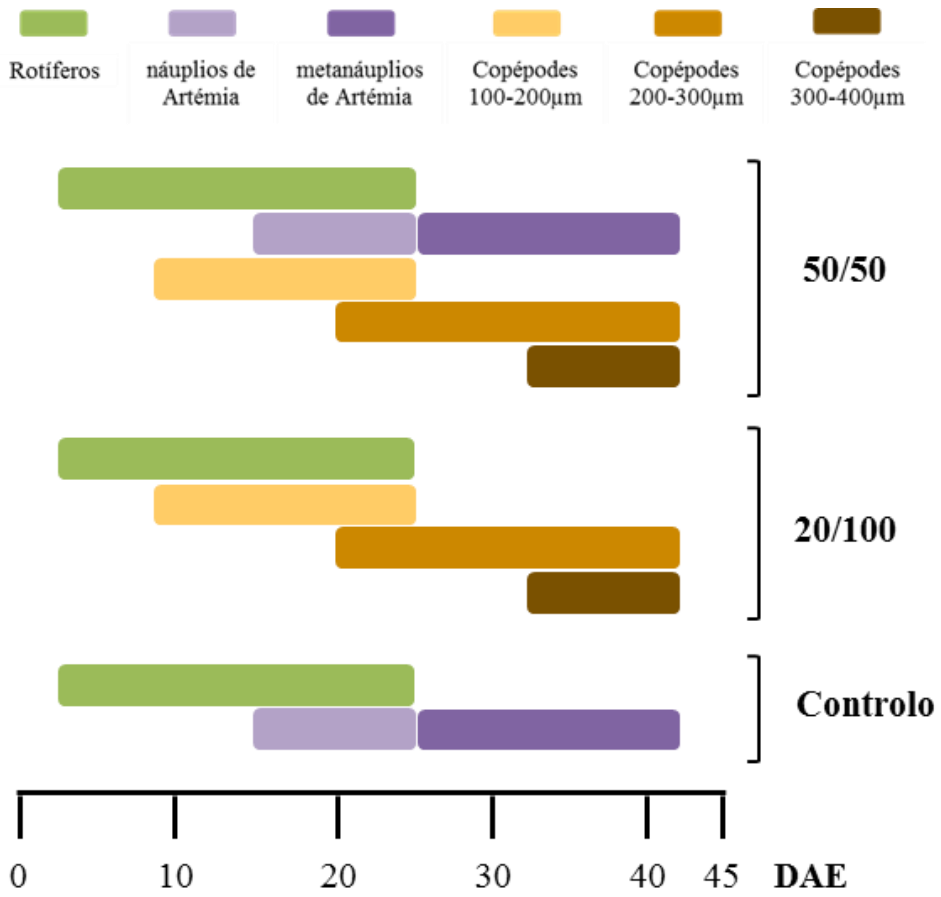

Figura 2.1. Esquema da introdução de alimento vivo e copépodes preservados das diferentes classes de tamanho utilizadas, para cada protocolo alimentar estudado, ao longo do ensaio.

Diariamente eram adicionados 2L (1L de manhã, antes da primeira refeição e 1L à tarde antes da última refeição) de uma mistura de microalgas (*Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*), a todos os tanques, na proporção 1:1.

- Preparação dos copépodes preservados

O produto preservado requeria alguma preparação previamente à administração no tanque. Os copépodes estavam empacotados e selados em embalagens opacas. Cada vez que um pacote era aberto, procedia-se à determinação da densidade desse pacote e era pesada a quantidade estipulada, por refeição para cada protocolo, em separado. O restante conteúdo da embalagem era transferido para um recipiente com tampa, de forma a facilitar o manuseamento do mesmo, guardado no frigorífico. Para aumentar o tempo de preservação e a qualidade do produto, este era guardado numa atmosfera de azoto, obrigando à introdução deste gás no recipiente sempre que era aberto.

Devido às recomendações do fabricante, a quantidade a administrar tinha de ser lavada com água salgada, do circuito de cultivo preferencialmente, durante aproximadamente 6 minutos. Para tal, eram utilizados filtros de malhagem variável adequada a cada classe de tamanho utilizada, para que não se perdessem partículas. Posteriormente, os copépodes tinham de ser agitados vigorosamente em alguma água salgada, até os aglomerados existentes se desfazerem. Por fim, os copépodes eram administrados em volumes iguais aos três tanques de cada tratamento. Este processo era repetido para todas as quatro refeições ao longo do dia e para os dois protocolos alimentares aplicados.

- Preparação do alimento vivo

As estirpes de *Brachionus* spp. são selecionadas a partir de populações naturais, cujo ciclo de vida é totalmente controlado em laboratório. Neste ensaio os *Brachionus* spp foram produzidos pela técnica de *upscalling* normalmente aplicada a este cultivo na EPPO de acordo com Pousão-Ferreira (2009).

Os cistos de *Artemia* spp. não são produzidos na EPPO e provém de fabricantes comerciais. As estirpes utilizadas neste ensaio, estirpe A.F. (480 INVE Aquaculture, Ghent, Belgium) e estirpe E.G. (*Artemia* Systems SA, Ghent, Belgium) são descapsulados segundo um protocolo conhecido e posteriormente incubados consoante as necessidades e os protocolos actualmente utilizados na EPPO segundo o descrito em Pousão-Ferreira (2009).

Ambos os alimentos vivos são enriquecidos com o auxílio de emulsões comerciais, como Red Pepper (BERNAQUA) rico em ácidos gordos e nutrientes importantes, muitas vezes em falta em dietas baseadas em levedura ou emulsões lipídicas. A sua utilização foi seguida consoante as instruções do fabricante para ambos os cultivos.

As microalgas utilizadas neste ensaio pertenciam às espécies *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*, produzidas de acordo com protocolos *standard*. Culturas de grande volume foram produzidas a partir de *stocks* puros de microalga, utilizando o método de *upscaling* e as práticas descritas por Pousão-Ferreira (2009).

2.2.1.2. *Cultivo*

O cultivo teve a duração de 42 dias, tendo início a 24 de Janeiro de 2013 e fim a 7 de Março de 2013.

O ensaio decorreu em 9 tanques cilindrocónicos de 200L de cor branca, com triplicados para cada protocolo alimentar (**Figura 2.1.**) e uma densidade inicial de cerca de 80 larvas/L. Diariamente, os parâmetros ambientais aquáticos, assim como os caudais, eram medidos em todos os tanques. Obteve-se uma temperatura média de 18,1 ± 0,60^{o}C, valores de oxigénio dissolvido de 7,55 ± 0,64 mg/L, com uma saturação de 80,72 ± 6,59%, uma salinidade de 35 ‰ e um pH médio de 8,2. O fotoperíodo manteve-se ao longo do ensaio com a proporção 14h luz: 10h escuro. O cultivo realizou-se em sistema aberto com 40% de recirculação de água salgada filtrada, inicialmente com um fluxo de, aproximadamente, 10% por hora (19,2 L/h) dos 0 aos 11 DAE, de 30% por hora (60 L/h) dos 12 aos 33 DAE e, por fim, de 36% por hora (72 L/h) dos 34 DAE até ao término do ensaio.

Figura 2.1. Sistema do cultivo larvar de dourada (*Sparus aurata*).

As larvas eram alimentadas quatro vezes ao dia, sensivelmente às 9:30h, 12:00h, 14:00h e 17:30h. Diariamente, a partir do 3º DAE, os tanques eram aspirados e purgados, uma vez, entre a 1ª e 2ª refeições, e outra entre a 3ª e 4ª refeições aquando o aumento da quantidade de copépodes administrada. Os peixes mortos eram sempre contabilizados após as aspirações e purgas. Os filtros dos tanques eram lavados com água doce duas vezes por dia. Até ao 15º DAE mantiveram-se os filtros de 80 µm durante o dia e de 150 µm durante a noite, para que houvesse uma melhor renovação e limpeza dos tanques. A partir deste dia, com a introdução de artémia, passou-se a utilizar filtros de 150 µm durante o dia e 250 µm durante a noite, devido ao maior tamanho da artémia em comparação com o dos rotíferos. Do 25º dia até ao final do ensaio, com o término da alimentação de rotíferos e artémia estirpe A.F., utilizaram-se apenas filtros de 500 µm tanto de dia como durante a noite.

Foram realizados testes de qualidade da água, especificamente para nitritos (NO_2^-) e amónia (NH_3/NH_4^+), sensivelmente 20 minutos e uma hora após a refeição, nos dias 12, 34, 35 e 39 após a eclosão, por serem considerados períodos críticos relativos ao aumento da quantidade de copépodes na alimentação e por recomendação do fabricante.

2.2.1.3. *Amostragens*

Aos 0, 3, 8, 14, 20, 32 e 42 DAE recolheram-se 20 douradas dos diferentes tanques, as quais foram usadas para determinar o comprimento total, a altura do miótomo, a presença ou ausência de bexiga gasosa e o peso seco. Adicionalmente, aos 20 dias de cultivo também foram retiradas larvas para histologia (10 por tanque) e enzimas digestivos (20 por tanque). No fim dos ensaios (42 DAE) recolheram-se ainda, por tanque (com a excepção do tanque 4, devido ao número de larvas final insuficiente), 15 larvas para malformações, 5 para histologia e 20 para enzimas digestivos. Neste dia foram também feitos testes de *stress* a 12 larvas por tanque, exceptuando o tanque 4.

2.2.2. Introdução de copépodes preservados como ingrediente na formulação de dietas inertes no cultivo juvenil de linguado

2.2.2.1. *Dietas*

Neste ensaio testou-se uma dieta formulada com 10% de copépodes (Copépodes) contra uma dieta comercial (Controlo), adequada ao linguado.

A dieta Controlo (Gemma Diamond - SKRETTING®) e a Copépodes tinham as composições observadas na **Tabela 2.1.**.

Tabela 2.1. Composição das dietas Copépodes e Controlo.

Composição	***Dieta Copépodes***	***Dieta Controlo (Gemma 0,8/1,0/1,2mm)***
Proteína bruta (%)	72,42	63,60
Gordura bruta (%)	15,31	15,64
Cinzas (%)	9,25	11,68
Energia bruta (MJ/Kg)	23,30	22,54

2.2.2.2. *Cultivo*

O ensaio teve a duração de 60 dias com início a 22 de Dezembro de 2012 e fim a 20 de Fevereiro de 2013.

Utilizaram-se 6 tanques rectangulares de cor azul claro, com triplicados para cada dieta, de 69 cm de comprimento por 45 cm de largura (**Figura 2.2.**), com uma densidade inicial, em média, de 400 peixes/tanque. Os parâmetros ambientais eram medidos diariamente em todos os tanques, assim como os caudais. Registou-se uma temperatura da água média de 18,44 ± 0,78^{o}C, uma saturação de oxigénio perto dos 83,34 ± 7,76 % e uma dissolução de 7,75 ± 0,82 mg/L, uma salinidade de 35‰ e um pH de 8,2. O fotoperíodo manteve-se na proporção 11h luz: 13h escuro. Foi utilizada uma coluna de água salgada de 10,5 cm, o que perfaz um volume total aproximado de 32L. O cultivo foi realizado em sistema aberto com um fluxo inicial de 140% por hora (45 L/h) que aumentou, ao 55º dia de ensaio, para 188% por hora (60 L/h) a fim de evitar valor de amónia tóxicos, devido ao aumento de ração administrada.

Figura 2.2. Sistema do cultivo juvenil de linguado (*Solea senegalensis*).

Os peixes eram alimentados quatro vezes ao longo do dia, aproximadamente, às 10:00h, 14:00h, 15:30h e 17:30h, respectivamente com 30%, 10%, 20% e 40% da quantidade total diária calculada para o tanque. Esta quantidade era calculada com base no número de peixes existente no tanque, o peso seco assumido por peixe, a percentagem de crescimento diário e a eficiência de conversão.

Diariamente os mortos eram contados e os tanques aspirados, inicialmente após a primeira alimentação, para que os peixes não passassem fome. Com o decorrer do ensaio constatou-se que a primeira refeição não era totalmente aproveitada aquando da limpeza, passando-se a aspirar antes da primeira refeição. Os tanques eram purgados uma vez ou mais, conforme necessário, todos os dias à tarde, entre as 3ª e 4ª refeições e os seu filtros lavados dia sim, dia não.

Devido a mortalidades iniciais elevadas, realizaram-se tratamentos desinfectantes com formol a 50 ppm de 5 em 5 dias durante 30 minutos com água parada.

2.2.2.3. *Amostragens*

Aos 0, 20 e 40 dias de ensaio experimental, foram realizadas amostragens biométricas, de peso húmido e comprimento total, a 30 peixes escolhidos aleatoriamente de cada tanque. Para além destas, nos dias 16, 30 e 50 de ensaio, foram registados os pesos húmidos, também a 30 peixes por tanque, com o objectivo de corrigir o protocolo alimentar em prol de uma correcta administração de ração. No último dia de ensaio, 60º dia, foi feita uma amostragem biométrica para toda a população existente em cada tanque. Para além desta componente foram ainda retirados, por tanque, 12 peixes para análise histológica, 8 peixes para análise dos enzimas digestivos e realizados testes de *stress* a 15 peixes por tanque.

2.3. Componente analítica

2.3.1. *Biometria*

Em cada amostragem foi medido o comprimento total e altura do miótomo das douradas recolhidas, através da ocular micrométrica da lupa Zeiss® Stemi 2000-C. Também foi observado o estado de insuflação da bexiga gasosa, com registo de fotografias representativas de cada amostra com o auxílio da Cannon PowerShot® GS 5,0 MP, incorporada na lupa já referida. As mesmas larvas eram depois lavadas rapidamente com água destilada para a remoção do sal, colocadas em microtubos de 1,5 ml e congeladas de imediato em azoto líquido, onde permaneciam armazenadas até determinação do peso seco. Após liofilização (para retirar toda a água do peixe), o peso seco das larvas foi determinado pela balança Sartorius® Pro 11 com uma precisão de 1 µg.

O comprimento total dos linguados amostrados foi medido recorrendo a uma régua graduada em cm e mm e os seus pesos húmidos através de uma balança Kern® EG – 620 – 3nm com uma precisão de 1 mg. Na amostragem final, foi adicionalmente registada a pigmentação de todos os peixes amostrados, recorrendo a fotografias representativas através da máquina Fujifilm® JZ 12 MP.

Em ambas as espécies foi determinada a taxa de crescimento relativa (TCR) através da fórmula:

$$TCR = \left(\frac{\ln(\text{Peso final}) - \ln(\text{Peso inicial})}{\text{Tempo}}\right) \text{x} 100$$

onde, na dourada foi utilizado o peso seco e no linguado o peso húmido.

Apenas para o linguado, foi ainda calculado o índice de condição (IC) de acordo com a seguinte fórmula:

$$IC = \frac{\text{Peso}}{Comprimento\ total^3}\ x\ 100$$

2.3.2. *Testes de stress*

Nas douradas foi efectuado um ponto inicial de comparação. Das 12 larvas recolhidas por tanque, 6 foram prontamente congeladas em azoto líquido, em microtubos de 1,5 ml, e armazenadas a -20^{o}C até análise. A avaliação da resistência ao *stress* consistiu em deixar as larvas restantes (6 por tanque) ao ar num filtro de 150 µm durante, em média, 1 minuto. Finalizado este tempo, procedeu-se ao registo do número de mortos e posterior recolha das 6 larvas, também para microtubos de 1,5 ml, que foram congeladas em azoto líquido e armazenadas à mesma temperatura que as amostras do ponto inicial.

No linguado não foi recolhida uma amostra do ponto inicial de *stress*. Os peixes foram sujeitos a *stress* por exposição ao ar durante 30 minutos. Após os primeiros 30 minutos, 5 peixes de cada tanque foram recolhidos, para posterior extracção de cortisol, congelados em azoto líquido e armazenados a -20^{o}C. Os restantes peixes permaneceram em copos de 2L com água salgada, sendo monitorizada a sua sobrevivência ao fim de 60, 120 e 150 minutos, regressando os sobreviventes aos respectivos tanques.

2.3.3. *Malformações*

A análise de malformações foi apenas realizada no ensaio larvar com a dourada, uma vez que é neste período que as estruturas estão em desenvolvimento e é importante avaliar o impacto de protocolos alternativos na formação do esqueleto.

Os peixes foram fixados com formol tamponado a 10% durante 24h, numa proporção de 1:10. Findo esse tempo, as larvas foram sujeitas a sucessivas lavagens com PBS e água da torneira, e mantidas em álcool a 70% até ao momento da coloração (aproximadamente uma semana)

Aquando da coloração, os primeiros passos consistiram em banhos de 20 minutos de álcool em percentagens decrescentes: 70% para 50%, 50% para 25% e posteriormente água destilada, também durante 20 minutos. Seguidamente imergiram-se as larvas durante uma hora em solução corante Alcian Blue, que depois desse tempo foi removido procedendo-se a uma lavagem das larvas com etanol a 96%. Foi adicionada uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,1% juntamente com etanol a 96% durante cerca de 1h45min, com o objectivo de neutralizar o excesso de acidez provocado pelo corante. De seguida realizaram-se novas lavagens de álcool de 20 minutos de 80%, 70%, 50%, 25% e, por fim água destilada. Posteriormente, procedeu-se à coloração com solução de Alizarin Red durante 3h na proporção de 1,5:50 ml. Finda a coloração, as larvas ficaram embebidas numa solução de KOH a 1% durante 48h, procedendo-se a substituições pontuais, sempre que necessário (geralmente, quando a solução começava a apresentar um tom amarelado). Este protocolo foi realizado segundo o descrito por Gavaia *et al*. (2000).

Durante essas 48h iniciou-se a análise fotográfica de cada indivíduo utilizando uma lupa Leica® M26 e uma máquina fotográfica Canon PowerShot® G12 com 10 MP e *zoom* óptico de 5x, fotografando, para cada peixe, o corpo inteiro e depois a zona cefálica, hemal e caudal. Para uma melhor preservação e facilidade de análise, as larvas foram depois sujeitas a banhos de glicerol a percentagens crescentes: 25% glicerol + KOH 1%, 50%, 75% e 100% glicerol, perfazendo-se com água destilada. As fotografias foram posteriormente analisadas e registadas todas as malformações encontradas para cada tratamento.

Os dados foram tratados para cada protocolo alimentar consoante a quantidade de peixes malformados em contraste com os normais, a severidade das malformações, o efeito das malformações no fenótipo das larvas, a carga de malformações e, por fim, consoante a área anatómica.

Os níveis de severidade utilizados nesta análise foram utilizados de acordo com Gavaia (Com. Pess.), que considerara 5 níveis: 0,1,2,3 e 4 (**Tabela 2.2.**).

Tabela 2.2. Níveis de severidade utilizados e respectiva descrição, segundo P. Gavaia (Com. Pess.).

Nível de severidade	***Descrição***
0	Indivíduo normal – Não apresenta malformações
1	Ligeiras malformações nas barbatanas ou arcos que não afectam o fenótipo externo
2	Fusões ou malformações que não afectam o fenótipo externo
3	Fusões ou malformações que afectam o fenótipo externo
4	Fusões ou malformações que afectam o fenótipo externo de forma severa

A carga de malformações foi determinada de acordo com Boglione *et al.* (2009) a partir da seguinte equação:

$$Carga\ de\ malformações = \frac{\text{Nº total de malformações em cada protocolo alimentar}}{\text{Nº de peixes malformados em cada protocolo alimentar}}$$

2.3.4. *Enzimas digestivos*

Para ambas as espécies estudadas o processo de recolha foi semelhante. Após recolha, os peixes foram passados por água destilada, com o propósito de remover sais, imediatamente congelados em azoto líquido e armazenados a -80^{o}C até ao momento de análise.

Todas as dissecções foram feitas em caixas de Petri mantidas em gelo. No caso dos linguados apenas os intestinos foram utilizados para a homogeneização, enquanto nas larvas de dourada, para ambas as idades, utilizou-se a porção da cavidade abdominal.

As amostras de dourada foram homogeneizadas em 15 volumes de água desionizada fria, centrifugadas a 5500xg a 4^{o}C durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos de 2ml e armazenados a -20^{o}C até análise. Para as amostras de linguado foi efectuada a purificação do prato estriado intestinal (Brush Border – BB) e, como tal, a homogeneização foi feita em 30 volumes de tampão Manitol (50 mM) – Tris (2 mM), pH 7,0, segundo o método desenvolvido por Cahu e Zambonino-Infante (1994).

Para ambas as espécies foram medidas as actividades dos enzimas tripsina, aminopeptidase, amilase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e determinada a quantidade de proteína no homogenado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Todas as leituras foram realizadas à temperatura ambiente no leitor de microplacas Thermo Scientific®.

A actividade da tripsina foi determinada utilizando o BAPNA a 0,5 mM (Nα-Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide) como substrato no tampão tris (50 mM) – $CaCl_2 2H_2O$ (20 mM), pH 8,2, conforme descrito por Holm *et al.* (1988). A actividade da aminopeptidase foi determinada usando L- leucine *p* – nitroanilide (2 mM) como substrato em tampão Tris – HCl (100 mM) com pH 8,8, segundo o protocolo de Maroux *et al.* (1973). A actividade da amilase foi determinada com base no método de Métais e Bieth (1968), em que a sua actividade foi analisada usando amido como substrato dissolvido em tampão $NaH_2PO_4.H_20$ (0,07 M) a um pH de 7,4. Segundo Terra *et al*. (1979), a actividade para a fosfatase ácida foi conhecida usando o reagente pNPP a 5,5 mM (*p*-nitrophenylphosphate), como substrato numa solução de tampão citrato a 0,1 M (ácido cítrico e citrato de sódio) com pH 4,8. Por fim, a actividade da fosfatase alcalina para as amostras estudadas foi determinada segundo Bessey *et al*. (1946), onde se utilizou novamente o reagente pNPP a 5 mM (*p*-nitrophenylphosphate) como substrato numa solução tampão carbonato (30 mM), com pH 9,8 (Guerreiro *et al*., 2010).

A actividade dos enzimas foi expressa por micromoles de substrato hidrolisadas por minuto, ou seja, U. A amilase foi expressa a partir da actividade enzimática equivalente necessária para hidrolisar 1 mg de amido em 30 minutos a, aproximadamente, 37^oC.

A actividade de cada enzima aqui estudada foi calculada por actividade específica, isto é, U/mg de proteína ou mU/mg de proteína, e por actividade total, ou seja, U x volume do homogenado/n segmentos.

2.3.1. *Histologia*

Os peixes de ambas as espécies foram anestesiados com fenoxietanol, para facilitar o manuseamento, e fixados com paraformaldeído tamponado a 10% durante 12h (durante a noite), numa proporção de 1:10, sem ser necessário lavagem com água destilada. Findo esse tempo, os indivíduos foram lavados com tampão PBS (tampão fosfato salino) a pH

7.4, 3x 15 minutos; seguindo-se uma lavagem de 15 minutos com água da torneira e armazenamento em álcool a 70% no frigorífico, até serem processadas.

As douradas e linguados foram depois colocados em cassetes que foram submetidas a um aparelho automático de processamento de tecidos Leica® Jung (TP) 1020. Posteriormente, as cassetes foram colocadas num sistema de inclusão de parafina Leica® EG1140H para a construção dos blocos de parafina que eram arrefecidos numa placa de refrigeração Leica® EG1140C.

Seguidamente, os blocos de parafina foram desbastados e cortados num micrótomo Leica® RM-2155, com uma espessura de 5 µm e posteriormente colocados em banho-maria circular, Electrothermal®, a uma temperatura próxima dos 37^{o}C, com o objectivo de esticar os cortes e melhorar a aderência à lâmina de microscopia. Estes cortes eram então recolhidos para uma ou mais lâminas consoante o necessário, que eram depois colocadas numa estufa Memmert® a uma temperatura média de 35^{o}C, a secar no mínimo durante 24h, até ao momento da coloração.

As secções dos tecidos foram coradas com Hematoxilina/Eosina.

Depois de coradas, as lâminas foram montadas com DPX (meio de montagem) e após secagem do mesmo (aproximadamente 48h) procedeu-se à análise microscópica dos tecidos, tendo também sido tiradas fotografias aos mesmos.

Nas douradas analisaram-se o fígado, pâncreas e as porções anterior e posterior do intestino. Optou-se por não analisar o estômago pois este não estava ainda diferenciado aos 20 DAE e revelou-se difícil de distinguir por ser pouco aos 42 DAE. No linguado estudaram-se o fígado, estômago e porção intermédia do intestino.

Para cada espécie de cada dieta foram escolhidas as lâminas dos 6 peixes com tamanhos e posições dos cortes mais semelhantes. De cada peixe foram observados e fotografados os 5 melhores cortes para cada órgão em estudo, através do microscópio Nikon® eclipse c*i* e da máquina Nikon® DS-Fi2, a este acoplada.

Decidiu-se avaliar a possibilidade de diferenças na quantidade de zonas de reserva existentes no fígado, consoante a alimentação. Após muita pesquisa chegou-se à conclusão que o método mais acessível era a determinação do número de hepatócitos e posterior extrapolação para as áreas de reserva. Para tal, procedeu-se à contagem dos núcleos dos hepatócitos existentes no fígado numa determinada área estabelecida. Depois assumiu-se que quanto maior o número de núcleos presentes nessa área, mais hepatócitos existiam e, consequentemente, menor era a quantidade de reservas e vice-versa. Para esta análise foram escolhidas as 4 melhores fotografias (cortes) de cada protocolo alimentar e idade na dourada e

dieta no linguado, totalizando 24 áreas para cada grupo analisado. A área definida foi de 0,0025mm^2, localizada no centro de cada fotografia.

A altura da camada epitelial do intestino também foi comparada entre alimentos. Nesta análise as 2 melhores fotografias das porções anterior e posterior no intestino de dourada, em ambas as idades, e da porção intermédia do intestino de linguado foram consideradas. Realizaram-se 10 medições por corte, perfazendo um total de 120 medidas das alturas das camadas epiteliais intestinais, para cada grupo e idades amostradas.

Toda a análise, medições e contagens nas fotografias, foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ® versão 1,48p (National Institutes of Health,USA).

2.3.2. *Cortisol*

A extracção do cortisol das pós-larvas de linguado e larvas de dourada foi realizada no laboratório de Aquacultura da Universidade do Algarve, Campus de Gambelas.

O procedimento de preparação das amostras foi distinto para as duas espécies.

Para as larvas de douradas apenas se procedeu à passagem das mesmas para microtubos de 2ml, aos quais foram adicionados 500µL de água desionizada. De seguida, realizou-se a homogeneização através da UltraTurrax IKA® T10, cujo homogenado foi depois transferido para os tubos de vidro de boca esmerilada.

No caso dos linguados, estes foram cortados em pedaços de reduzida dimensão e transferidos para um tubo Falcon de 50 ml de forma a facilitar a homogeneização dos tecidos, com o auxílio do aparelho UltraTurrax IKA® T25. A este tubo foram adicionados 5ml de água desionizada para se proceder à homogeneização. Posteriormente, retirou-se 1ml de cada Falcon para outros tubos de vidro com boca esmerilada, utilizados para a extracção do cortisol.

A partir deste passo, o procedimento foi igual para ambas as espécies.

A todos os tubos de extracção foram acrescentados 4ml de éter e agitados durante cerca de 10 minutos tapados (numa *hote*). Findo esse tempo, seguiu-se a centrifugação a 500 rpm e 4^{o}C durante 5 minutos. Os tubos foram depois mergulhados em azoto líquido, de forma a congelar a fase aquosa do extracto mas não o éter, que foi, por sua vez, despejado para outro tubo de vidro, para posterior armazenamento. Os passos acima

referidos, desde a adição do éter até à transferência do mesmo após a extracção, foram repetidos para a obtenção de um melhor extracto, utilizando a *hote* sempre que necessário.

Por fim, os tubos foram postos a evaporar, destapados, em banho-seco a 37-40^{o}C, na *hote*, durante a noite. Após a evaporação do éter adicionou-se 1ml de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, em todos os tubos que foram depois armazenados a -20^{o}C até análise.

A determinação do cortisol foi realizada através de diferentes métodos consoante a espécie. Por serem larvas e terem um volume de amostra mais pequeno, nas douradas o valor de cortisol foi obtido através de uma ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Essay) (*Kit* Cortisol ELISA - IBL International®, Hamburg), que detinha um intervalo de detecção mais adequado a estas amostras. Foi utilizado um leitor de microplacas Thermo Scientific® para a obtenção destes resultados, na EPPO. Para os linguados utilizou-se um *kit* VIDAS Cortisol S - bioMérieux® procedendo-se à sua leitura no aparelho miniVIDAS - bioMérieux®, existente na sede do IPMA em Olhão.

2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram expressos por média aritmética seguida da respectiva variação do desvio padrão, para todos os parâmetros analisados, à excepção da incidência, nível de severidade, influência no fenótipo e distribuição por área anatómica de malformações, que foram tratados através de contagens. Todas as médias e respectivos desvios padrão, assim como gráficos e tabelas foram elaborados com o auxilio do *office* Excel® para o Windows®.

Como o objectivo principal era a comparação entre dietas, para todos os testes, em ambas as espécies, foi utilizada a hipótese nula (H_0): Não existem diferenças significativas entre as dietas estudadas, contra a hipótese alternativa (H_1): Existem diferenças significativas entre as dietas estudadas. O nível de significância usado (α) foi sempre de 0,05, considerando-se existirem diferenças significativas para valores de $p < 0,05$, rejeitando-se a hipótese nula.

Todos os dados relativos a malformações foram testados através do teste de Qui-quadrado. Nos restantes conjuntos de dados foram testados os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov, Liliefors e Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Se os dados cumprissem os pressupostos, era utilizada

uma análise estatística paramétrica. Se o contrário se verificasse, mesmo após transformação dos dados pelo logaritmo de base neperiana, aplicava-se uma estatística não paramétrica.

Os resultados foram testados pela análise de variâncias (ANOVA), sempre que os pressupostos eram cumpridos, ou o equivalente não paramétrico, teste de Kruskal-Wallis, para comparação de médias, quando os pressupostos não se verificavam. Respectivamente, sempre que se verificavam diferenças entre as dietas, estas eram analisadas através do teste de Tukey – HSD, ou pela análise de múltiplas comparações dos valores de p.

Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa informático Statística® versão 8.0, para o Windows® e apenas os dados referentes às malformações foram testados pelo teste do Qui-quadrado, com o auxílio do *office* Excel® para o Windows®.

3. *Resultados*

3.1. Substituição parcial do alimento vivo por copépodes preservados no cultivo larvar de dourada

3.1.1. Crescimento

A **Figura 3.1.** mostra o comprimento total médio para as larvas de dourada em cada ponto de amostragem.

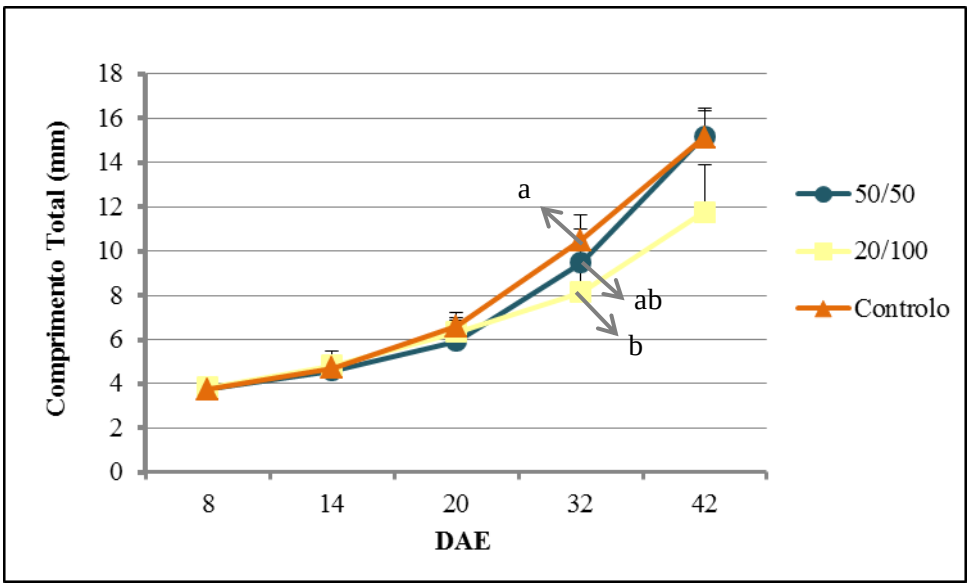

Figura 3.1. Representação das médias dos crescimentos das larvas de dourada (*Sparus aurata*) consoante o comprimento total (mm), para todos os protocolos alimentares, em cada ponto de amostragem, com os respectivos desvios padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

Observa-se, pela figura uma tendência crescente exponencial, no comprimento médio, das larvas em todos os protocolos alimentares. Inicialmente, os comprimentos totais mostram-se iguais, com 3,8 mm, em média, aos 8 DAE. Aos 14 DAE a diferença entre grupos é quase imperceptível, com os peixes do grupo 50/50 a mostrarem um comprimento total de 4,6 mm, de 4,8 mm no 20/100 e 4,7 mm no Controlo. Aos 20 DAE já se destaca um afastamento, mas reduzido, entre os protocolos, com comprimentos, em média de 5,9 mm, 6,3 mm e 6,6 mm, respectivamente para os protocolos 50/50, 20/100 e Controlo.

É depois dos 20 DAE que se começam a notar diferenças entre os protocolos alimentars, com larvas de 9,5 mm no 50/50, 8 mm no 20/100 e 10,5 no Controlo, aos 32 DAE.

No último ponto de amostragem vê-se um crescimento superior das larvas pertencentes aos protocolos 50/50 e Controlo, com 15,2 mm, face aos do protocolo 20/100 que estacionaram nos 12 mm de comprimento total.

Os desvios padrão associados são reduzidos e semelhantes, entre protocolos e pontos de amostragem, sendo maiores aos 32 e 42 DAE.

Pela análise estatística as observações anteriores são comprovadas, existindo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os protocolos alimentares, apenas aos 32 DAE.

Pela **Figura 3.2.** observam-se as diferenças entre os protocolos relativamente à média da altura do miótomo.

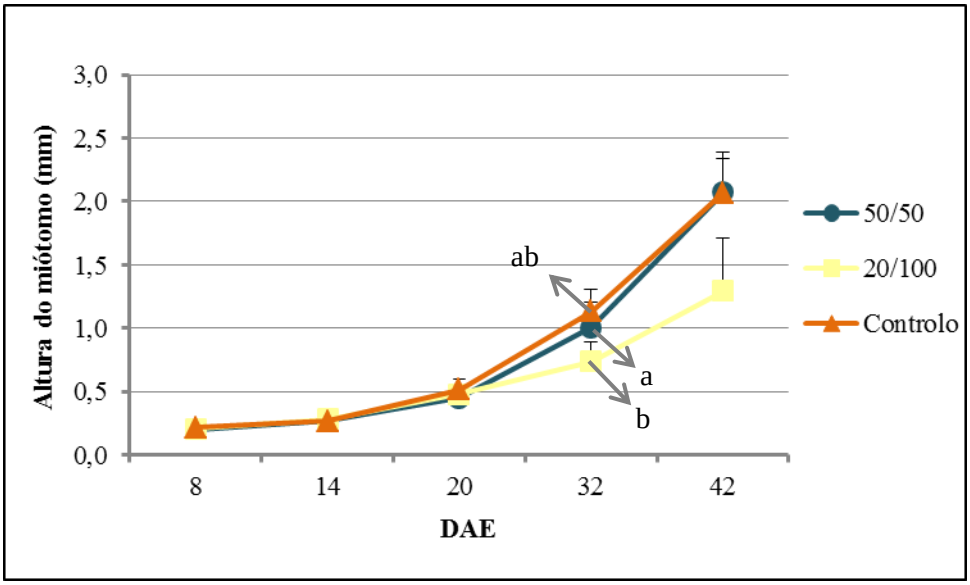

Figura 3.2. Resultados das médias das alturas dos miótomos (mm) das larvas de dourada (*Sparus aurata*) para todos os protocolos alimentares, em cada ponto de amostragem, com os respectivos desvios padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

Nota-se, pelo gráfico, que a altura do miótomo se mantém praticamente inalterada aos 8, 14 e 20 DAE, com valores médios de 0,2 mm, 0,3 mm e 0,5 mm, respectivamente, para todos os protocolos alimentares, com uma variabilidade reduzida e semelhante entre as mesmas.

Aos 32 DAE observa-se um aumento significativo entre os protocolos e ligeiras dispersões entre os mesmos. As larvas têm agora uma altura de 1 mm nos protocolos 50/50 e Controlo, respectivamente, sendo as larvas do 20/100 as que têm o menor miótomo nesta idade, com 0,7 mm.

Aos 42 DAE, esta tendência mantém-se, com as larvas a registarem um aumento da altura do seu miótomo, igual nos protocolos 50/50 e Controlo ambos com 2 mm, e mais baixa no 20/100 com apenas 1,3 mm.

É nestes dois últimos pontos de amostragem que se notam as maiores variabilidades. No entanto, estas são reduzidas e semelhantes entre protocolos. Estatisticamente só existem diferenças significativas ($p < 0,05$) aos 32 DAE, entre os protocolos 50/50 e 20/100.

Quando se relaciona a altura do miótomo com o comprimento total, em média, observa-se uma linearidade de, aproximadamente, 1 entre as duas medidas, como mostra a **Figura 3.3.**. Observa-se também que para todos os protocolos alimentares ($p > 0,05$) esta linearidade é positiva, o que suporta o facto de a altura do miótomo aumentar quando o comprimento total aumenta.

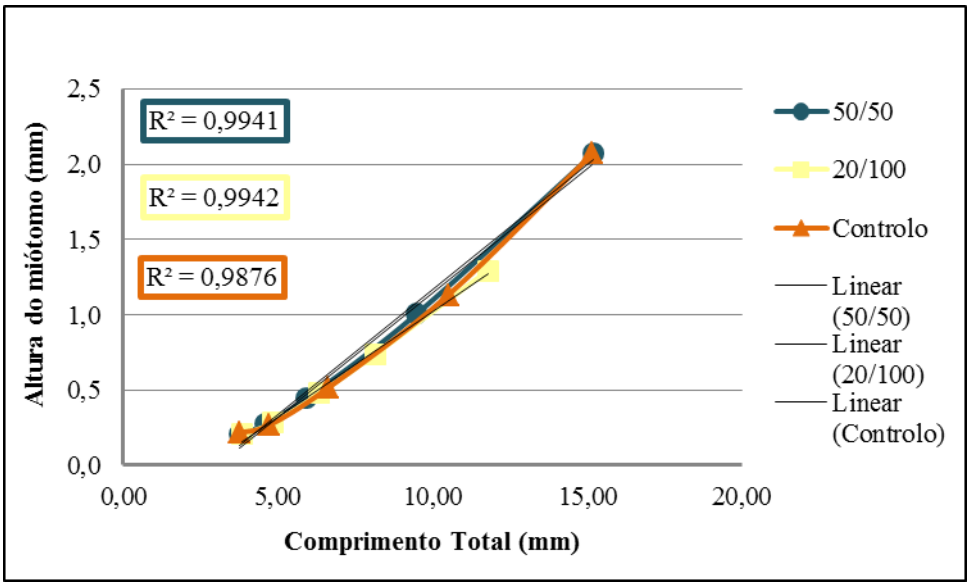

Figura 3.3. Representação da relação entre a altura do miótomo (mm) e o comprimento total (mm), para as larvas de dourada (*Sparus aurata*), em todos os protocolos alimentares, com as respectivas rectas lineares e valores de R^2.

Na **Figura 3.4.** observa-se, em média, o crescimento larvar, ao longo do ensaio, consoante o peso seco obtido em cada ponto de amostragem. Está, também, representado um resumo de cada protocolo alimentar estudado.

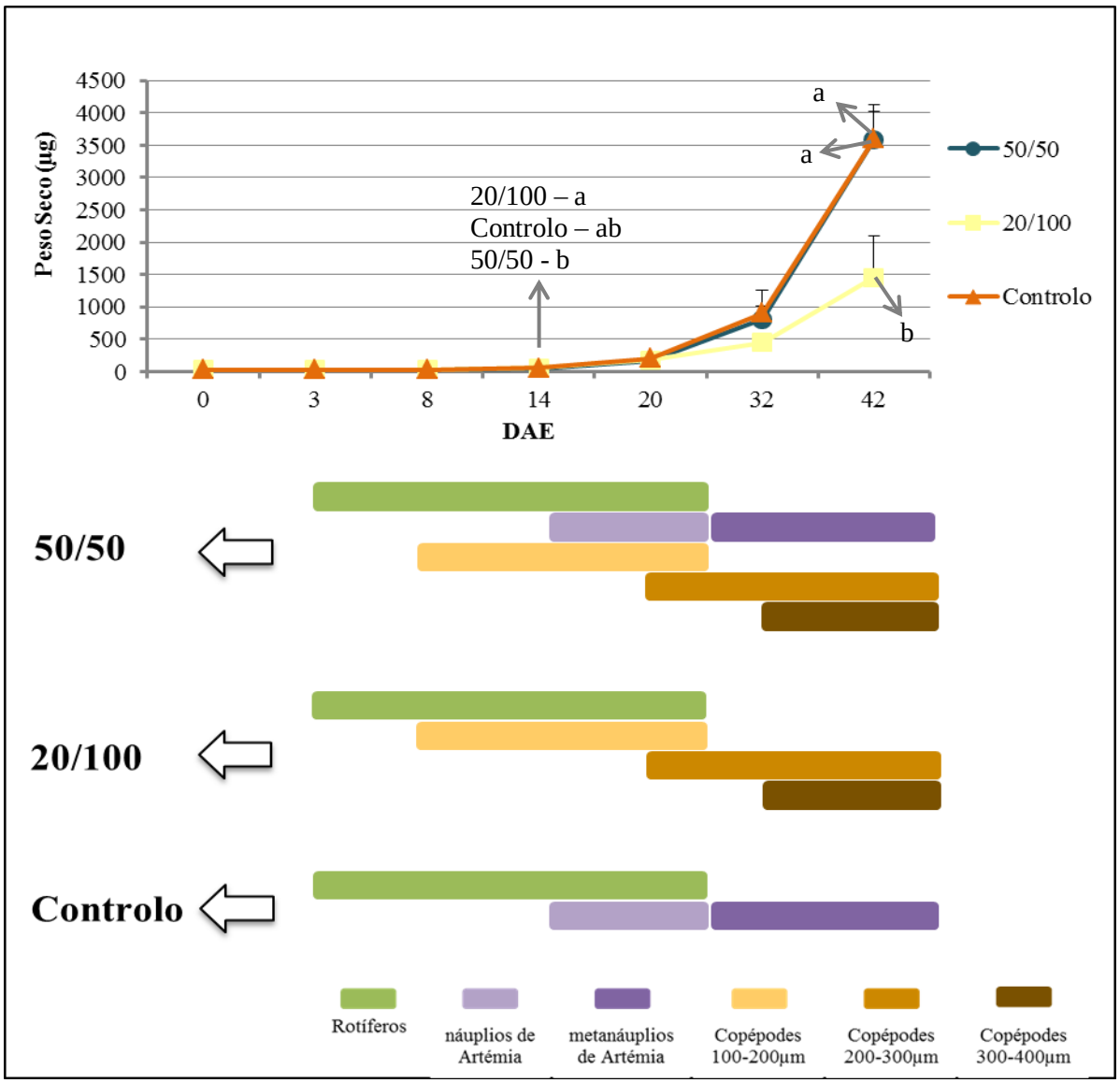

Figura 3.4. Média dos crescimentos das larvas de dourada (*Sparus aurata*), consoante o peso seco (µg) obtido em cada ponto de amostragem para todos os protocolos alimentares, com os respectivos desvios padrão. Está também ilustrado um resumo de cada protocolo alimentar, assinalando-se os momentos de introdução e duração dos respectivos alimentos. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

O peso seco das larvas manteve-se baixo e constante desde os 0 dias até aos 8 DAE com valores de 27,3 µg (0 DAE), 25,8 µg (3 DAE) e 31 µg (8 DAE) para os três protocolos.

Aos 14 DAE já se nota alguma diferença entre os protocolos, mas pouca, com as larvas do 20/100 a pesarem mais (58,2 µg) do que as dos protocolos alimentares Controlo (55 µg) e 50/50 (45 µg).

Aos 20 DAE ocorre um aumento praticamente exponencial dos pesos em todos os protocolos alimentares, com larvas a pesarem em média 165 µg, 175,1 µg e 201,7 µg, respectivamente nos protocolos 50/50, 20/100 e Controlo.

Aos 32 DAE volta a ocorrer um aumento considerável em todos os protocolos mas principalmente nos 50/50 (810,6 µg) e Controlo (903,4 µg) em relação ao 20/100 (451,7 µg). É no período entre esta idade e a última (42 DAE) que se dá o maior aumento no peso seco das larvas, novamente mais marcante nos protocolos 50/50 e Controlo, que aparentemente está relacionado com a introdução e continuação de copépodes da maior classe utilizada, 300-400µm, ou então pelas condições criadas pela presença deste alimento e os restantes, consoante o protocolo. Aquando o fim do ensaio, as larvas pesava 3,6 mg e 1,5 mg, respectivamente, nos protocolos alimentares Controlo e 50/50 e 20/100.

A variabilidade manteve-se relativamente baixa em todos os pontos de amostragem, com desvios padrão superiores a partir dos 20 DAE, exclusive.

Após análise estatística nota-se a presença de diferenças significativas ($p < 0,05$) aos 14 DAE entre os protocolos 50/50 e 20/100 e aos 42 DAE no 20/100 face aos restantes.

A **Figura 3.5.** mostra os resultados para a taxa de crescimento relativa (TCR) calculada para os três protocolos alimentares.

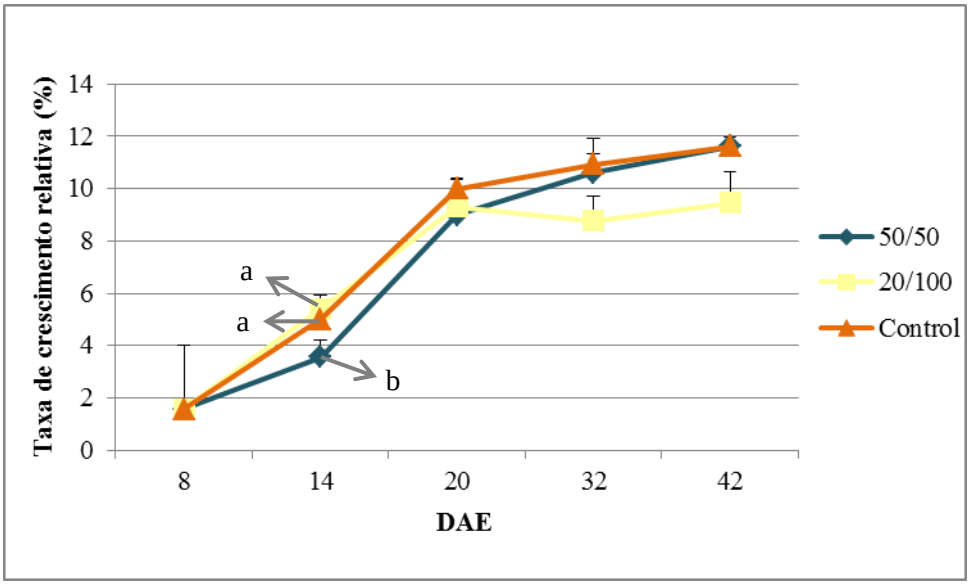

Figura 3.5. Resultados da taxa de crescimento relativa (%), em média, para as larvas de dourada (*Sparus aurata*), em todos os protocolos alimentares e todos os pontos de amostragem, com os respectivos desvios padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

Aos 8 DAE as larvas têm TCRs iguais, 1,6%, em todos os protocolos, e uma variabilidade muito elevada, com o maior desvio padrão registado face aos outros dias amostrados, que apresentam baixa variabilidade.

Destaca-se logo aos 14 DAE alguma discrepância do protocolo 50/50 (3,6%) face aos 20/100 (5,4%) e Controlo (5%), sendo, aliás, este o único ponto amostrado em que se registaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), apenas no protocolo 50/50.

Aos 20 DAE, os peixes dos três protocolos alimentares apresentam uma TCR semelhante, de 9%, 9,3% e 10%, respectivamente nos protocolos 50/50, 20/100 e Controlo.

Nos últimos dois pontos de amostragem, observa-se que o protocolo com uma TCR mais baixa é o 20/100 com 8,8% e 9,5% aos 32 e 42 DAE, respectivamente, e os restantes, 50/50 e Controlo apresentam percentagens semelhantes de 10,6% (50/50) e 10,9% (Controlo) aos 32 DAE e 11,6% aos 42 DAE para ambos os protocolos.

A **Figura 3.6.** mostra a média da percentagem de peixes com bexiga gasosa insuflada obtida nos vários pontos de amostragem.

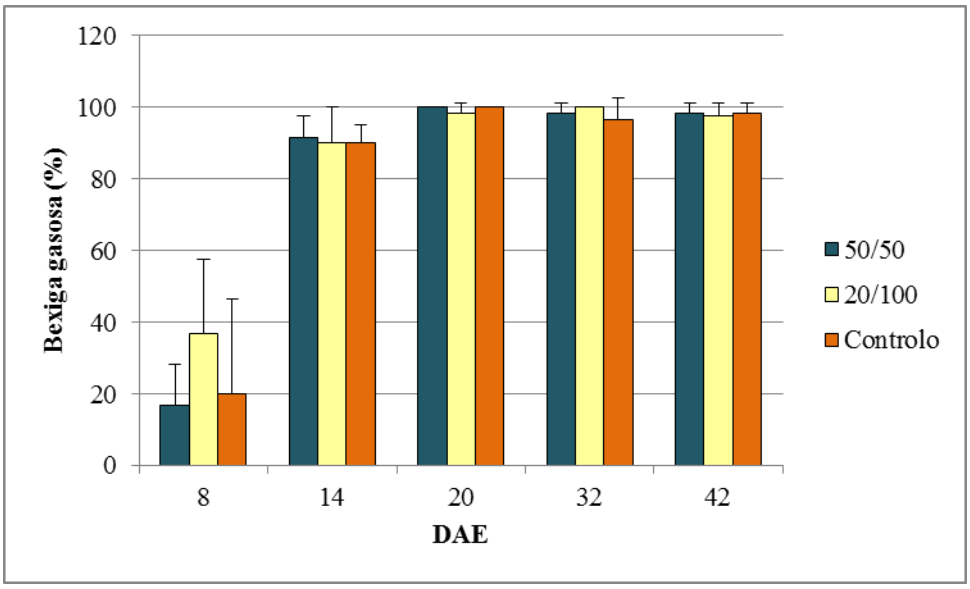

Figura 3.6. Representação da percentagem de larvas de dourada (*Sparus aurata*) com bexiga gasosa insuflada, em média, para todos os protocolos alimentares ao longo do ensaio, com os respectivos desvios padrão.

Aos 8 DAE existem algumas diferenças aparentes entre os protocolos alimentares e também uma grande variabilidade comum em todas. É o protocolo 20/100 que apresenta maior percentagem de bexigas insufladas (37%), sendo os restantes muito semelhantes com 17% e 20%, respectivamente para os peixes do 50/50 e Controlo. No

entanto, estas diferenças não são significativas ($p > 0,05$) nesta idade, nem nas restantes analisadas.

Aos 14 DAE esta percentagem aumenta substancialmente chegando aos 90% nos protocolos 20/100 e Controlo e 92% no 50/50, com uma variabilidade inferior em comparação com a anterior e semelhante entre protocolos.

Dos 20 DAE até ao término do ensaio observa-se em todos os protocolos alimentares que praticamente todos os peixes amostrados têm a bexiga gasosa insuflada, com percentagens iguais a 100 e um desvio padrão de zero aos 20 DAE – protocolos 50/50 e Controlo – e 32 DAE – protocolo 20/100. No último ponto de amostragem todos os protocolos mostraram ter 98% dos peixes amostrados com bexigas insufladas e uma variabilidade reduzida.

3.1.2. Sobrevivência

A sobrevivência das larvas de dourada apresenta uma tendência decrescente ao longo do ensaio (**Figura 3.7.**), semelhante entre os protocolos, começando por ser de 27% e 31%, respectivamente para os 50/50 e 20/100 e Controlo, aos 5 DAE. Aos 8 DAE nota-se que a descida não é muito acentuada, com valores de 21%, 26% e 24%, respectivamente para as mesmas dietas.

É no período seguinte, entre os 8 e 14 DAE, que ocorre a descida mais abrupta na sobrevivência, registando-se aos 14 DAE valores de 7% e 9%, nas dietas 50/50 e Controlo e 20/100, respectivamente. Após esta idade, a sobrevivência continuou a descer mas a um ritmo muito mais gradual entre os protocolos, destacando-se a maior diminuição no 20/100. Aos 20 DAE, obtiveram-se percentagens de 6, 4 e 3, respectivamente nos protocolos 50/50, Controlo e 20/100.

Nos últimos dois pontos de amostragem (32 e 42 DAE), nos protocolos 50/50 e Controlo, as sobrevivências das larvas mantiveram-se, em média, nos 5% e 3%, respectivamente, enquanto no 20/100 continuou a descer registando 2% aos 32 DAE e apenas 1% de sobrevivência no último dia de ensaio.

A variabilidade associada a cada ponto de amostragem é elevada durante todo o ensaio, diminuindo, contudo, à medida que se avança em idade.

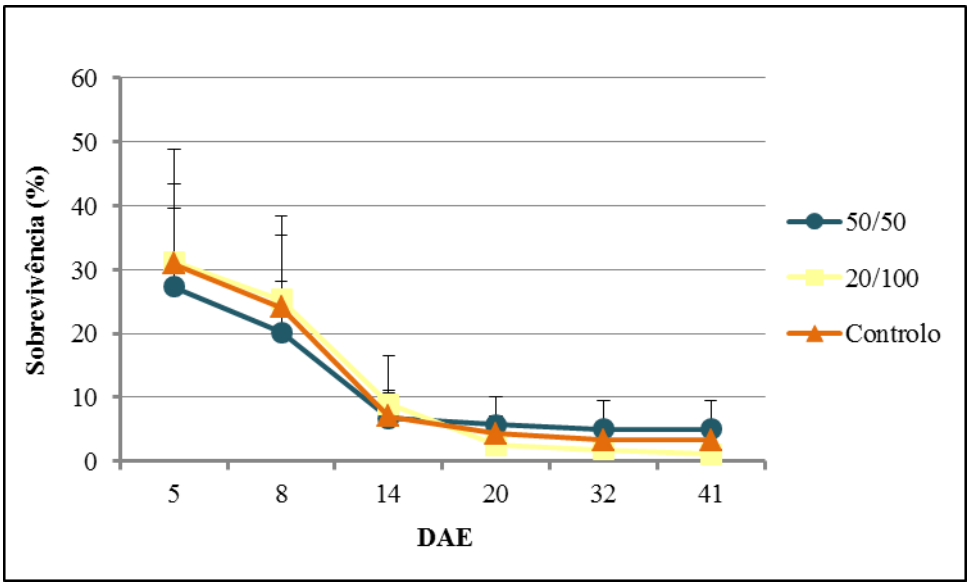

Figura 3.7. Representação da sobrevivência (%) das larvas de dourada (*Sparus aurata*), em média, para todos os protocolos alimentares ao longo do ensaio, com os respectivos desvios padrão.

Ao analisar estatisticamente a sobrevivência para ponto de amostragem, verifica-se, como era espectável, que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os protocolos ao longo do ensaio.

3.1.3. Teste de *stress*

Neste ensaio a resistência ao *stress* foi muito semelhante entre protocolos alimentares pois todas as larvas sujeitas a *stress* não sobreviveram à exposição ao ar.

3.1.4. Malformações

Os dados das malformações esqueléticas presentes nas larvas de dourada de 42 dias foram analisados por protocolo e divididos em subanálises com o objectivo de focar determinados aspectos. Os peixes provenientes do protocolo alimentar 20/100 mostraram uma estrutura óssea menos desenvolvidos (**Figura 3.8. B**) ainda com muita cartilagem, enquanto os peixes dos restantes protocolos tinham já praticamente todas as estruturas calcificadas (**Figura 3.8. A** e **B**).

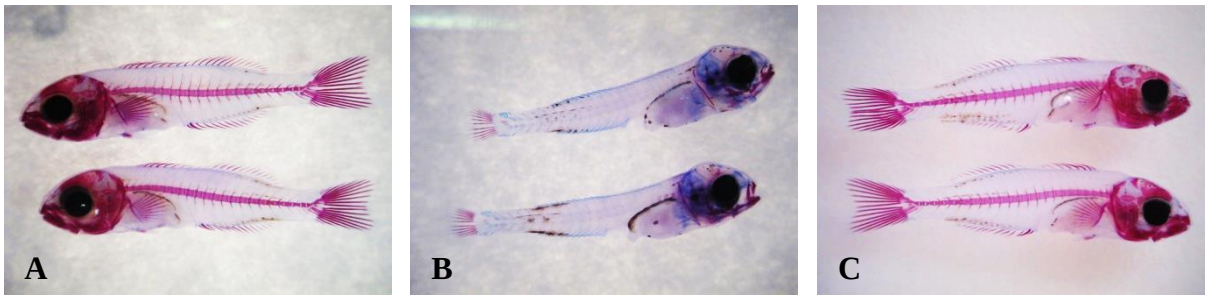

Figura 3.8. Larvas de dourada (*Sparus aurata*) dos protocolos alimentares 50/50 (A), 20/100 (B) e Controlo (C), após coloração para observação da estrutura esquelética.

3.1.4.1. *Incidência de malformações*

A **Figura 3.9.** seguinte mostra as diferenças nas percentagens de peixes normais e malformados encontradas para as amostras dos diferentes protocolos alimentares analisados.

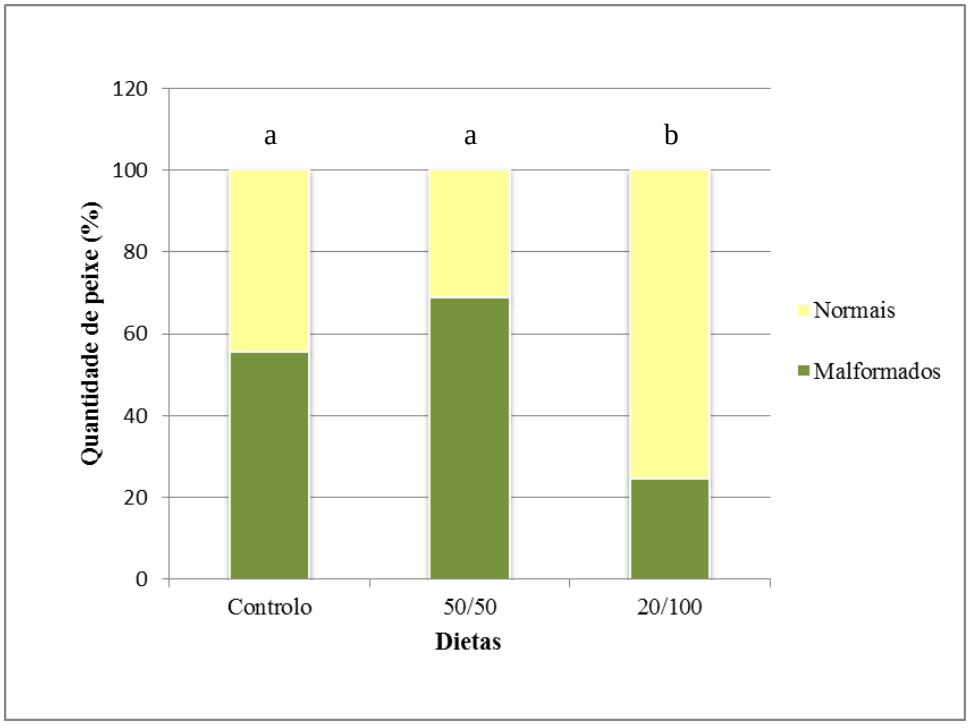

Figura 3.9. Gráfico representativo da quantidade de larvas de dourada (*Sparus aurata*), em percentagem, normal e portadora de malformações, em 45 indivíduos analisados em cada um dos protocolos alimentares. As letras indicam presença de diferenças estatísticas significativas.

Como se pode observar, existe uma clara diferença na percentagem de peixes malformados no protocolo 20/100 face aos 50/50 e Controlo, sendo nestes últimos muito maior, aproximadamente 56% para o Controlo e 69% para o 50/50, contra apenas 24% registado para o protocolo 20/100.

Esta análise foi corroborada pelos resultados estatísticos em que o protocolo 20/100 é o único e sempre significativamente diferente ($p < 0,05$), em comparação com os restantes, apesar do protocolo 50/50 estar muito próximo de ser significativamente diferente (3,782 *vs.* 3,841 – valor crítico de teste).

3.1.4.2. *Nível de severidade*

Os dados foram analisados segundo a frequência de malformações para cada nível de severidade considerada, como mostra a **Figura 3.10.**.

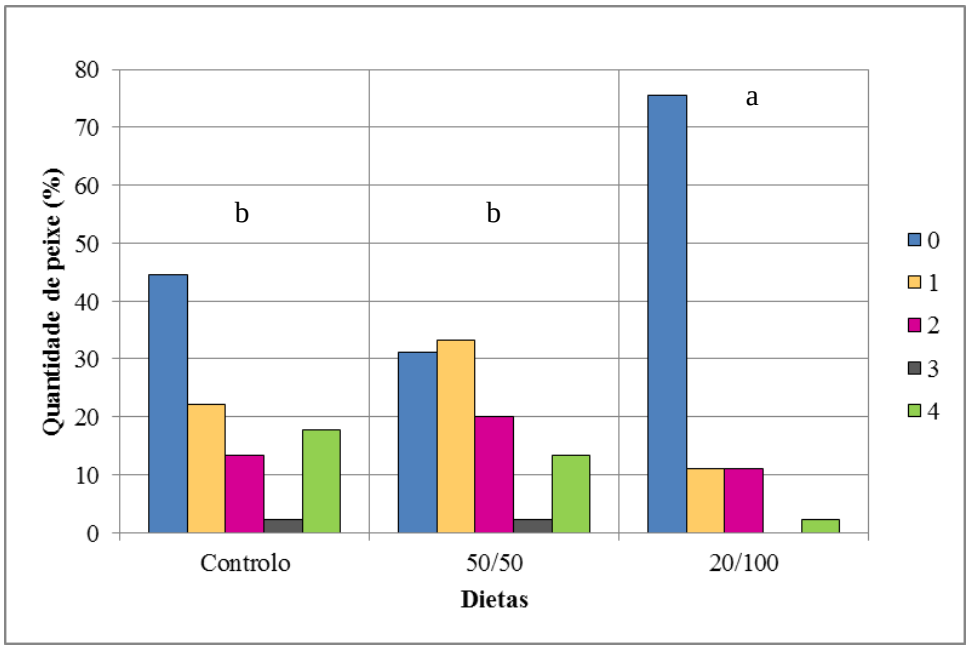

Figura 3.10. Representação da frequência (%) de malformações consoante a severidade de peixes (*Sparus aurata*) em cada protocolo alimentar aplicado, para todos os níveis de severidade (0, 1, 2, 3 e 4) considerados. As letras indicam presença de diferenças estatísticas significativas.

A análise deste gráfico revela que a percentagem de indivíduos normais (com nível de severidade 0) do protocolo 20/100 é significativamente ($p < 0,05$) maior que a

dos restantes grupos, não havendo diferenças significativas entre estes últimos ($p > 0,05$). Destaca-se também que o protocolo alimentar 50/50 é o único que não tem a maior percentagem de larvas normais, mas sim com nível 1, embora seja apenas por mais um indivíduo (14 larvas de nível 0 contra 15 larvas de nível 1).

O nível que apresenta a menor percentagem de incidência, em todos as dietas, é o nível 3 com apenas 2% para o Controlo e 50/50 e 0% para a dieta 20/100. Apesar de, em média, existirem mais indivíduos sem qualquer mal formação, ainda existe uma percentagem considerável de larvas com o nível mais elevado de severidade aqui considerado (fusões ou malformações que afectam o fenótipo externo de forma severa), com a excepção do protocolo 20/100, onde só se registaram, aproximadamente, 2% de peixes. Os outros protocolos têm, aproximadamente, 18% de ocorrências para o Controlo e 13% no 50/50.

3.1.4.3. *Fenótipo*

Considerando os níveis de severidade aplicados, apenas os níveis 3 e 4 correspondem a malformações que afectam o fenótipo dos peixes (**Figura 3.11.**)

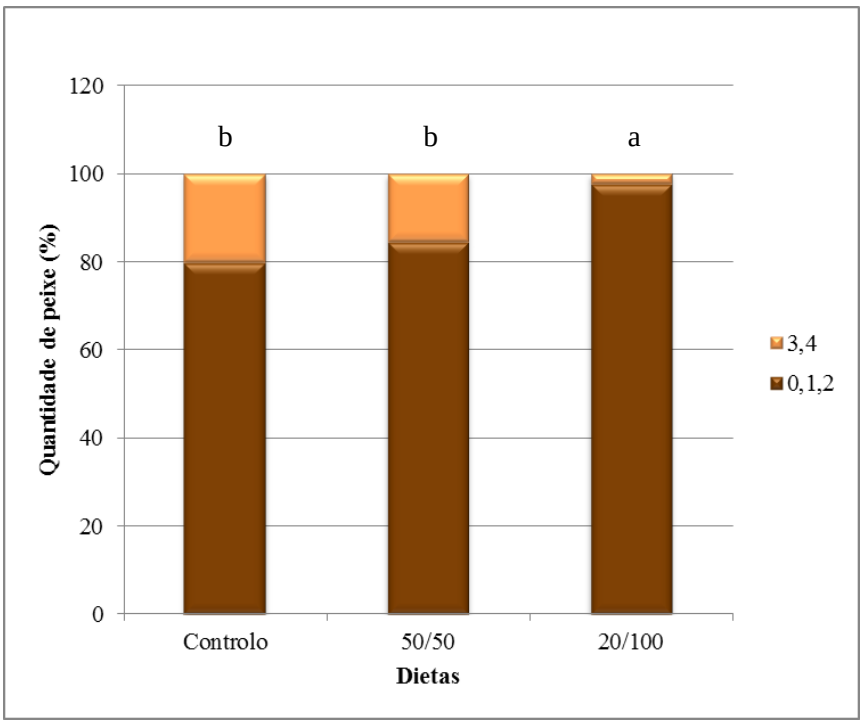

Figura 3.11. Representação das frequências das malformações (%), registadas para cada dieta consoante estas afectam (níveis 3 e 4) ou não (níveis 0, 1 e 2) o aspecto dos peixes analisados (*Sparus aurata*). As letras indicam presença de diferenças estatísticas significativas.

É claro, para todos os protocolos alimentares, uma predominância de indivíduos sem malformação ou com malformações que em pouco ou nada alteram o fenótipo, ou seja, de indivíduos normais de nível 0 ou com malformações níveis 1 e 2. Em todos os protocolos as percentagens destas malformações e de indivíduos normais é igual (Controlo) ou sempre superior a 80% (50/50 – 84% e 20/100 – 98%).

Consequentemente, a percentagem de malformações de níveis 3 e 4 é bastante reduzida em todos os protocolos. Apenas um peixe do protocolo 20/100 se insere nesta categoria, o que representa somente 2% da amostra, significativamente diferente ($p < 0,05$) dos protocolos Controlo e 50/50 que têm, repectivamente, 9 (20%) e 7 (16%) peixes ($p > 0,05$) com malformações que influenciam consideravelmente o fenótipo.

3.1.4.4. *Carga de malformações*

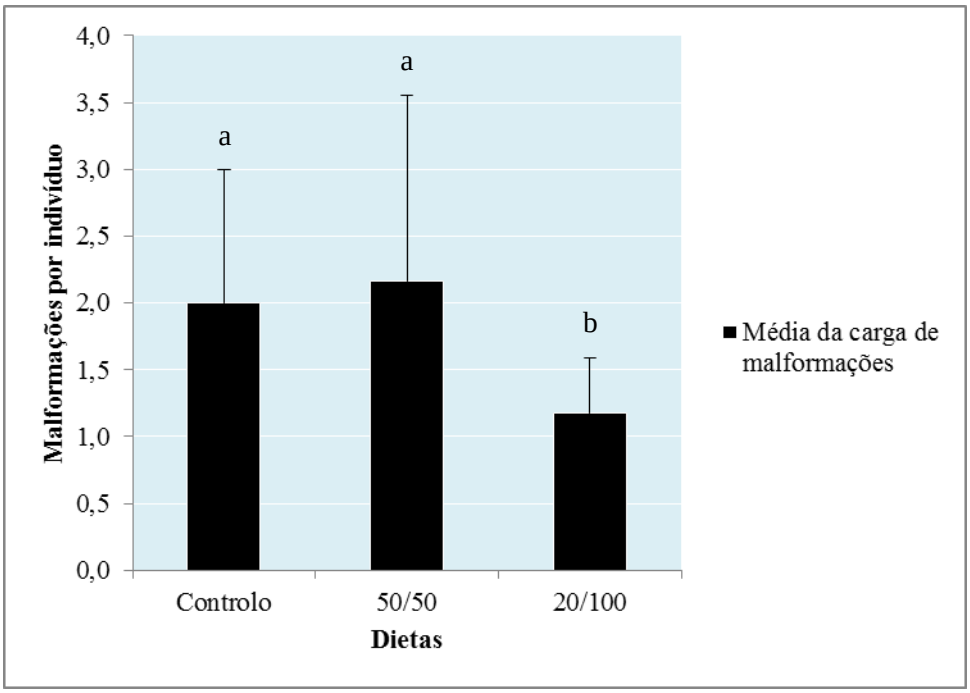

Figura 3.12. Representação da carga de malformações por indivíduo (*Sparus aurata*), em média, por cada protocolo alimentar, com os respectivos desvios padrão. As letras indicam presença de diferenças estatísticas significativas.

Observa-se, novamente, uma distinção substancial entre o protocolo 20/100 e os restantes. Enquanto o Controlo e 50/50 têm, respectivamente, em média, uma

carga de 2 e 2,2 por peixe malformado, o 20/100 apenas tem um valor de 1,2, significativamente mais baixo ($p < 0,05$) **(Figura 3.12.**).

No total, dos 45 peixes analisados para cada grupo, o Controlo revelou 50 malformações em 25 indivíduos, o 50/50, 67 em 31 peixes e, por fim, meramente 13 malformações em 11 peixes no protocolo alimentar 20/100.

O desvio padrão para cada conjunto é relativamente elevado, principalmente para o protocolo 50/50, seguindo-se o Controlo e 20/100, que tem uma variabilidade inferior a metade da do Controlo.

3.1.4.5. *Distribuição das malformações por área anatómica*

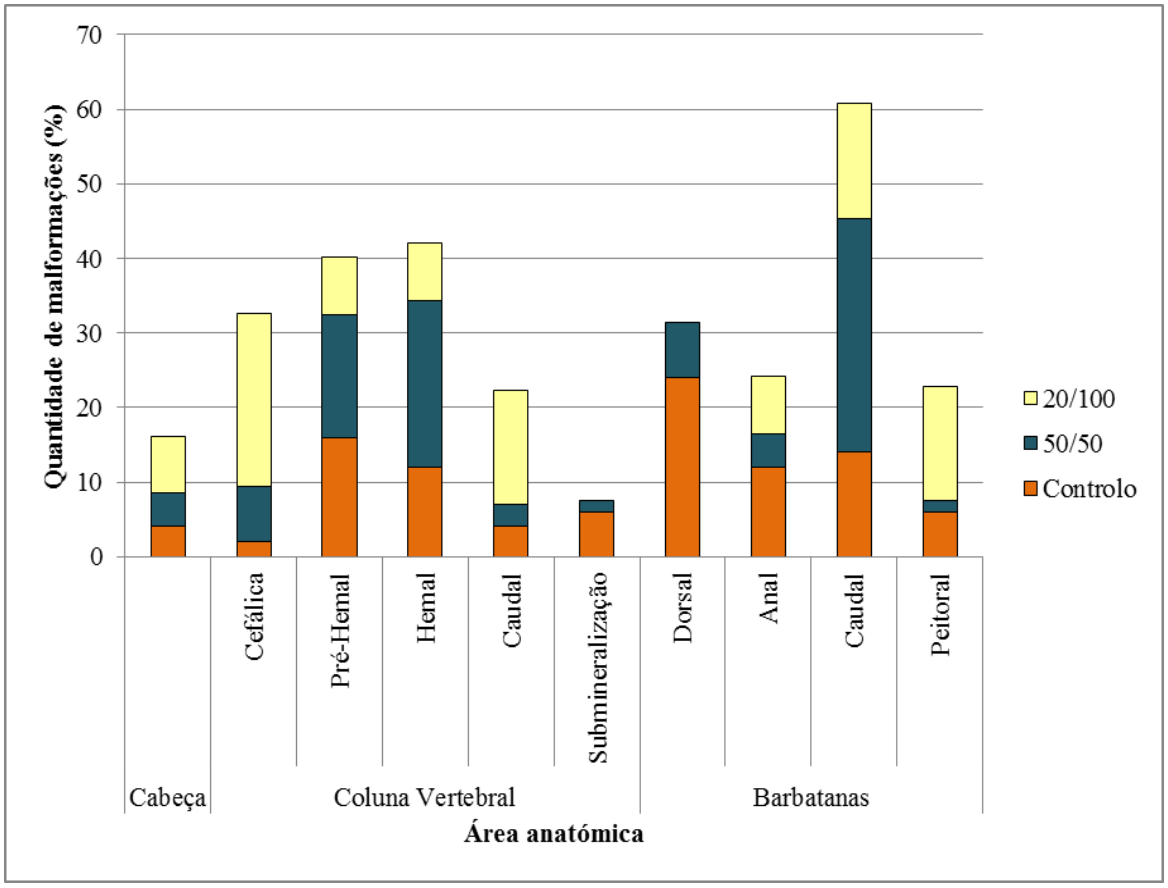

Figura 3.13. Frequência de malformações (%), em cada área anatómica analisada, para cada protocolo alimentar, de dourada (*Sparus aurata*).

Para completar esta análise das malformações, foi feita uma abordagem consoante a área anatómica, para cada protocolo alimentar estudado, com o objectivo de perceber se existe alguma secção anatómica mais afectada que as restantes, tendo em conta o número de malformações (**Figura 3.13.**).

Começando pela cabeça, nota-se que a frequência de malformações é semelhante nos três protocolos alimentares, sendo de 4% (2 em 50), 4,5% (3 em 67) e 7,7% (1 em 13), repectivamente, para a Controlo, 50/50 e 20/100.

No entanto, relativamente à distribuição das malformações pelas diferentes áreas da coluna vertebral, já se detectam algumas variações. No Controlo, a maior frequência encontra-se nas vértebras pré-hemais com 16% (8 em 50) e a menor na zona cefálica com apenas 1 malformação em 50, o que corresponde a 2% da amostra. O protocolo 50/50 apresenta a maior percentagem de malformações na zona hemal com 22,4% (15 em 67) e a mais reduzida na fracção caudal com 3% (2 em 67). Por fim, nos peixes do protocolo 20/100 registaram-se 3 em 13 malformações (23,1%) na zona cefálica e apenas 1 em 13 (7,7%) para ambas as secções pré-hemal e hemal. São os peixes deste último protocolo referido que detêm a maior percentagem de malformações nas vertebras caudais (15,4% contra 4% e 3% dos Controlo e 50/50, respectivamente), apesar do número de malformações ser o mesmo, 2, em todas os protocolos. Quanto a sub-mineralizações observadas na coluna (uma malformação grave), estas são de reduzida incidência nos protocolos 50/50 e Controlo, com apenas 1 e 3 ocorrências, respectivamente, não existindo nenhuma para o 20/100. Outras malformações graves encontradas foram a escoliose, lordose e síndrome "sela de cavalo" (*saddleback*). O protocolo com maior percentagem de escolioses foi o Controlo (10% - 5 ocorrências), seguindo-se o 20/100 (8% - 1 ocorrência) e o 50/50 (6% - 4 ocorrências). Apenas um peixe do protocolo Controlo revelou uma lordose na zona cefálica. O síndrome "sela de cavalo" não foi encontrado nos peixes analisados do grupo 20/100, enquanto os restantes apresentaram uma e 4 ocorrências, respectivamente nos grupos 50/50 e Controlo.

Por fim, nas barbatanas, notamos à partida que a estrutura mais afectada, combinando os três protocolos, foi a caudal, com 31,3% (21 em 67) - a maior frequência de malformações no total das barbatanas analisadas para o 50/50; 15,4% (2 em 13) para o 20/100 – também a maior frequência, em conjunto com o obtido para a barbatana peitoral, neste tratamento; e 14% (7 em 50) para o Controlo. Segue-se a dorsal, onde apenas os tratamentos Controlo e 50/50 registaram ocorrências, com 24% (12 em 50) – a maior percentagem para este tratamento, e 7,5% (5 em 67), respectivamente. Na barbatana anal verificou-se a menor frequência de malformações (7,7% - 1 em 13 malformações) dos peixes

do protocolo 20/100 e a segunda menor no 50/50 (4,5% - 3 em 67 malformações) e Controlo com 12% (12 em 50 malformações). É na barbatana peitoral que se registaram, no conjunto dos três protocolos, a menor frequência, e também em particular para a amostra do protocolo 50/50 com apenas 1 malformação em 13 (7,7%) e Controlo (3 malformações em 50 - 6%), sendo o 20/100 o mais afectado nesta estrutura com 15,4% (2 em 13 malformações).

Após a análise estatística às três principais áreas anatómicas aqui referidas, provou-se não existirem diferenças ($p > 0,05$) significativas entre os protocolos.

3.1.5. Enzimas Digestivos

Todos os tanques foram analisados para os 20 DAE mas aos 42 DAE não existem dados para o tanque 4 pertencente ao tratamento 20/100 devido ao número quase inexistente de larvas neste tanque no final do ensaio.

3.1.5.1. *Tripsina*

A **Figura 3.14.** mostra os resultados obtidos para a actividade da tripsina aos 20 e 42 DAE.

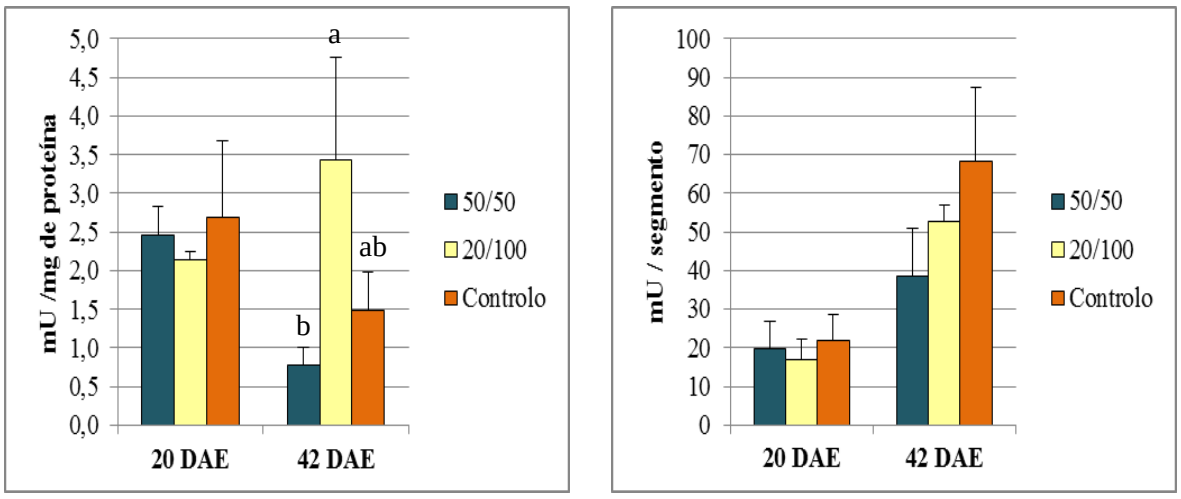

Figura 3.14. Gráficos representativos da média da actividade específica (esquerda) e actividade total (direita) da tripsina registada aos 20 e 42 DAE, para todos os protocolos alimentares, em dourada (*Sparus aurata*) com os respectivos desvios padrão. As letras indicam presença de diferenças estatísticas significativas.

Observa-se pela **Figura 3.14.** uma semelhança entre as médias das actividades específicas, aos 20 DAE, para os três protocolos estudados, sendo as larvas do dieta Controlo as que apresentam o maior valor, 2,7 mU/mg de proteína, seguindo-se as do protocolo 50/50 com 2,5 mU/mg de proteína e, por fim, as larvas do 20/100 com 2,1 mU/mg de proteína de actividade. Os desvios padrão destas actividades são mais reduzidos para os protocolos 20/100 e 50/50, do que para o Controlo, que apresenta uma variabilidade superior ao dobro dos anteriores.

Aos 42 DAE já não se vê semelhança mas sim grande dispersão entre as médias dos protocolos. Nesta idade, são as larvas do 20/100 que mostram maior actividade, 3,4 mU/mg de proteína, seguidas das do Controlo (1,5 mU/mg de proteína) e protocolo 50/50 com 0,8 mU/mg de proteína de actvidade. Contudo, o desvio associado ao 20/100 é muito superior em relação aos restantes protocolos.

As médias da actividade total, aos 20 DAE seguem a mesma tendência que as da actividade específica para esta idade. O protocolo que levou a uma maior actividade da tripsina foi o Controlo com uma actividade de 22 mU/segmento, seguindo-se o 50/50 e 20/100 com, respectivamente, 19,9 e 17 mU/segmento, com um desvio padrão associado pequeno e muito semelhante entre eles.

Aos 42 DAE nota-se, também, alguma disparidade entre os protocolos, principalmente, entre os 50/50 e Controlo com 38,5 e 68,4 mU/segmento, respectivamente. O protocolo 20/100 apresenta uma actividade intermédia de 52,5 mU/segmento. A variabilidade entre os protocolos é, também, maior para os 50/50 e Controlo do que para o 20/100, com um desvio padrão bastante reduzido.

Depois de analisadas estatisticamente, as actividades mostram não ser significativamente diferentes para as actividades totais de ambas as idades e actividade específica aos 20 DAE ($p > 0,05$). No entanto, para a actividade específica aos 42 DAE, obteve-se um resultado contrário ($p < 0,05$), entre os grupos 50/50 e 20/100.

3.1.5.2. *Aminopeptidase*

A média da actividade específica deste enzima aos 20 DAE é semelhante (comprovado estatisticamente, $p > 0,05$) mais evidente entre os protocolos 20/100 e Controlo, ambos com 1,5 mU/mg de proteína, sendo um pouco mais elevada do que a

actividade obtida no protocolo 50/50 (1,2 mU/mg de proteína). O desvio padrão é semelhante para todos os protocolos, sendo maior para o Controlo e 50/50 face ao 20/100.

Aos 42 DAE, esta actividade é muito reduzida com valores médios de 0,07, 0,04 e 0,02 mU/mg de proteína, para os protocolos 20/100, Controlo e 50/50, respectivamente, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre estes. A variabilidade também é reduzida, com o 20/100 a registar o maior desvio padrão (**Figura 3.15.**).

A actividade total registada nas larvas de dourada aos 20 DAE é praticamente igual para todos os protocolos, como se confirmou pela análise estatística ($p > 0,05$), mostrando uma actividade de 0,02 mU/segmento, com uma variabilidade muito baixa, principalmente para os protocolos 50/50 e 20/100, sendo um pouco maior para o Controlo.

Esta actividade é ainda mais baixa aos 42 DAE, sendo a maior de 0,01 mU/segmento para as larvas alimentadas com o protocolo Controlo. Os restantes mostram apenas 0,007 (50/50) e 0,004 (20/100) mU/segmento de actividade média, contudo não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Os desvios padrão são praticamente iguais e reduzidos em todos os protocolos, com valores ligeiramente superiores nos 20/100 e Controlo (**Figura 3.15.**).

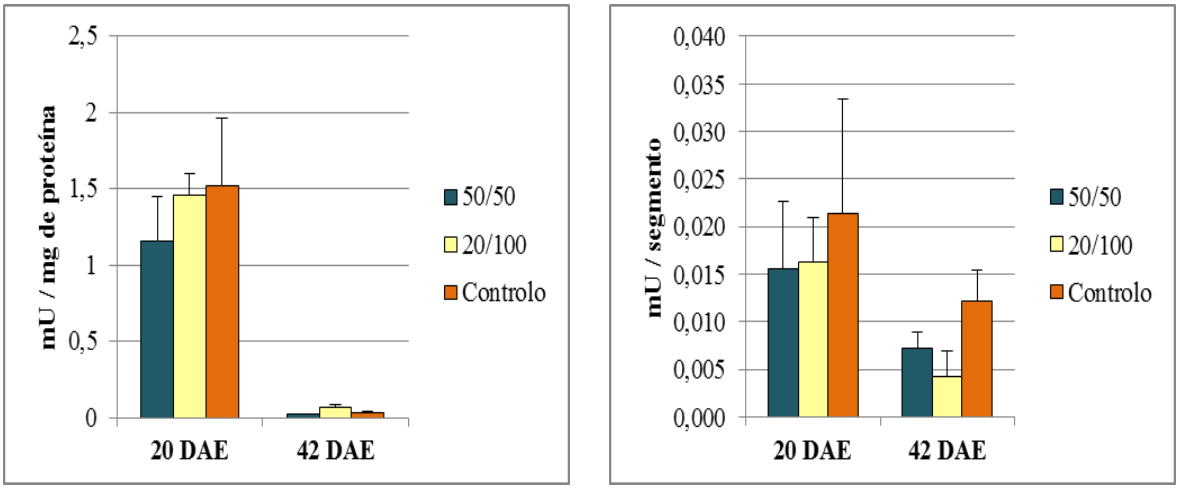

Figura 3.15. Gráficos representativos da média actividade específica (esquerda) e da actividade total (direita) da aminopeptidase registada aos 20 e 42 DAE para todos os protocolos alimentares, em dourada (*Sparus aurata*) com os respectivos desvios padrão.

3.1.5.3. *Amilase*

A actividade da amilase não se revelou estatisticamente diferente ($p > 0,05$) entre os protocolos estudadas, tanto para os 20 como para os 42 DAE. (**Figura 3.16.**).

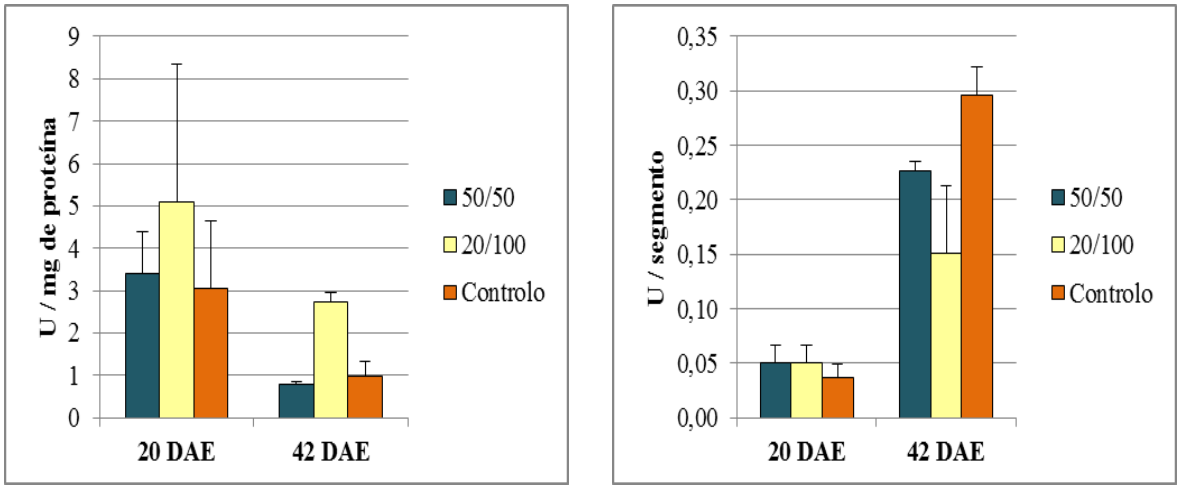

Figura 3.16. Gráficos dos resultados para as médias da actividade específica (esquerda) e actividade total (direita) da amilase aos 20 e 42 DAE para todos os protocolos alimentares, em dourada (*Sparus aurata*) com os respectivos desvios padrão.

Aos 20 DAE, as larvas alimentadas pelos protocolos 50/50 e Controlo apresentam uma actividade específica média inferior (3,4 e 3 U/mg de proteína, respectivamente) à apresentada pelas larvas do 20/100 (5,1 U/mg de proteína), constatando-se o mesmo para o desvio padrão.

À semelhança da idade anterior, aos 42 DAE, as larvas exibem, em média, actividades específicas mais baixas, não tanto quando sujeitas ao protocolo 20/100 (2,7 U/mg de proteína), mas sim quando alimentadas com o protocolo 50/50 (0,8 U/mg de proteína) ou Controlo (1 U/mg de proteína). Aqui a variabilidade também é inferior para o 50/50 em comparação com o 20/100 e a Controlo que mostraram desvios padrão superiores ao dobro do desvio registado no protocolo 50/50.

Para a actividade total média, aos 20 DAE, observam-se semelhanças entre todos os protocolos, com 0,05 U/segmento para os 50/50 e 20/100 e 0,04 U/segmento nas larvas do Controlo. As variabilidades são baixas, embora superiores para os protocolos 50/50 e 20/100, face ao Controlo com metade do desvio padrão.

Aos 42 DAE, são as larvas alimentadas com o protocolo Controlo que revelam maior actividade total média, 0,3 U/segmento, embora para os restantes os valores sejam bastante semelhantes, de 0,2 U/segmento de actividade. Os desvios padrão associados

são reduzidos sendo o protocolo 20/100 o que apresenta maior variabilidade, seguindo-se o Controlo (metade da anterior) e 50/50 (sensivelmente, 1/3 da 20/100).

3.1.5.4. *Fosfatase Ácida*

A **Figura 3.17.** contém os gráficos com resultados obtidos para as actividades da fosfatase ácida.

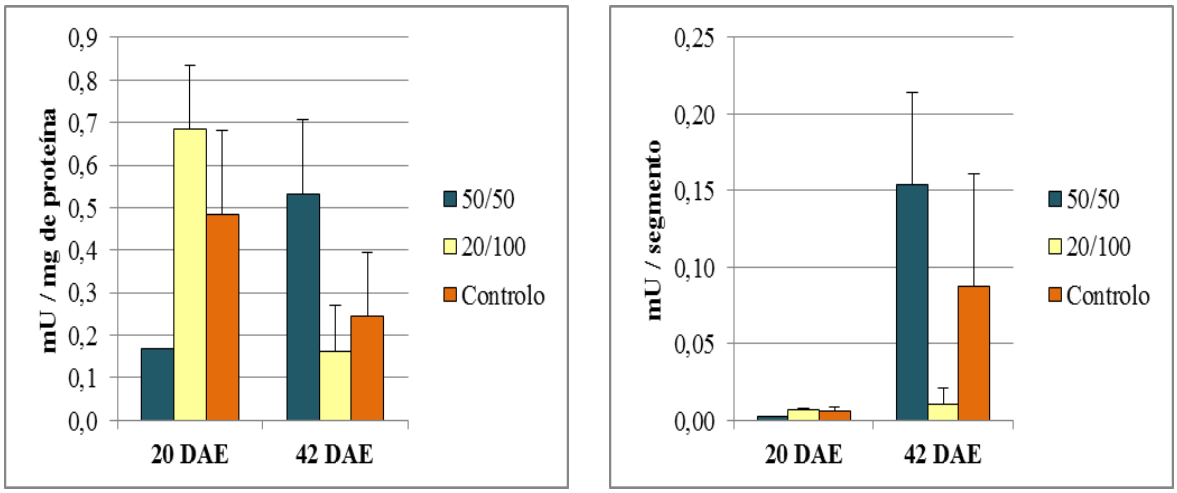

Figura 3.17. Gráficos representativos das médias das actividades específica (esquerda) e total (direita) da fosfatase ácida aos 20 e 42 DAE para todos os protocolos alimentares, em dourada (*Sparus aurata*) com os respectivos desvios padrão.

Observam-se variações aparentes na média da actividade específica das larvas, aos 20 DAE, entre os protocolos mas não significativas ($p > 0,05$). São aquelas alimentadas pelo protocolo 20/100 que apresentam maior valor, 0,7 mU/mg de proteína, depois as do protocolo Controlo, 0,5 mU/mg de proteína e, por fim, as pertencentes ao 50/50. Contudo, para o último protocolo apenas temos um valor de um tanque (a escassez de larvas nos restantes tanques deste protocolo impossibilitou a análise dos enzimas), pelo que o resultado não é tão fidedigno. Os valores de desvio padrão dos protocolos 20/100 e Controlo são praticamente iguais e reduzidos.

Aos 42 DAE voltamos a observar uma irregularidade dos resultados entre protocolos. A maior actividade, em média, foi registada para as larvas do 50/50 (em triplicado neste idade) com 0,5 mU/segmento, seguindo-se, com valores semelhantes, os

protocolos 20/100 e Controlo com 0,2 mU/segmento de actividade média. Estes protocolos têm variabilidades associadas também díspares, sendo os 50/50 e Controlo os que têm os maiores valores.

A actividade total, em média aos 20 DAE, apresenta-se bastante baixa com valores de 0,007 no protocolo 20/100, 0,006 para o Controlo e, a mais baixa, no 50/50 com 0,002 mU/segmento, embora, o último protocolo possa estar subestimado devido à falta de triplicados que o suportem. Os desvios padrão dos protocolos 20/100 e Controlo são, também, muito baixos, especialmente para o 20/100.

Aos 42 DAE, esta actividade foi, em média, desigual para os diferentes protocolos. Vemos pela análise gráfica que são as larvas do protocolo 50/50, com 0,2 mU/segmento, que mostram a maior actividade, seguindo-se as larvas do Controlo e 20/100 que revelam uma actividade inferior, de 0,09 mU/segmento, e muito inferior, de 0,01 mU/segmento, respectivamente. Os desvios padrão são maiores nos protocolos 50/50 e Controlo, do que no 20/100 que tem uma variabilidade de 1/6 e 1/7 da dos protocolos 50/50 e Controlo, respectivamente.

Apesar de todas as diferenças aparentes, os resultados estatísticos mostram não existirem diferenças significativas entre os protocolos para ambas as idades e actividades ($p > 0,05$).

3.1.5.5. *Fosfatase Alcalina*

A actividade específica média aos 20 DAE apresentada pelas larvas de dourada é quase igual para os protocolos 20/100 e Controlo com 39 e 38 mU/mg de proteína, e superior, com 45,9 mU/mg de proteína para as larvas do protocolo 50/50. Este padrão reflecte-se na variabilidade, pois é o último protocolo referido que tem o maior desvio, enquanto os 20/100 e Controlo têm valores bastante inferiores (**Figura 3.18.**).

Aos 42 DAE já se observa uma maior dissemelhança entre as médias dos protocolos. Agora são as larvas sujeitas ao 20/100 que apresentam maior actividade (96,6 mU/mg de proteína), seguindo-se as do Controlo e 50/50 que têm uma actividade mais reduzida de 55,2 e 39,5 mU/mg de proteína, respectivamente. Existe maior variabilidade para os protocolos 50/50 e Controlo, enquanto o 20/100 tem um desvio padrão de, sensivelmente, 1/3 do dos anteriores.

Analisando o gráfico para a actividade total, na **Figura 3.18.**, destaca-se a grande diferença nos níveis de actividade média entre as duas idades, sendo aquelas apresentadas pelas larvas aos 20 DAE muito inferior à obtida aos 42 DAE. Na primeira idade, as actividades das larvas não variam muito entre os protocolos, apresentando valores de 0,5 mU/segmento nos 50/50 e Controlo, e 0,4 mU/segmento no protocolo 20/100. Os desvios padrão associados são baixos e semelhantes para os protocolos 50/50 e 20/100, com o Controlo a revelar um valor três vezes superior.

Aos 42 DAE já houve alguma variação entre os protocolos, sendo o Controlo o que revelou maior actividade (17,6 mU/segmento) por parte das larvas sujeitas a este protocolo. Aparentemente, os protocolos 50/50 e 20/100 reduzem a actividade da fosfatase alcalina das larvas, respectivamente, com níveis de 9,4 e 5,4 mU/segmento de actividade média. Nesta idade existe maior variabilidade e, à semelhança da idade anterior, o desvio padrão é superior para os protocolos 50/50 e Controlo, quando comprado com o obtido no 20/100.

Após análise estatística, apenas na actividade específica aos 42 DAE foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os protocolos que, depois de comparados dois a dois, se detectam ser entre todos os protocolos.

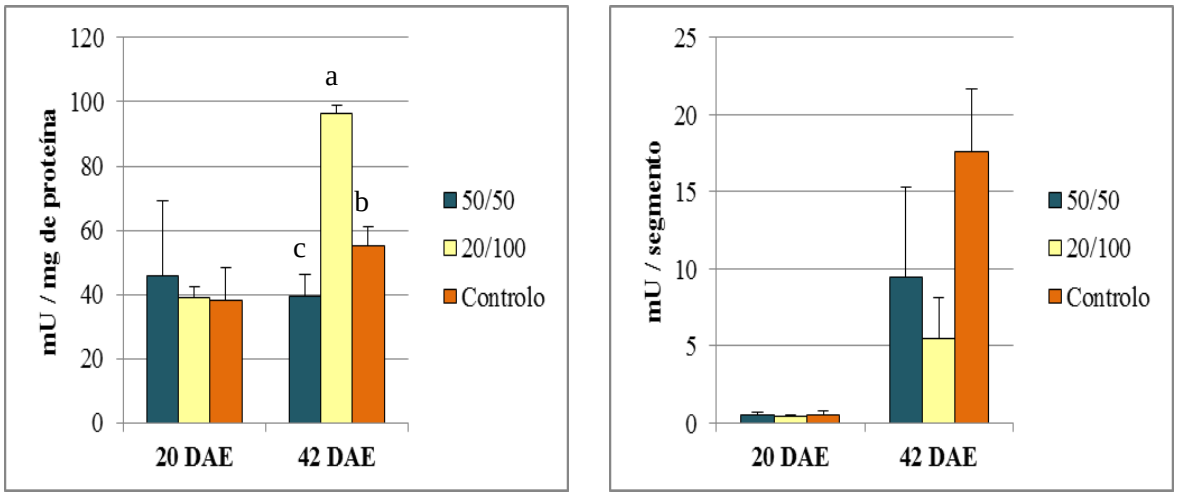

Figura 3.18. Representação gráfica dos resultados para as médias das actividades específica (esquerda) e total (direita) da fosfatase alcalina aos 20 e 42 DAE para todos os protocolos alimentares, em dourada (*Sparus aurata*) com os respectivos desvios padrão. As letras indicam presença de diferenças estatísticas significativas.

3.1.6. Histologia

Pela **Figura 3.19.**, observa-se que não existem diferenças aparentes tanto na organogénese como na estrutura celular do fígado e pâncreas das larvas de dourada, independentemente do prtocolo a que estão sujeitos.

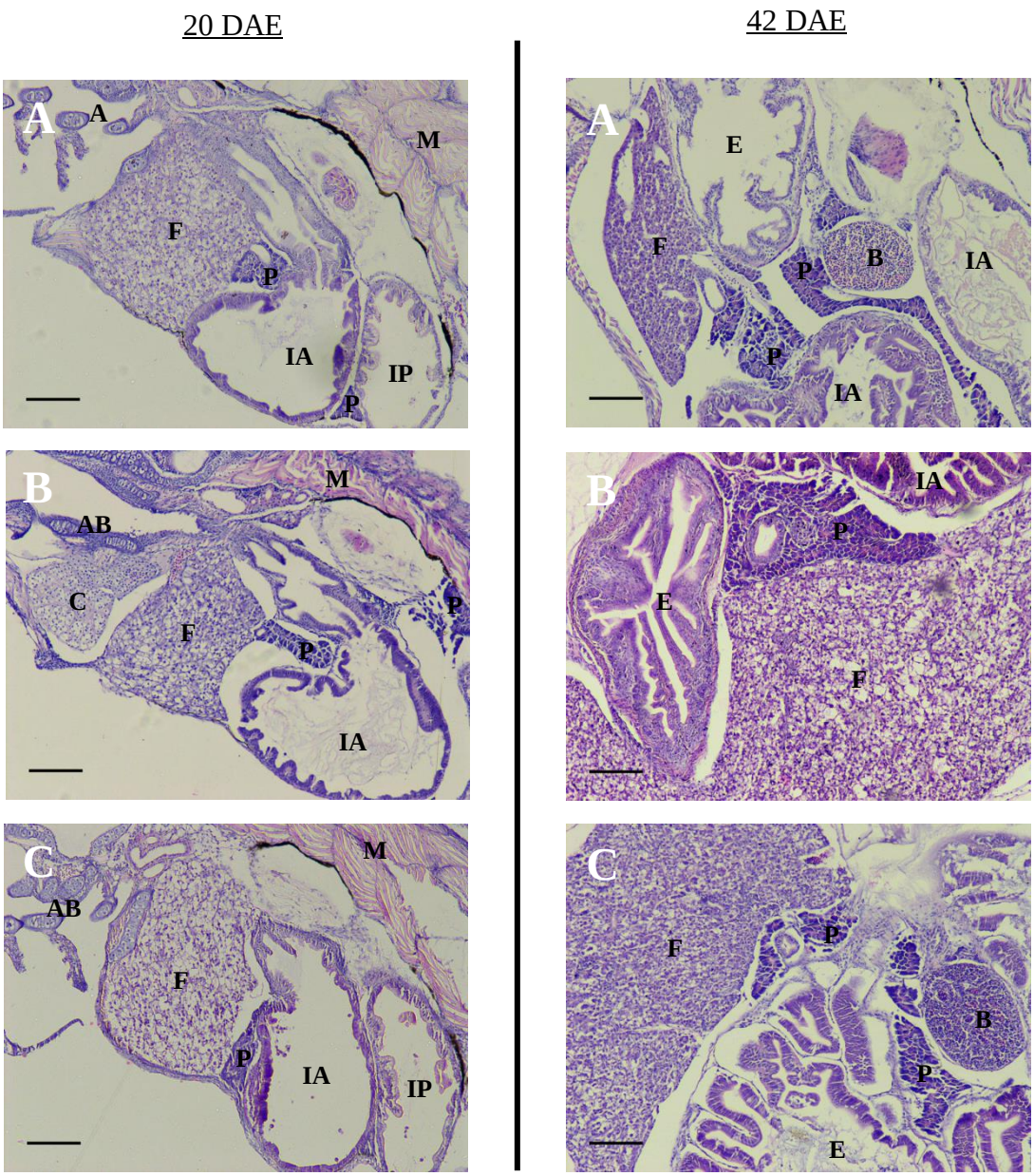

Figura 3.19. Cortes histológicos de dourada (*Sparus aurata*) referentes ao fígado e pâncreas, aos 20 e 42 DAE, para os três protocolos alimentares analisados: 20/100 (A), 50/50 (B) e Controlo (C). AB – arcos branqueais; B – baço; C – coração; E – estômago; F – fígado; IA – intestino anterior; IP – intestino posterior; M – músculo; P – pâncreas. A barra de escala corresponde a 100 µm.

Pelas fotografias **A**, **B** e **C** em ambas as idades, observa-se um fígado com tecido basofílico compacto, com células irregulares com forma poligonal ou poliédrica, deposição irregular e com núcleos concêntricos evidentes,características comuns em todos os protocolos. O pâncreas apresenta-se extra-hepático dividido em duas partes: uma anexada ao fígado e a outra entre as porções anterior e média do tracto digestivo. Está organizado em estruturas acinares, compostas por células alongadas com um citoplasma basofílico e um núcleo evidente.

Comparando as duas idades, parece existir um aumento do número de células, mais visível no fígado, e uma redução do tamanho e quantidade de zonas brancas (de reserva). Contudo, esta observação é semelhante para todos os protocolos.

Parece haver uma homogeneidade entre a organogénese e estrutura celular do intestino nas douradas de todos os protocolos, aos 20 DAE (**Figura 3.20**). Aos 42 DAE, esta semelhança entre as estruturas mantém-se entre os protocolos, possivelmente existindo um menor número de vilosidades no intestino das larvas sujeitas ao protocolo 20/100 (**Figura 3.20**).

No intestino anterior, o epitélio era formado por uma camada de células colunares (enterócitos), com um núcleo evidente concêntrico. As células epiteliais do intestino posterior eram semelhantes às do intestino anterior. Com o decorrer do desenvolvimento, verificou-se uma diminuição dos vacúolos (**Figura 3.20.**) e um aumento do número de substâncias de reserva. Neste processo, surgem as vilosidades longitudinais que também aumentam em número com o desenvolvimento larvar, com a excepção, novamente, do protocolo 20/100, que aparenta ter um desenvolvimento inferior.

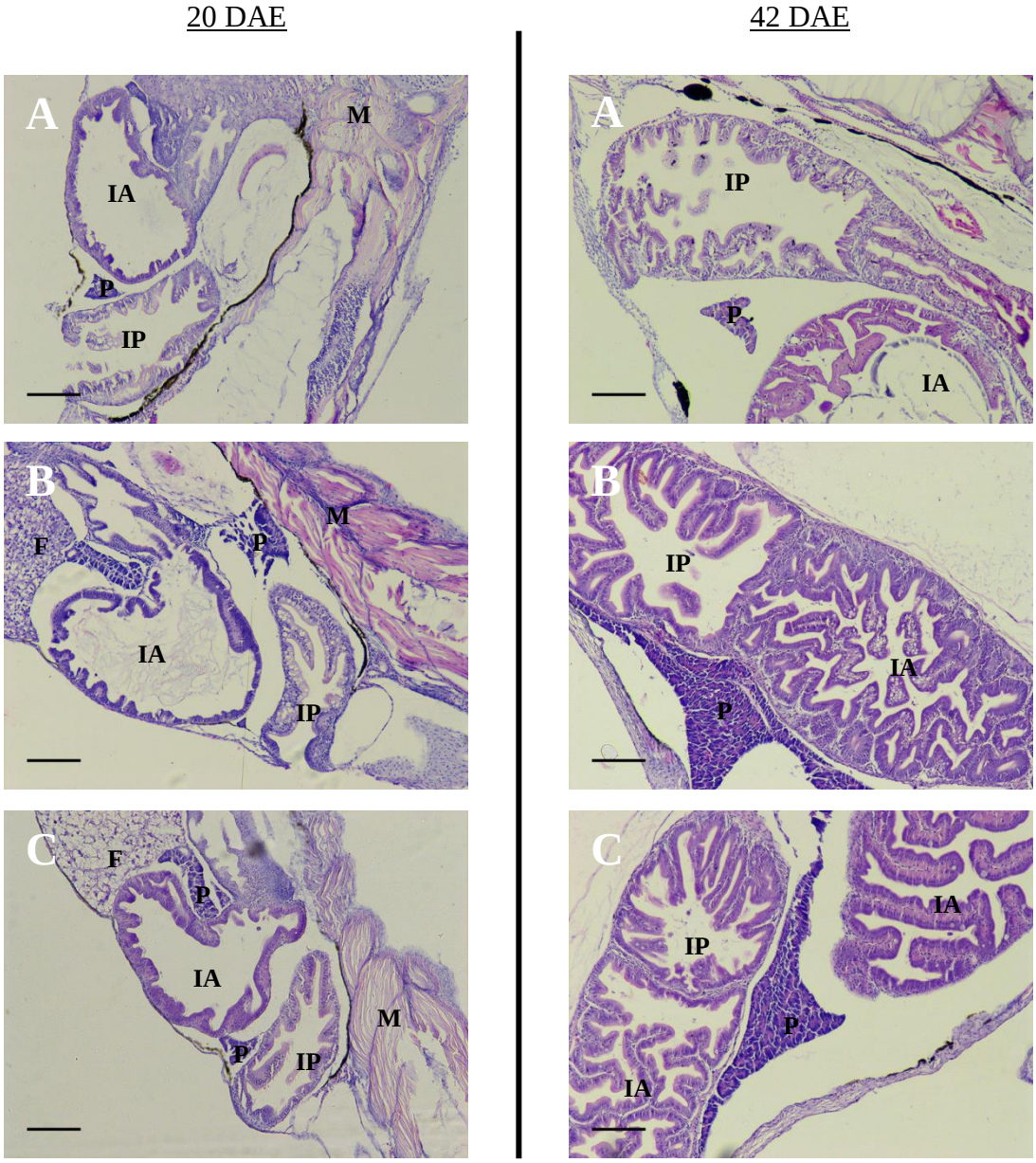

Figura 3.20. Cortes histológicos de intestino de dourada (*Sparus aurata*), aos 20 e 42 DAE, para os três protocolos alimentares analisados: 20/100 (A), 50/50 (B) e Controlo (C). F – fígado; IA – intestino anterior; IP – intestino posterior; M – músculo; P – pâncreas. A barra de escala corresponde a 100 µm.

Após medição do epitélio intestinal anterior e posterior (**Figura 3.21.**), observa-se aos 20 DAE, em todos os protocolos, que a camada epitelial é maior no intestino posterior do que no anterior. Isto já não se verifica mais tarde no desenvolvimento pois aos 42 DAE o comprimento do epitélio posterior é igual

No intestino anterior, o comprimento do epitélio é semelhante entre protocolos nas duas idades estudadas ($p > 0,05$). O protocolo com maior comprimento, em média, é o

Controlo com 5,6 µm, aos 20 DAE, e 9,9 µm, aos 42 DAE. Aos 20 DAE os protocolos 50/50 e 20/100 têm a mesma dimensão epitelial média, 4,6 µm, mas aos 42 DAE o 20/100 assemelha-se mais ao Controlo com 9,8 µm de comprimento, enquanto o 50/50 apresenta o menor comprimento médio do epitélio com 8,4 µm.

No intestino posterior, os protocolos Controlo e 20/100 registam um padrão semelhante à porção anterior do intestino, em média com 6,8 µm e 10,1 µm aos 20 e 42 DAE, respectivamente, para o Controlo, e 6 µm e 8,2 µm para o 20/100, respectivamente aos 20 e 42 DAE, embora nesta última o aumento não seja tão pronunciado. Apenas no protocolo 50/50 se nota uma diminuição na média do comprimento da camada epitelial. Contudo, o decréscimo é muito reduzido pois aos 20 DAE registou-se um comprimento médio de 7,8 µm e aos 42 DAE 7,4 µm. Após análise estatística verificou-se haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os protocolos Controlo e 20/100.

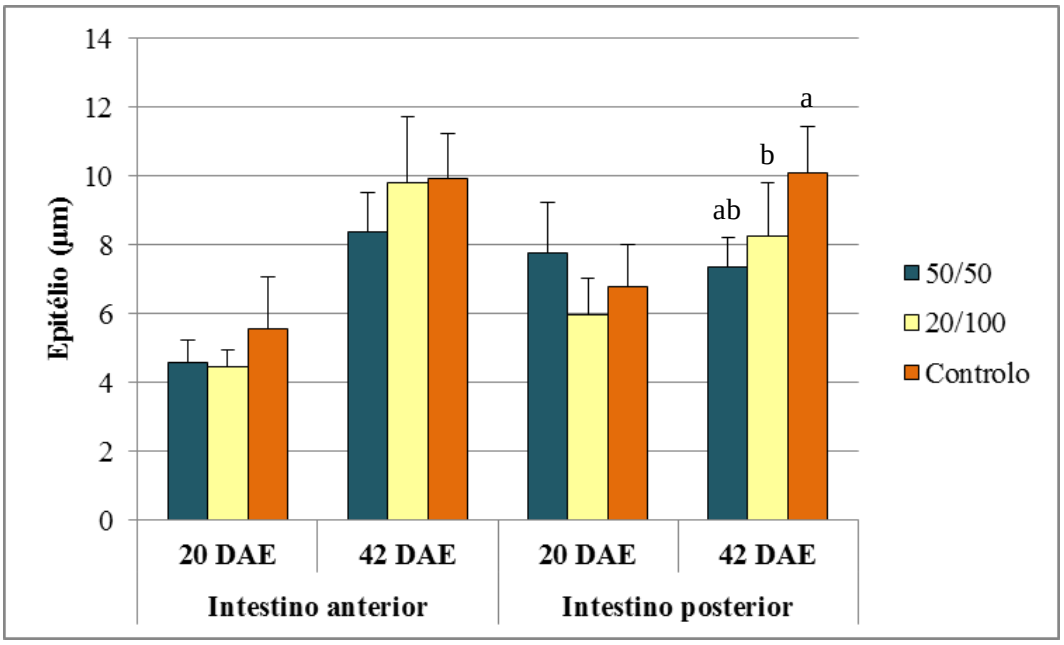

Figura 3.21. Medições epiteliais das porções anterior e posterior do intestino de larvas de dourada (*Sparus aurata*), aos 20 e 42 DAE, pertencentes a cada protocolo alimentar estudado, com os respectivos desvios padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

Em ambas as porções, idades e protocolos o desvio padrão é relativamente reduzido mas semelhante entre todos, sendo, em média no protocolo 50/50 onde se verifica a menor variabilidade.

A **Figura 3.22.** mostra os resultados da contagem dos núcleos dos hepatócitos do fígado. Pela sua observação destaca-se o aumento em todos os protocolos do número de núcleos, dos 20 para os 42 DAE. Na primeira idade estudada, os protocolos 50/50 e Controlo

têm, em média, o mesmo número de hepatócitos, 14, enquanto o 20/100 apresenta um maior número, 19, não existindo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre protocolos. A variabilidade é relativamente baixa em todos os protocolos alimentares, no entanto, o 20/100 apresenta um desvio padrão quase superior e superior a duas vezes àquele obtido para os protocolos 50/50 e Controlo, respectivamente.

Aos 42 DAE a tendência inverte-se. Nesta idade é o protocolo 20/100 que mostra menor número de hepatócitos ($p > 0,05$), 27, face aos restantes 50/50 e Controlo que têm, em média, 32 e 34 hepatócitos, respectivamente. Nesta idade a variabilidade é elevada, com o protocolo 20/100 a registar pouco mais de 1/3 do desvio padrão dos restantes.

Pela contagem dos núcleos e consequente extrapolação para a área dos hepatócitos no fígado, supõe-se que ocorreu uma diminuição da área que os hepatócitos ocupam no fígado aos 42 DAE (maior número de núcleos por área analisada), face aos 20 DAE, semelhante em todos os protocolos alimentares (**Figura 3.22.**).

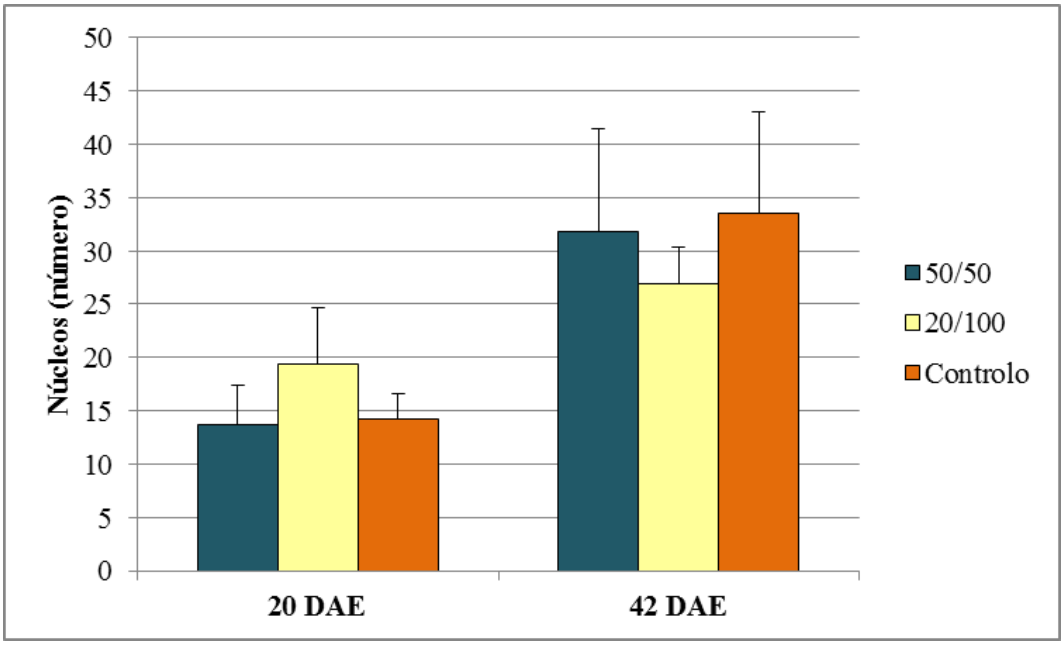

Figura 3.22. Contagem dos núcleos dos hepatócitos do fígado de larvas de dourada (*Sparus aurata*), aos 20 e 42 DAE, pertencentes a cada protocolo alimentar estudado, com os respectivos desvios padrão.

3.1.7. Cortisol

O **Figura 3.23.** mostra as diferenças entre as médias dos níveis de cortisol basais (sem introdução de *stress*) e finais (com *stress*) para cada protocolo alimentar estudado.

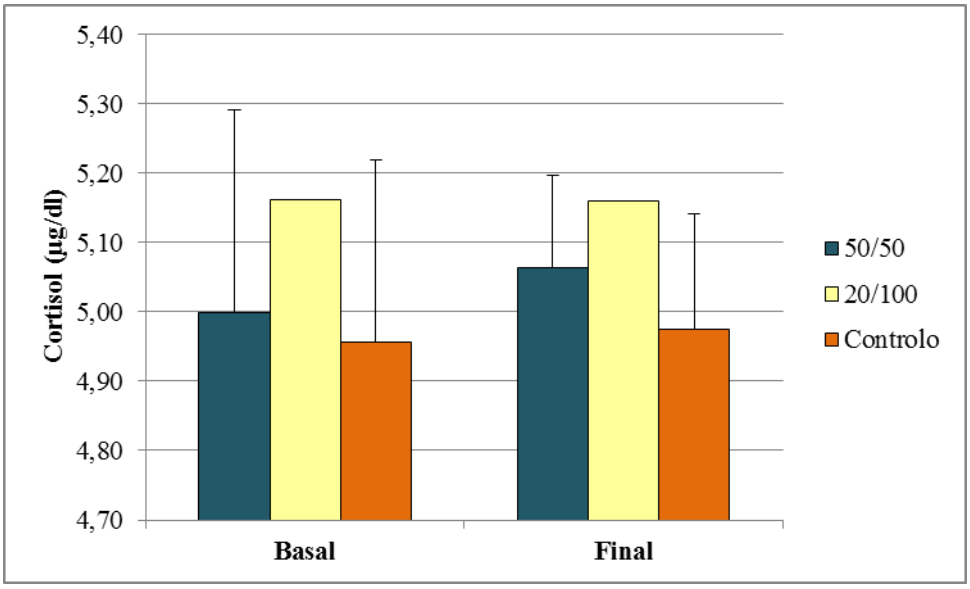

Figura 3.23. Representação dos valores de cortisol basais (sem *stress*) e finais (após introdução de *stress*) registados para as larvas de dourada (*Sparus aurata*), pertencentes a cada protocolo alimentar estudado, com os respectivos desvios padrão.

Observa-se uma semelhança entre os valores basais e finais em todos os protocolos, principalmente no 20/100 (≈ 5,16 µg/dl). Contudo, este resultado pode ser explicado pelo facto de este protocolo ser apenas representado por um tanque (razão pela qual o desvio padrão é zero), devido à mortalidade registada ao longo do ensaio que conduziu a uma escassez de larvas nos restantes tanques deste protocolo alimentar.

Embora a variabilidade dos valores nos protocolos 50/50 e Controlo tenha sido relativamente elevada, as valores são praticamente os mesmos (50/50 - 5 µg/dl: basal; 5,06 µg/dl: final e Controlo - 4,96 µg/dl – basal; 4,97 µg/dl – final) como se verificou após análise estatística ($p > 0,05$), excluindo os dados do protocolo 20/100.

3.2. Introdução de copépodes preservados como ingrediente na formulação de dietas inertes no cultivo juvenil de linguado

3.2.1. Crescimento

A **Figura 3.24.** apresenta os resultados do crescimento, em média, consoante o comprimento total.

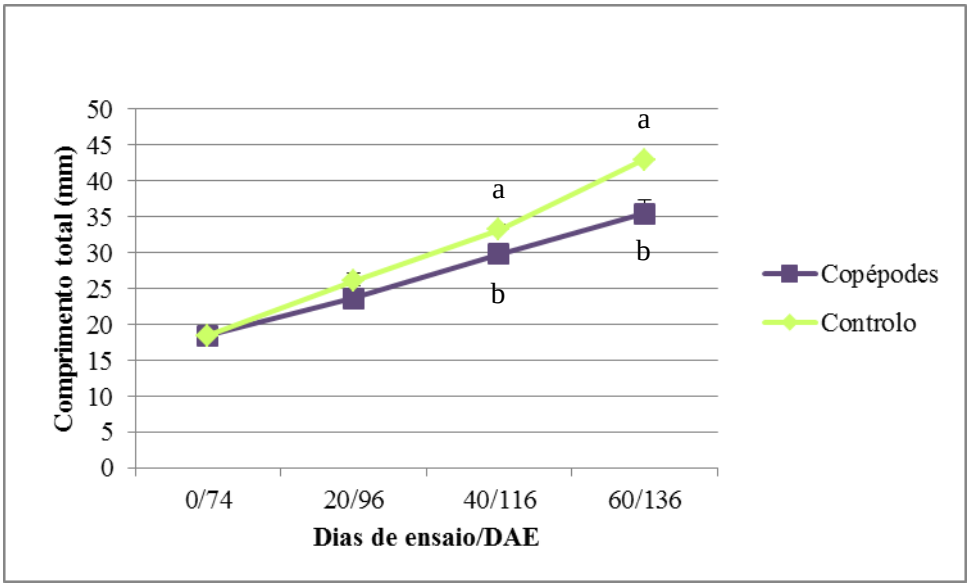

Figura 3.24. Representação da média do crescimento dos juvenis de linguado (*Solea senegalensis*), consoante o comprimento total (mm), para as duas dietas, em todos os pontos de amostragem, com os respectivos desvios padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

Observa-se, pela visualização da **Figura 3.24.**, que os juvenis apresentam um comprimento total crescente ao longo do ensaio, praticamente sem variabilidade ao longo do ensaio.

No início do ensaio, o comprimento médio dos linguados era igual entre as dietas, de 18mm e após 20 dias de ensaio já surgiram diferenças entre as dietas.

A partir deste ponto de amostragem e até ao término do ensaio, os juvenis pertencentes à dieta Controlo apresentaram um comprimento total superior ao dos juvenis da dieta Copépodes, com 26mm e 24mm aos 20 dias, 33mm e 30mm aos 40 dias e 43mm e 35mm aos 60 dias de ensaio, respectivamente, sendo no último ponto de amostragem que se nota a maior diferença entre as dietas.

Após análise estatística, verificou-se a existência de diferenças entre as dietas ($p < 0,05$), aos 40 e 60 dias de ensaio.

Constata-se, pela **Figura 3.25.**, que os juvenis de linguado alimentados com as duas dietas aumentaram de peso ao longo do ensaio, com diferenças nos seus pesos, em média, desde o início do ensaio, embora tenham começando com pesos iguais de 0,06g.

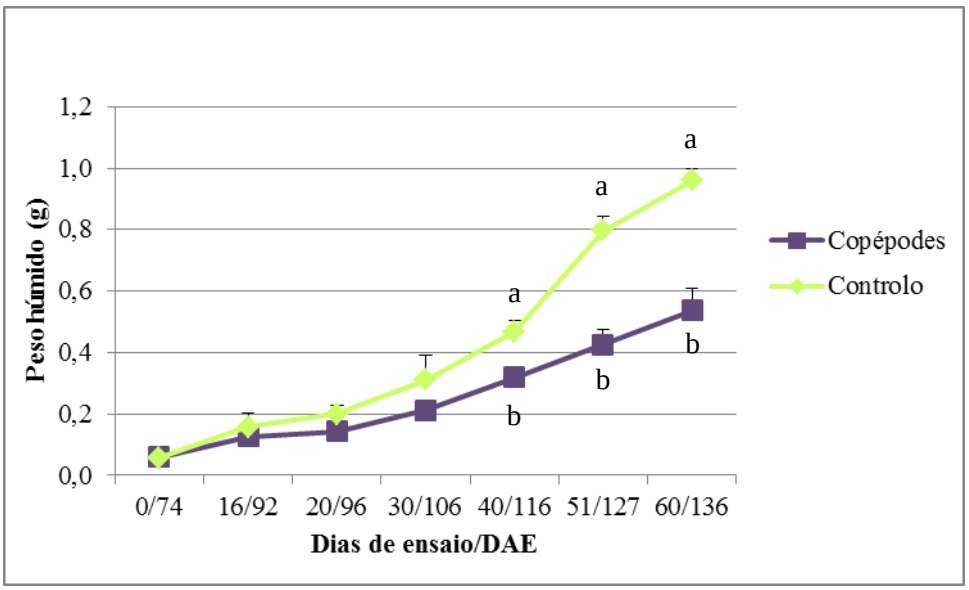

Figura 3.25. Resultados do crescimento, em média, dos juvenis de linguado (*Solea senegalensis*), em função do peso húmido (g), para as duas dietas em todos os pontos de amostragem, com os respectivos desvios padrão. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

Após 16 dias de ensaio os pesos diferem pouco, 0,16g e 0,13g, assim como passados 20 dias com 0,2g e 0,14g, respectivamente, para os juvenis nas dietas Controlo e Copépodes.

Aos 30 e 40 dias depois do início do ensaio já se notam alterações mais visíveis nos pesos ($p < 0,05$), com valores de 0,3g e 0,2g (30 dias) e 0,5g e 0,3g (40 dias), nos juvenis das respectivas dietas Controlo e Copépodes.

No entanto, é nos últimos dois pontos de amostragem, aos 51 e 60 dias de ensaio, que as diferenças nos pesos são mais marcantes e também significativas ($p < 0,05$), onde os juvenis alimentados com a dieta Controlo chegam a pesar o dobro do peso dos juvenis da dieta Copépodes, respectivamente, com 0,8g e 0,4g aos 51 dias e 1g e 0,5g no último ponto de amostragem.

A variabilidade do peso húmido é reduzida ao longo do ensaio em ambas as dietas, contudo, a dieta Copépodes apresenta desvios padrão superiores aos da dieta Controlo em todos os pontos de amostragem.

Analisando o índice de condição (IC) dos juvenis observa-se, pela **Figura 3.26.**, não existirem, praticamente, diferenças entre as dietas ($p > 0,05$).

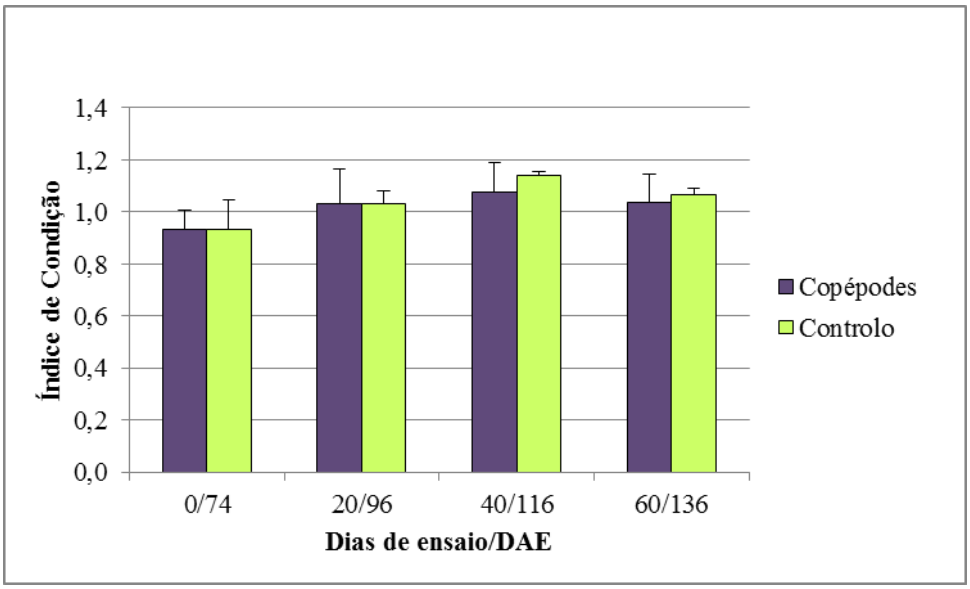

Figura 3.26. Resultados para o índice de condição, em média, para os juvenis de linguado (*Solea senegalensis*), em ambas as dietas para todos os pontos de amostragem, com os respectivos desvios padrão.

Destaca-se que no início do ensaio e passados 20 dias o IC é, em média, igual para os juvenis das duas dietas com um valor de 0,94 e 1,03, respectivamente no começo e passados 20 dias de ensaio.

Apenas passados 40 dias se nota uma pequena alteração, onde os juvenis alimentados com copépodes revelam um IC inferior, com 1,08, relativamente aos sujeitos à dieta Controlo, com 1,14. O contrário se observa na última amostragem, mas apenas com uma diferença mínima, onde os juvenis da dieta Controlo têm um IC de 1,07 e os da dieta com copépodes um IC de 1,03.

Os desvios padrão associados ao IC são reduzidos ao longo das amostragens em ambas as dietas, contudo, a dieta Copépodes tem uma variabilidade superior à Controlo, exceptuando o primeiro ponto amostrado.

Pela **Figura 3.27.** observa-se que a taxa de crescimento relativa (TCR) apresenta uma tendência decrescente nas duas dietas ao longo do ensaio, mais notável na dieta com copépodes do que na Controlo. Contudo, a TCR da dieta Controlo é superior, com 6,4% aos 16 dias de ensaio e 4,7% no último ponto de amostragem, face à dieta Copépodes que tem uma TCR inicial de 4,7% e final de 3,7%.

A variabilidade é baixa para as duas dietas na maior parte dos pontos amostrados, com a excepção dos 16 e 30 dias de ensaio. Em média, a dieta Copépodes apresenta maiores desvios padrão, excluindo os dias 30 e 51 de ensaio.

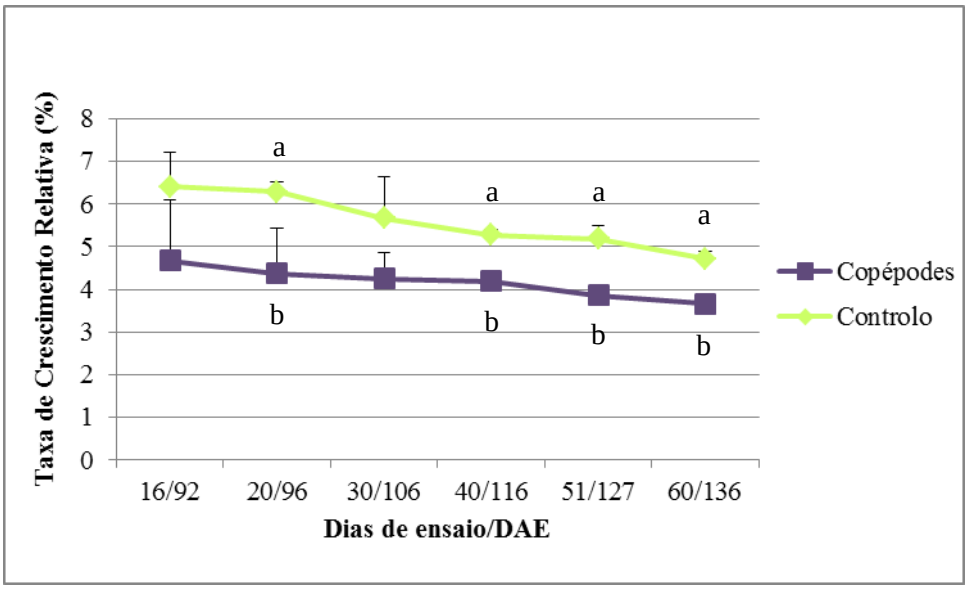

Figura 3.27. Taxa de crescimento relativa (%) média para os juvenis de linguado (*Solea senegalensis*), nas duas dietas e em todos os pontos de amostragem. As letras indicam a presença de diferenças estatísticas significativas.

Após análise da pigmentação cutânea, os diversos tipos encontrados foram agrupados em quatro categorias: Acastanhado, Cinzento claro, Cinzento escuro, Sem pigmentação e Ambicoloração – casos de diferentes colorações na cabeça e no restante corpo (**Figura 3.28.**).

Figura 3.28. Linguado (*Solea senegalensis*) com ambicoloracão.

Praticamente toda a população amostrada, em ambas as dietas, apresentava pigmentação cinzenta clara, com 93% na dieta Copépodes e 89% da dieta Controlo. Os outros tipos de pigmentação revelaram-se muito pouco frequentes em ambas as dietas. Apenas 4% dos peixes de ambas as dietas eram acastanhados, 3% não tinham pigmentação e 1% da dieta Copépodes e 4% da Controlo se mostraram cinzentos escuros. O tipo que menos vezes surgiu foi a ambicoloração, com uma percentagem inferior a 1% em ambas as dietas. Para todos as pigmentações e em ambas as dietas, a variabilidade é baixa e semelhante, sendo o cinzento claro o tipo com maior desvio padrão (**Figura 3.29.**).

Estatisticamente, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhum tipo de pigmentação considerado, entre as dietas.

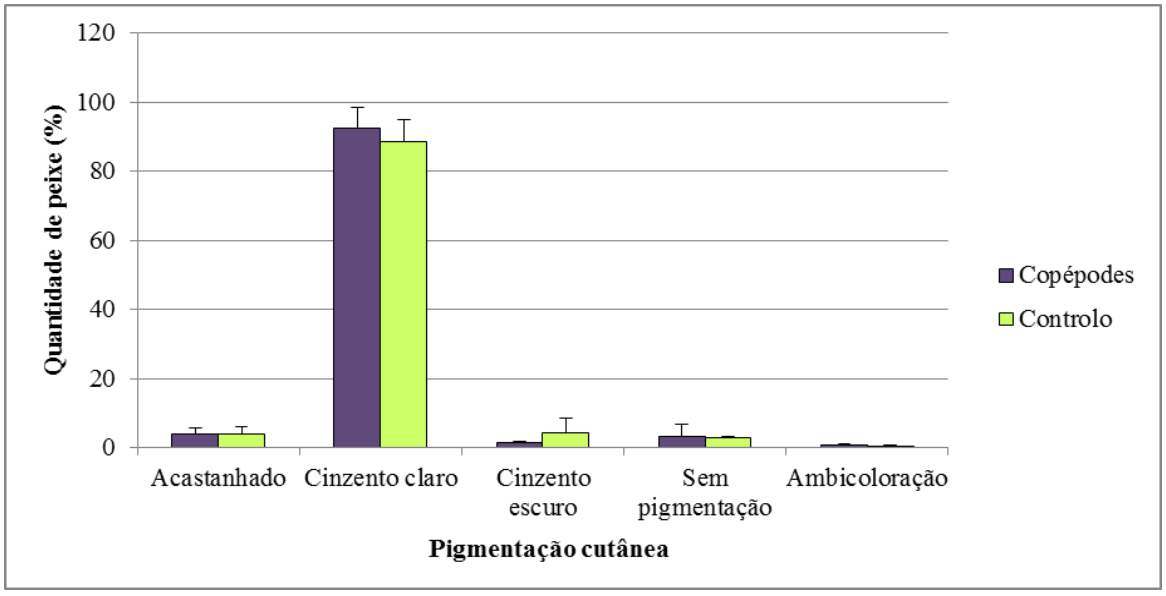

Figura 3.29. Representação da percentagem de juvenis de linguado (*Solea senegalensis*) para cada tipo de pigmentação considerado, em média, para ambas as dietas, com os respectivos desvios padrão.

3.2.2. Sobrevivência

A **Figura 3.30.** mostra a sobrevivência dos juvenis de linguado obtida ao longo do ensaio, e, por ele, se destaca uma diferença considerável nos valores médios entre as dietas Controlo e Copépodes, embora a tendência ao longo do ensaio tenha sido semelhante para ambas. Contudo, nota-se que o desvio padrão associado à dieta Copépodes é muito superior ao da dieta Controlo, o que pode influenciar a sobrevivência destes peixes, embora,

estatisticamente, não haja diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as dietas em nenhum ponto amostrado.

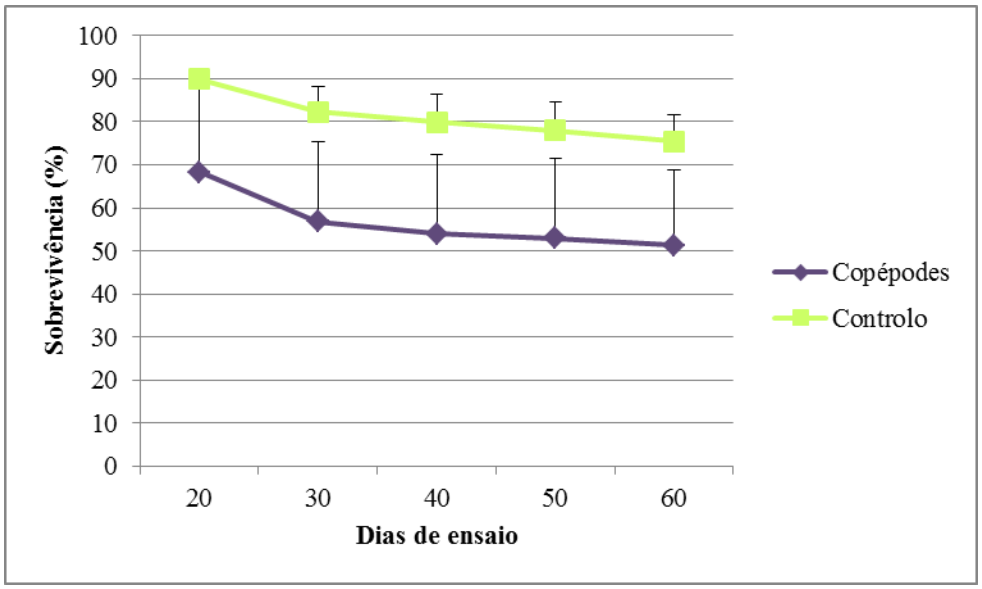

Figura 3.30. Representação da sobrevivência (%) dos juvenis de linguado (*Solea senegalensis*), em média, para ambas as dietas, ao longo do ensaio, com os respectivos desvios padrão.

Em ambas as dietas nota-se um decréscimo pequeno mas constante da sobrevivência ao longo do ensaio, sendo a descida mais abrupta registada dos 20 para os 30 dias. No último ponto de amostragem os juvenis alimentados com copépodes apenas mostraram uma sobrevivência média de 51%, enquanto aqueles sujeitos a uma dieta controlo revelaram uma taxa de sobrevivência superior, de 76%.

3.2.3. Teste de *stress*

Neste ensaio, os linguados revelaram uma resistência ao stress igual independente da dieta a que estavam sujeitos pois nenhum linguado morreu após exposição ao ar nem após os 150 minutos de observação, o que indica que recuperaram bem do stress crónico induzido.

3.2.4. Enzimas Digestivos

3.2.4.1. *Tripsina*

A **Figura 3.31.** a seguir mostra os valores obtidos para as médias das actividades específica e total, deste enzima no homogenado dos segmentos intestinais.

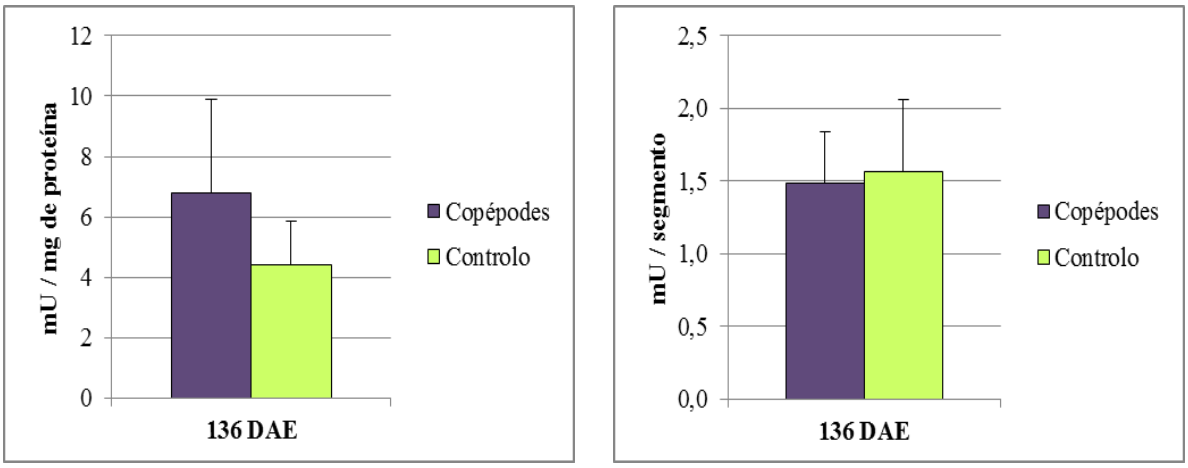

Figura 3.31. Representação gráfica das médias das actividades específica (esquerda) e total (direita) da tripsina por dieta, para o homogenado dos segmentos intestinais de linguado, *Solea senegalensis*, com os respectivos desvios padrão.

Pelos gráficos observam-se semelhanças aparentes entre as dietas para ambas as actividades. Esta análise é corroborada estatisticamente ($p > 0,05$), provando-se a ausência de diferenças significativas.

Os juvenis sujeitos à dieta Copépodes apresentam uma actividade específica de 6,8 mU/mg de proteína e os da dieta Controlo uma actividade de 4,4 mU/mg de proteína. O desvio padrão para o Controlo é baixo, enquanto para a dieta com copépodes é relativamente elevado.

Os valores registados para a actividade total são praticamente os mesmos entre dietas com 1,5 e 1,6 mU/segmento para os juvenis com a dieta Copépodes e Controlo, respectivamente. A variabilidade também é baixa e semelhante para ambas as dietas.

3.2.4.2. *Aminopeptidase*

A actividade da aminopeptidase foi determinada no homogenado mas também no prato estriado, como ilustra a **Figura 3.32.**.

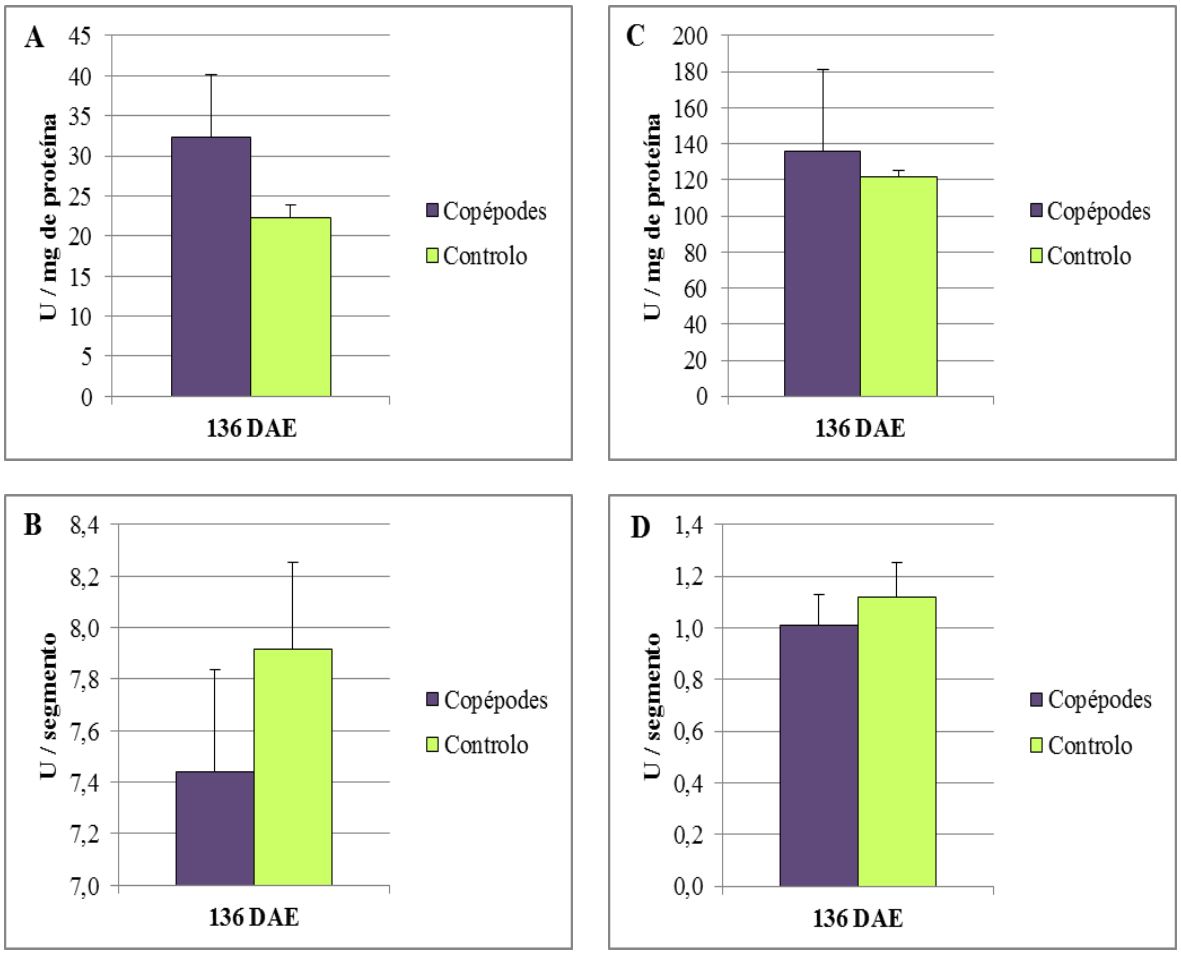

Figura 3.32. Gráficos ilustrativos das médias das actividades específica e total da aminopeptidase no homogenado (A e B, respectivamente) e no prato estriado (C e D, respectivamente), para ambas as dietas, no linguado (*Solea senegalensis*) com os respectivos desvios padrão.

Pelos gráficos vê-se uma diferença aparente entre as dietas para as médias das actividades específicas, tanto no homogenado (32,3 e 22,3 U/mg de proteína nas dietas Copépodes e Controlo, respectivamente) como no segmento do prato estriado (135,6 e 121,3 U/mg de proteína, respectivamente, para as dietas Copépodes e Controlo). Os desvios padrão são relativamente baixos para as actividades no homogenado nas duas dietas, embora a diferença entre elas seja elevada. Na actividade do prato estriado o desvio padrão obtido é bastante elevado para a dieta Copépodes e muito reduzido para a Controlo.

A actividade total obtida revelou-se muito semelhante entre as dietas com os juvenis da dieta Copépodes a revelarem uma actividade de 7,4 U/segmento e os da dieta Controlo 7,9 U/segmento de actividade. A variabilidade também é semelhante e reduzida para esta actividade em ambas as dietas. Para o prato estriado segue-se a mesma tendência com os juvenis a revelarem actividades totais praticamente iguais independentemente da dieta com copépodes (1 U/segmento) ou Controlo (1,1 U/segmento), com um desvio padrão baixo e semelhante em ambas as dietas.

Novamente, a análise estatística revela que não existem diferenças significativas entre as dietas para as actividades específica e total, quer no homogenado quer no prato estriado ($p > 0,05$).

3.2.4.3. *Amilase*

Pela **Figura 3.33.**, observa-se somente uma ligeira distinção entre as dietas nas actividades específica e total. A actividade específica nos peixes sujeitos à dieta com copépodes é de 2,6 U/mg de proteína, e aquela dos peixes alimentados com a dieta Controlo é um pouco mais baixa, 1,5 U/mg de proteína. Contudo, o desvio padrão associado à dieta Copépodes é reduzido mas elevado face ao desvio padrão da dieta Controlo.

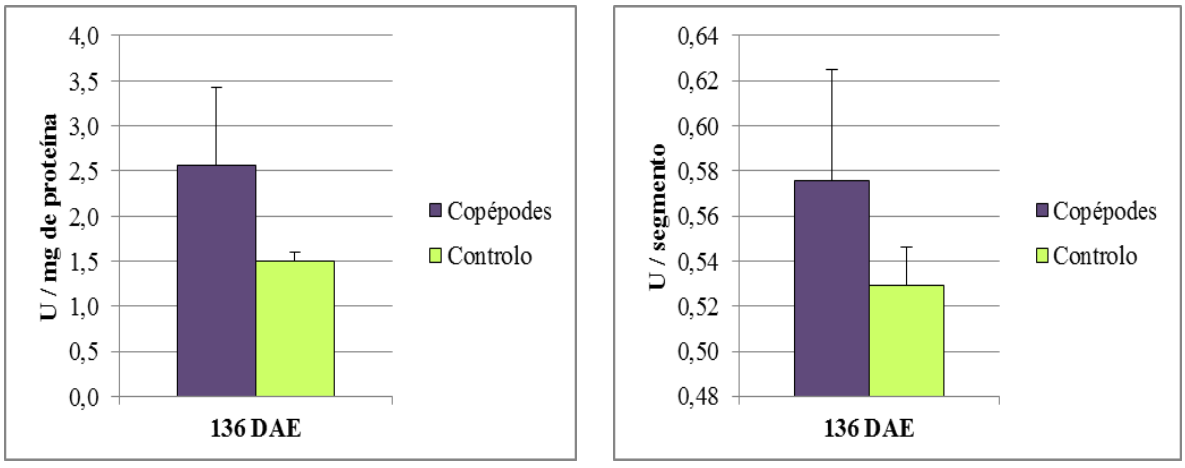

Figura 3.33. Representação gráfica, para ambas as dietas, das médias das actividades específica (esquerda) e total (direita) da amilase para o homogenado dos segmentos intestinais de linguado, *Solea senegalensis* com os respectivos desvios padrão.

Já a actividade total revela-se praticamente a mesma entre as dietas. Os juvenis da dieta Copépodes apresentam uma actividade ligeiramente maior com 0,6 U/segmento, relativamente aos da dieta Controlo com 0,5 U/segmento de actividade. Nesta amostra o desvio padrão de ambas as dietas é praticamente inexistente, sendo aquele associado à dieta Copépodes um pouco maior que o da dieta Controlo.

Apesar das pequenas variações das actividades deste enzima, estas são rejeitadas estatisticamente confirmando-se a ausência de diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as dietas.

3.2.4.4. *Fosfatase ácida*

Na **Figura 3.34.** estão representados os resultados da actividade deste enzima.

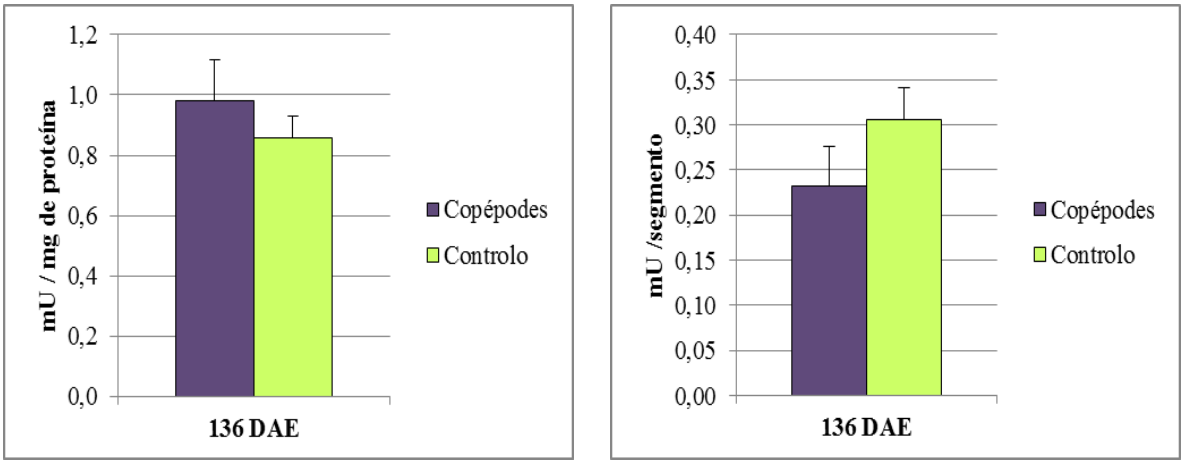

Figura 3.34. Gráficos para as médias das actividades específica (esquerda) e total (direita) da fosfatase ácida, para ambas as dietas, no homogenado de segmentos intestinais de linguado (*Solea senegalensis*) com os respectivos desvios padrão.

Também para a fosfatase ácida se vê, pelos gráficos, uma semelhança nos valores médios das actividades revelados pelos peixes de ambas as dietas, certificada pelos resultados da análise estatística, rejeitando a existência de diferenças significativas ($p > 0,05$).

Os juvenis alimentados com copépodes mostram uma actividade específica de 1 mU/mg de proteína e os alimentados com a dieta Controlo uma actividade de 0,9 mU/mg de proteína, com uma variabilidade reduzida em ambas.

A actividade total obtida foi de 0,1 mU/segmento nos indivíduos da dieta Copépodes e de 0,07 mU/segmento nos da dieta Controlo, também com uma variabilidade baixa nas duas dietas.

3.2.4.5. *Fosfatase alcalina*

À semelhança do enzima aminopeptidase, também para a fosfatase alcalina foram determinadas as suas actividades presentes no homogenado e prato estriado, como mostra a **Figura 3.35.**.

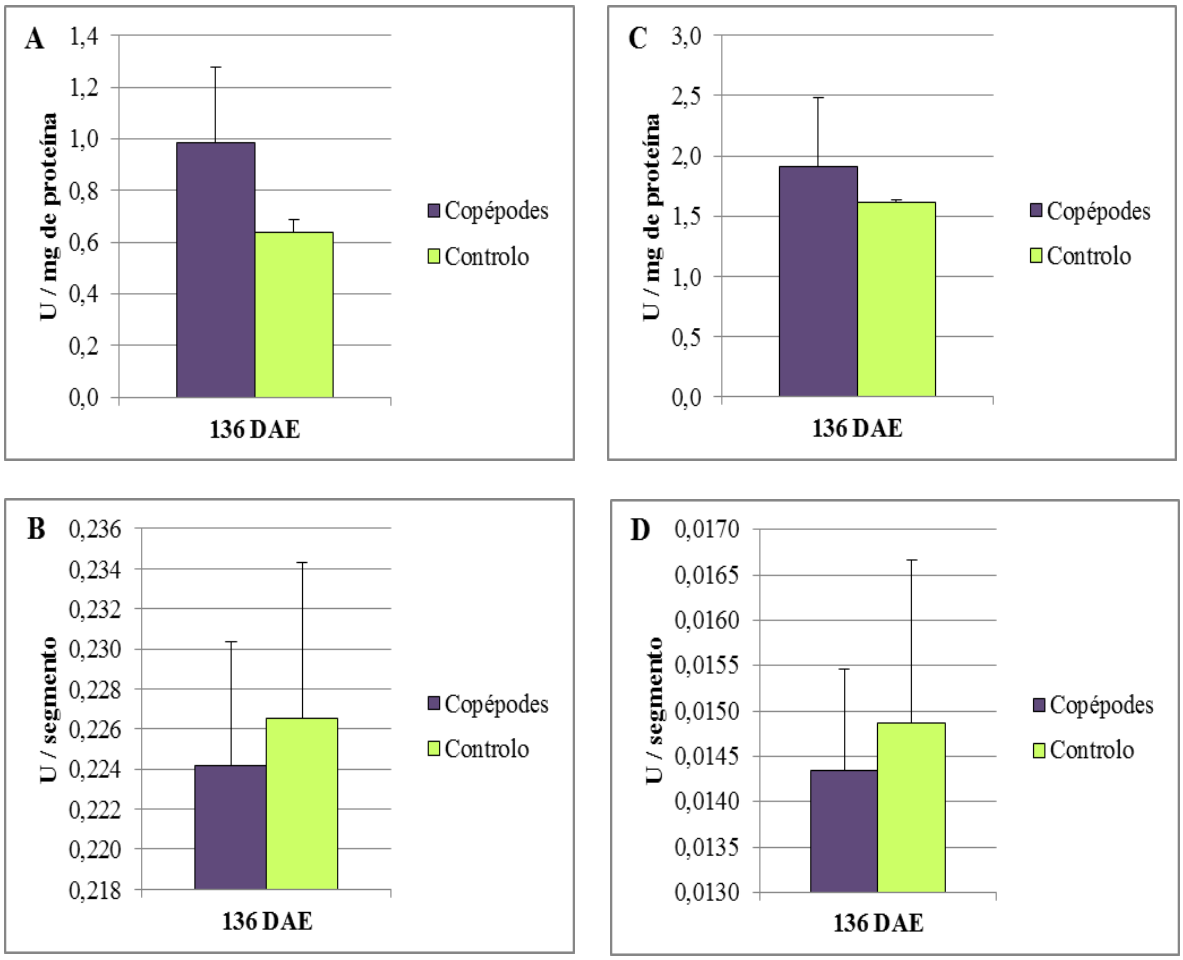

Figura 3.35. Gráficos das médias dos valores obtidos para as actividades específica e total da fosfatase alcalina, para ambas as dietas, no homogenado (A e B, respectivamente) e no prato estriado (C e D, respectivamente) com os respectivos desvios padrão.

Mais uma vez, pode-se constatar pelos gráficos, que as variações entre as dietas, para ambas as actividades, tanto no homogenado como no prato estriado, não são significativas, como mostram, aliás, os resultados dos testes estatísticos aplicados ($p > 0,05$).

Os juvenis mostram níveis de actividade específica, para o homogenado, de 1 U/mg de proteína quando alimentados com copépodes e de 0,6 U/mg de proteína com alimentação Controlo. No prato estriado a variação da actividade entre dietas é a mesma, sendo de 2 U/mg de proteína para os indivíduos da dieta Copépodes e para aqueles sujeitos à dieta normal, de 1,6 U/mg de proteína. No homogenado observa-se um desvio padrão superior na dieta Copépodes em comparação com a dieta Controlo tem apenas, no prato estriado, a variabilidade da dieta Copépodes é elevada quando comparada com a dieta Controloque apresenta um desvio padrão praticamente nulo.

Os valores obtidos da actividade total para ambas as dietas e segmentos analisados revelaram-se praticamente iguais, tanto na sua média como no desvio padrão a ela associado. Para o homogenado, os peixes das duas dietas mostram uma actividade média de 0,2 U/segmento, e de 0,01 U/segmento para o prato estriado. A variabilidade de ambas as dietas, tanto no homogenado como no prato estriado, são relativamente elevadas mas semelhantes, embora os desvios padrão da Controlo sejam ligeiramente superiores aos da dieta Copépodes.

3.2.5. Histologia

Como se pode ver pela **Figura 3.36.**, não existem diferenças aparentes tanto na organogénese como na estrutura celular, do fígado, estômago e intestino dos juvenis de linguado, independentemente da dieta a que estão sujeitos.

Pelas fotografias **A** e **B** da **Figura 3.36.**, pode-se observar que o fígado apresenta uma cor arroxeada, onde se visualiza uma rica rede vascular. As pontuais diferenças na cor deste órgão devem-se a possíveis erros aquando do processo de coloração dos cortes. As células têm uma forma circular com um núcleo concêntrico.

Histologicamente, o estômago era composto por quatro camadas distintas: mucosa, lâmina própria-submucosa, muscular (circular e longitudinal) e serosa (**Figura 3.36. C** e **D**). A camada muscular circular interna era bem desenvolvida e longitudinal externa

formada por fibras musculares longitudinais. A mucosa gástrica era composta por um epitélio colunar simples, com um núcleo oval e um nucléolo evidente.

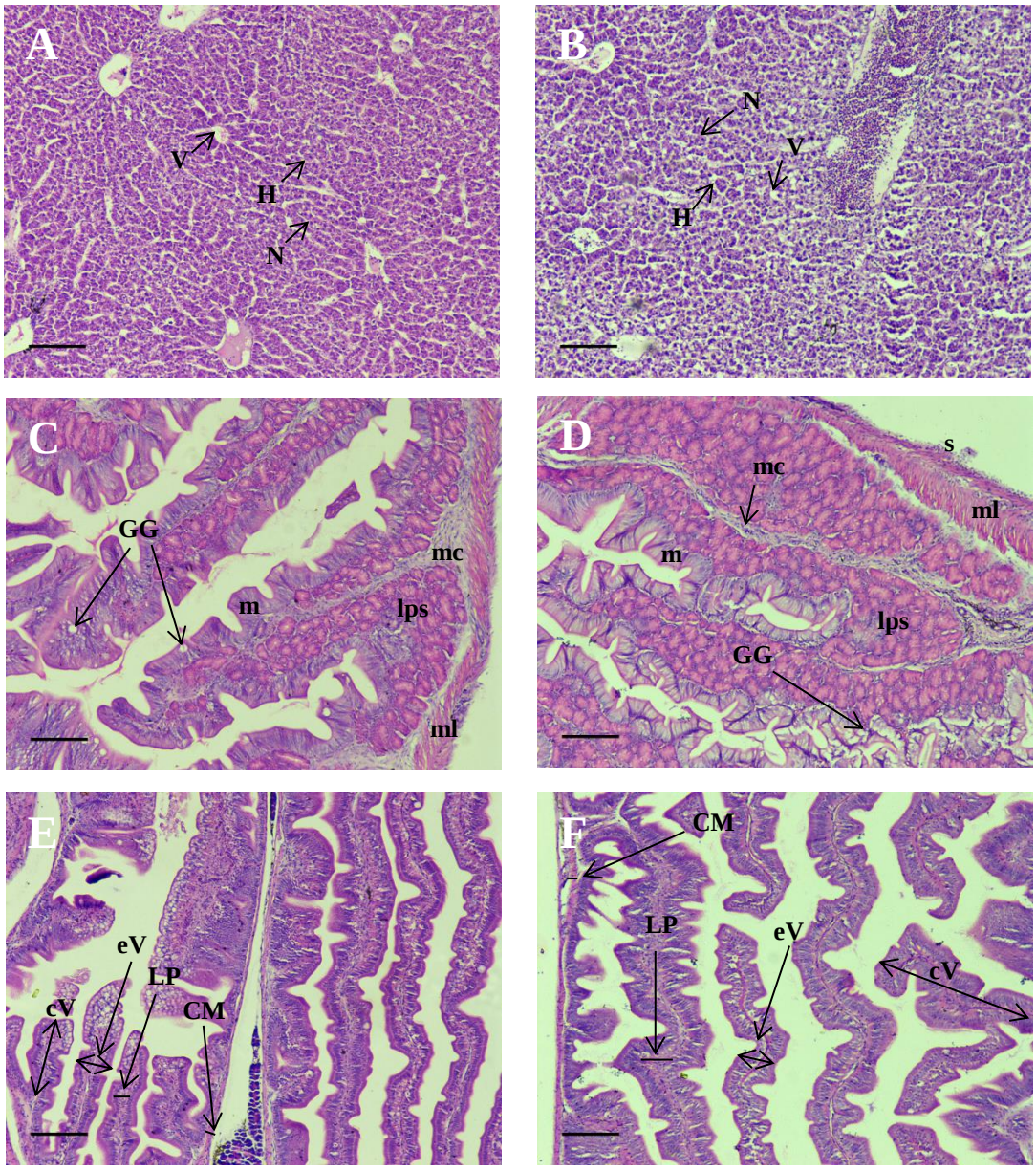

Figura 3.36. A e B: cortes de fígado de linguado (*Solea senegalensis*) nas dietas Copépodes e Controlo, respectivamente. C e D: cortes de estômago de linguado nas dietas Copépodes e Controlo, respectivamente. E e F: cortes de uma porção de intestino de linguado nas deitas Copépodes e Controlo, respectivamente. CM - camada muscular; cV – comprimento da vilosidade; E – enterócito; eV – espessura da vilosidade; GG – glândulas gástricas; H – hepatócito; lps – lâmina própria-submucosa; LP – lâmina própria; m- mucosa; mc – musculatura circular; ml – musculatura longitudinal; N – núcleo; s – camada serosa; V – vacúolo. A barra de escala corresponde a 100 µm.

O intestino do linguado é dividido em dois compartimentos, anterior e posterior, que embora difiram anatomicamente, são similares em termos histológicos. Por razões de facilidade de análise, apenas foi analisada a porção anterior do intestino. Três tipos de células (epiteliais (enterócitos), rodlet e goblet) eram dominantes no epitélio intestinal do

linguado, contudo apenas as primeiras células foram possíveis de identificar nos cortes realizados (**Figura 3.36. E** e **F**). As células epiteliais ou absortivas, eram longas com um núcleo oval e irregular, localizado na região basal, apresentando um nucléolo proeminente. É na parte apical destas células que se encontram numerosas microvilosidades formadoras do prato estriado (*brush boarder*). São também visíveis, nestas fotografias, numerosas glândulas gástricas.

A **Figura 3.37.** representa os resultados do comprimento do epitélio intestinal. Observa-se que o comprimento da camada epitelial é muito semelhante entre dietas, sendo até, em média, igual, 16 µm, mostrando-se assim não existirem diferenças entre as dietas ($p > 0,05$). A variabilidade em ambas as dietas é baixa e também igual.

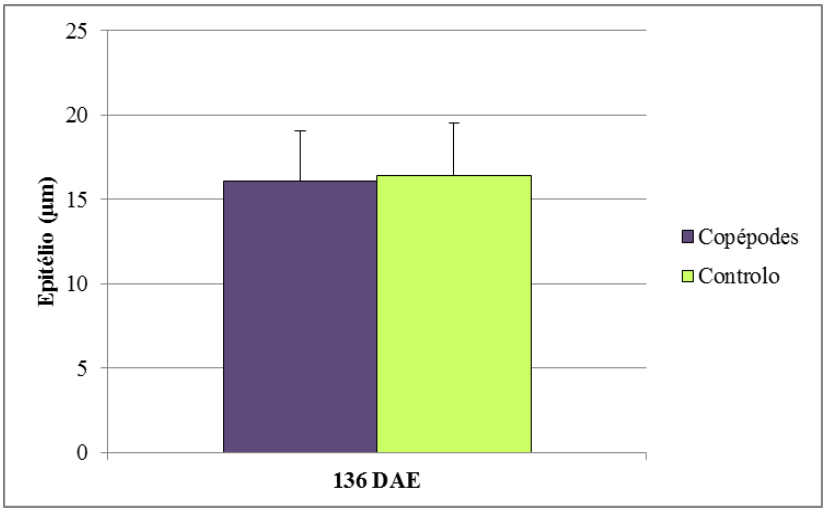

Figura 3.37. Medições da camada epitelial da porção média do intestino dos linguados (*Solea senegalensis*) pertencentes às dietas Controlo e Copépodes, com os respectivos desvios padrão.

Analisando as contagens dos núcleos dos hepatócitos (**Figura 3.38.**) destaca-se uma ligeira diferença, não significativa ($p > 0,05$), entre as dietas. A dieta Copépodes revelou, em média, 25 hepatócitos na área considerada, e a dieta Controlo 24. Contudo, a variabilidade é elevada na dieta Controlo, com um desvio padrão aproximadamente quatro vezes superior ao obtido na dieta Copépodes.

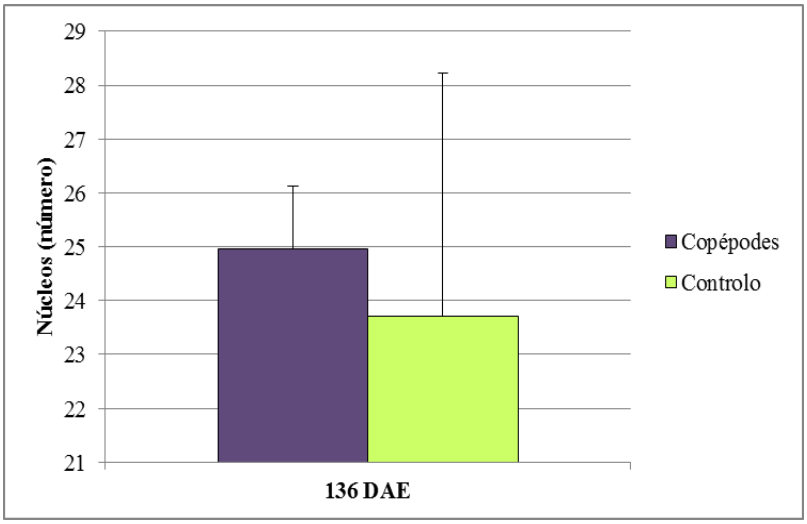

Figura 3.38. Contagem dos núcleos dos hepatócitos do fígado de linguados (*Solea senegalensis*) sujeitos às dietas Controlo e Copépodes, com os respectivos desvios padrão.

3.2.6. Cortisol

Pela **Figura 3.39.**, conclui-se que, em média, os valores de cortisol obtidos são muito díspares entre as dietas. A dieta Copépodes apresenta um valor médio (61,4 ng/ml) ligeiramente superior ao dobro daquele encontrado para a dieta Controlo (29,3 ng/ml). Contudo, este resultado pode estar influenciado pela elevada variabilidade registada nos resultados da dieta Copépodes.

Estatisticamente, esta variabilidade não é significativa ($p > 0,05$), pois não se registaram diferenças relevantes entre as dietas.

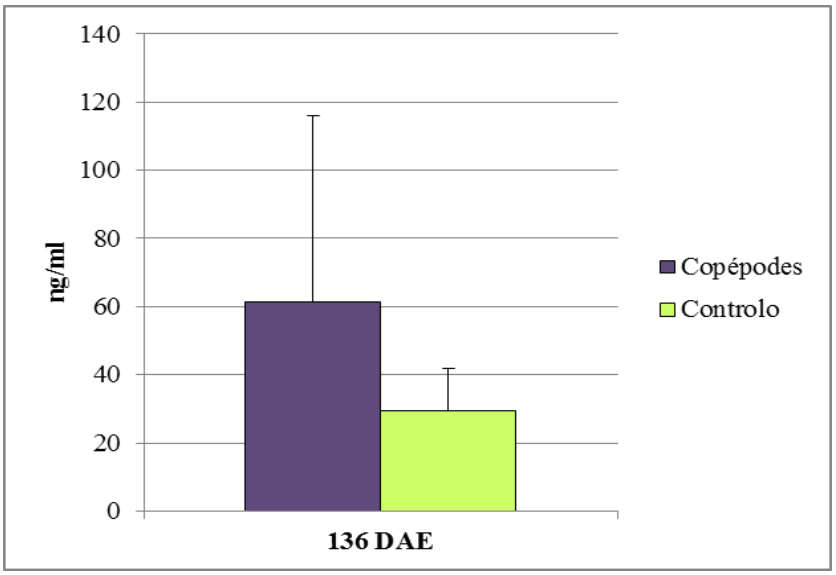

Figura 3.39. Níveis de cortisol (ng/ml) dos linguados (*Solea senegalensis*) pertencentes às dietas Controlo e Copépodes, com os respectivos desvios padrão.

4. *Discussão*

A substituição parcial do alimento vivo por copépodes na alimentação de larvas de dourada e a introdução de copépodes na formulação da dieta inerte para juvenis de linguado, permitiu obter indivíduos de qualidade semelhante em termos da sua capacidade e morfologia digestiva, resistência ao *stress*, incidência de malformações e pigmentação, apesar do menor crescimento observado quando comparado com os grupos controlo.

Substituição parcial do alimento vivo por copépodes preservados no cultivo larvar de dourada

Neste ensaio concluiu-se que as larvas de dourada alimentadas com um aumento gradual de copépodes preservados (grupo 20/100) revelaram uma *performace* inferior relativamente ao comprimento total e peso seco, em comparação com aquelas alimentadas com o protocolo alimentar controlo e 50/50. Estes resultados estão de acordo com outros estudos (Piccinetti *et al*., 2014, 2012; Fernández-Díaz e Yúfera, 1996; Moyano *et al*., 1996, Sarasquete *et al*., 1993).

O menor crescimento observado para o grupo 20/100 pode estar relacionado com a má aceitação por parte das larvas de um alimento sem movimento. É um facto que a maioria dos peixes marinhos cultivados não responde bem a alimentos inertes no estádio larvar e que requerem um certo período de adaptação (Papadakis *et al*., 2009). Os copépodes usados neste ensaio foram preservados após captura no meio natural, sendo por isso partículas inertes desprovidas do movimento característico das presas vivas essencial ao sucesso da captura (Piccinetti *et al*., 2014; Papadakis *et al*., 2009; Pousão-Ferreira, 2009; Kolkovski *et al*., 1997a, b), este alimento torna-se pouco atractivo. Além disto, estes copépodes afundam com maior facilidade em relação ao alimento vivo podendo não chegar a todos os peixes (Piccinetti *et al*., 2014). Uma resolução para este problema poderia passar por uma entrada de ar lateral ao invés de central, como é o caso deste cultivo, ou um aumento do fluxo que permitisse uma maior flutuabilidade durante mais tempo. Contudo, se isto se aplicasse podia perturbar o comportamento passivo das larvas, afectando o seu normal desenvolvimento e sobrevivência, devido à presença de correntes demasiado fortes para as larvas.

Apesar deste resultado para o grupo 20/100, o mesmo não se verificou para os peixes sujeitos ao protocolo 50/50. Estes tiveram uma *performance* igual aos peixes do Controlo, com comprimento, peso, altura do miótomo e taxa de crescimento relativa (TCR) iguais ou

ligeiramente superiores aos dos peixes do protocolo Controlo. Os náuplios de artémia são mais atractivos para as larvas do que particulas inertes, devido aos seus movimentos e a vários atractantes que contém (Papadakis *et al*., 2009; Kolkovski *et al*., 1997a, b). Assim, a presença de artémia aparenta ter favorecido a aceitação e captura do alimento preservado, facilitando o encontro, nem que fosse por acaso, deste alimento pelas larvas. Piccinetti *et al*. (2014), num ensaio semelhante com introdução de copépodes em larvas de dourada, reportaram uma tendência semelhante entre os grupos Controlo e de alimentação combinada (alimento vivo e copépodes preservados), mas valores de comprimento total inferiores.

O menor comprimento e peso dos peixes do grupo 20/100 face aos restantes é mais notável a partir dos 32 dias, poucos dias depois da eliminação do alimento vivo neste protocolo e momento em que se iniciou a administração de copépodes da maior classe de tamanho utilizada neste ensaio (300-400 µm). Estes eventos podem ter influenciado os resultados no grupo 20/100. Apesar de terem sido alimentadas com copépodes desde os 8 DAE, a transição para o alimento inerte pode não ter sido feita da forma mais correcta, pelo que estas larvas não conseguiram acompanhar o crescimento das larvas dos restantes grupos, que até então não era muito diferente. Também, a dimensão dos copépodes (300-400 µm) usados nesta fase pode ter sido demasiado grande para a maioria das larvas desta dieta. Como estas estavam menos desenvolvidas, provavelmente tinham uma boca mais pequena que dificultava a captura de partículas de maiores dimensões (Pousão-Ferreira, 2009). Assim, existia uma menor quantidade de alimento disponível que era efectivamente viável para estas larvas e, consequentemente, um aumento de alimento degradado (não consumido), o que pode ter contribuído para a maior mortalidade registada neste período. Também pode ter diminuído a qualidade da água embora os testes de amónia e nitritos realizados por grupo não tenham acusado níveis tóxicos ou próximos da toxicidade, à semelhança do reportado por Piccinetti *et al*. (2014).

Desequilíbrios no perfil de ácidos gordos podem também ter afectado negativamente o crescimento. De acordo com Koven *et al*. (2003) o menor crescimento a esta idade também pode estar relacionado com o decréscimo dos níveis de DHA (ácido docosahexanóico), essencial no crescimento. Esta diminuição é coincidente com o aumento de ARA (ácido araquidónico) proveniente dos copépodes, ricos neste ácido gordo (Ajiboye *et al*., 2011; Støttrup e Jensen, 1990), principalmente nas classes de tamanho 200-400 µm (Piccinetti *et al*., 2014). Há também registos do efeito positivo do ARA no crescimento, no entanto, este efeito é mais evidente nos primeiros dias de uma larva (Van Anholt *et al*., 2004) e parece estar limitado a um aumento do comprimento total (Bessonart *et al*. 1999). Estes resultados

suportam a ausência de diferenças no crescimento entre protocolos obtidas neste estudo até aos 32 DAE e o decréscimo no comprimento e peso dos peixes do grupo 20/100 a partir desta idade, com alimentação exclusiva de copépodes de 300-400 µm. Contudo, este efeito do ARA apresenta resultados contraditórios entre autores, sendo reportado como positivo (Van Anholt *et al*., 2004) e negativo (Koven *et al*., 2003, 2001) para o crescimento.

A sobrevivência obtida neste estudo foi maior para as larvas dos grupos Controlo e 50/50 face aos 20/100, embora sem diferenças significativas entre grupos. Os valores da sobrevivência deste ensaio foram inferiores ao reportado por outros autores para a mesma espécie (Koven *et al*., 2003; Tandler e Kolkovski, 1991). Piccinetti *et al*. (2014) também obtiveram melhor sobrevivência aos 40 DAE nas larvas dos grupos Controlo e de alimentação combinada. No entanto, para o grupo alimentado com rotíferos seguidos de copépodes preservados (equivalente ao grupo 20/100 deste ensaio), os autores reportaram total mortalidade a partir dos 30 DAE. Este resultado contrasta com o obtido no presente estudo pois as douradas do grupo 20/100 sobreviveram até ao final do ensaio. Esta discrepância pode dever-se a diferenças no cultivo pois estes autores utilizaram uma densidade superior (100 larvas/L), um fotoperíodo de 24h luz/0h escuro e uma temperatura 1^{o}C superior. Para além das razões relativas ao alimento, já mencionadas, factores como fragilidade larvar, parâmetros ambientais, contaminações ou simplesmente problemas de desenvolvimento alheios ao cultivo podem explicar a maior mortalidade registada até aos 14 DAE, visto os peixes Controlo também seguirem esta tendência.

Durante o desenvolvimento larvar de espécies fisoclistas, como a dourada, a bexiga gasosa pode não insuflar tendo repercussões negativas na integridade do esqueleto (Paperna, 1978; Chatain, 1994c; Andrades *et al*., 1996), na taxa de crescimento, na resistência ao *stress* e na sobrevivência (Soares *et al*., 1994; Chatain, 1987; Chatain e Dewavrin, 1989). Contudo, a sobre-insuflação deste órgão também provoca o síndrome de *stress* de bexiga gasosa (Bagarinao e Kungvankij, 1986), o qual surge devido a *stress* causado por distúrbios dos factores abióticos (Foscarini, 1988), transporte e manejamento (Katavic, 1986). Apesar dos problemas associados à incorrrecta insuflação da bexiga terem consequências importantes na mortalidade inicial larvar, estes afectam mais a produtividade das aquaculturas do que a qualidade da prole (Divanach *et al*., 1996). Neste trabalho, aos 8 DAE registou-se uma percentagem aproximada de 20% de peixes com bexiga insuflada nos protocolos Controlo e 50/50 e de 37% no 20/100. Os melhores resultados para o grupo 20/100 não estavam relacionados com o produto preservado, uma vez que este só foi iniciado neste dia. As menores percentagens de insuflação dos restantes protocolos alimentares podiam dever-se a

falta de vigor larvar (Tandler *et* al., 1995) e fraca capacidade natatória (Divanach *et al*., 1996), características do início de vida larvar. Aos 14 DAE observou-se, em média, 91% de insuflações em todos os grupos e aos 42 DAE, na última amostragem, constatou-se que em todas as dietas 98% dos peixes apresentavam a bexiga insuflada.

À semelhança de muitos outros teleósteos, o cultivo de dourada está associado a um aumento da incidência de malformações esqueléticas, detectáveis nos estádios larvares, principalmente nas zonas hemal e caudal do corpo (Boglione *et al*., 2001; Faustino e Power, 1998; Santamaría *et al.*, 1994; Francescon *et al.*, 1988; Barahona-Fernandes, 1982; Paperna, 1978).

O complexo caudal, mais concretamente a barbatana caudal (Divanach *et al*., 1996), é a parte do corpo do peixe com maior quantidade de malformações (Boglione *et al*., 2001), podendo afectar até 65% da população de peixes cultivados (Koumoundouros *et al*., 1995). No entanto, a "sensitividade da região caudal" aparenta ser uma característica específica da dourada (Boglione *et al*., 2001), pois não se encontra documentado em robalo nem noutros teleósteos, à excepção da tilápia onde este problema é causado por uma mutação letal recessiva (Mair, 1992). Estes dados estão de acordo com os resultados do presente estudo para a barbatana caudal, que foi a que apresentou mais malformações no conjunto de larvas amostrado. Contudo, contrastam com a região caudal da coluna vertebral que registou o menor número de malformações no total de larvas analisadas, em comparação com as restantes regiões da coluna analisadas.

Malformações vertebrais de vários graus de severidade são comuns no cultivo de dourada e robalo (Paperna, 1978; Chatain, 1994 a, b). Entre elas encontram-se a escoliose (curvatura lateral), lordose (curvatura do plano sagital em forma de V), normalmente relacionada com a ausência de bexiga natatória funcional (Chatain 1994a; Kitajima *et al.*, 1994) e o síndrome de *saddleback* (sela de cavalo), também observado em douradas de cativeiro não sendo considerado severo (Divanach *et al*., 1996). No presente estudo, apenas um peixe do grupo Controlo revelou uma lordose na região cefálica da coluna vertebral. Registaram-se algumas escolioses mas em número muito reduzido, principalmente no grupo 20/100. O síndrome de *saddleback* foi pouco evidente nos grupos 50/50 e Controlo e inexistente no grupo 20/100. As malformações cefálicas afectam a eficiência respiratória do peixe ao longo do seu crescimento e em dourada diminuem as suas taxas de sobrevivência e crescimento (Divanach *et al*., 1996). No presente estudo, foram os peixes da dieta 20/100 que revelaram maior quantidade de malformações nesta região e esta também pode ser uma justificação para os piores resultados de crescimento e sobrevivência obtidos para esta dieta.

Outras anomalias graves como a formação de uma barbatana dorsal adicional ou a duplicação de uma barbatana dorsal, não foram observadas no presente estudo, à semelhança do reportado por Divanach *et al*. (1996), no cultivo de dourada e robalo. Aos 42 DAE, observou-se que os peixes alimentados com o protocolo alimentar 20/100 apresentaram um número total de malformações significativamente menor do que o dos restantes protocolos, sendo o 50/50 o que teve maior número, embora sem diferença face ao Controlo. Contudo, estes resultados podem não ser comparáveis pois, segundo Faustino e Power (1998), o estádio de desenvolvimento da cartilagem e osso estava mais relacionado com o comprimento do peixe do que com a idade, embora o padrão geral de desenvolvimento não tenha variado entre as amostras. Esta evidência corrobora o obtido neste estudo, pois larvas com a mesma idade mas tamanhos desiguais (grupos Controlo e 50/50 com 15,2mm e 20/100 com 11,8mm, aos 42 DAE) mostraram graus de desenvolvimento esqueléticos bastante diferentes. Contudo, não se verificaram diferenças no que toca a estrutura do esqueleto destes peixes. As diferenças no número de malformações entre protocolos podem ser justificadas pelo facto de os peixes da dieta 20/100 serem consideravelmente mais pequenos que os restantes protocolos, o que impossibilitou a detecção de possíveis malformações por incerteza se certas estruturas estariam malformadas ou apenas em desenvolvimento. Assim, os resultados do grupo 20/100 podem estar subestimados, pelo que seria interessante, num ensaio futuro com condições semelhantes, analisar larvas com a mesma dieta numa idade mais avançada, e tentar perceber se realmente os copépodes não afectam a estrutura esquelética.

Actualmente existe uma quantidade considerável de literatura acerca das malformações existentes em peixes cultivados (revisto por Divanach *et al*., 1996), contudo, a causa e progressão de tais malformações são incertas (Faustino e Power, 1998). As causas mais significativas de anomalias osteológicas em peixes cultivados podem ser de origem epigenética ou genética (Boglione *et al*., 2001). Entre os primeiros destacam-se os factores ambientais abióticos, em particular, a temperatura, baixas concentrações de oxigénio, salinidade, dióxido de carbono e condições hidrodinâmicas inadequadas, e bióticos, tais como requerimentos nutricionais, manuseamento e infecções virais e bacterianas (Boglione *et al*., 2001; Divanach *et al*., 1996). As causas de origem genética, seja por mutação ou heritabilidade, são mais difíceis de demonstrar, especialmente tendo em conta a vasta variedade de espécies de peixes afectados (Divanach *et al*., 1996), no entanto evidências da heritabilidade como causa de certas anomalias genéticas foram já reportadas (Nelson, 1971; Gordon, 1954; Rosenthal e Rosenthal, 1950) e evidenciadas em algumas espécies como a

dourada japonesa (*Pagrus major*) (Taniguchi *et al*., 1984), salmão (*Salmo salar*) (McKay e Gjerde, 1986) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Mair, 1992).

De uma forma geral, conclui-se que a presença de copépodes não teve um efeito significativo no número de malformações esqueléticas de larvas de dourada. O protocolo alimentar 20/100 foi aquele que registou menor número de indivíduos mal formados e deste número as malformações mais frequentes foram as que não tinham efeito no fenótipo, ou seja, que não influenciavam o aspecto exterior ou a capacidade natatória. Em contraste, o grupo 50/50 apresentou o maior número de peixes malformados, sendo, 20% correspondentes a malformações graves com influência no fenótipo.

O desenvolvimento dos enzimas digestivos durante a ontogénese varia mais com a espécie e temperatura e não tanto com o alimenteo (Kolkovski, 2001). Porém, as alterações alimentares determinam o nível de actividade dos enzimas, pois os peixes são capazes de modular a sua actividade enzimática de acordo com alterações nas características do alimento (Guerreiro, *et al*., 2010; Cahu e Zambonino-Infante, 1994).

Na primeira alimentação, o sistema digestivo não é completamente funcional (Pradhan *et al*., 2012; Kolkovski, 2001; Govoni *et al*., 1986). Sem a diferenciação do estômago, um evento decisivo na nutrição larvar (Ribeiro *et al*., 2002; Martínez *et al*., 1999; Moyano *et al*., 1996; Sarasquete *et al*., 1993; Segner *et al*., 1993) a digestão do alimento acontece no intestino da larva da maior parte dos peixes onde o pH permanece alcalino (Yúfera e Darías, 2007; Kolkovski, 2001; Walford e Lam, 1993) e estão presentes os enzimas relacionados com a digestão de moléculas tais como proteínas, lípidos e glicogénio. As actividades destes enzimas tem sido observadas como sendo relativamente baixas quando comparada com os níveis de peixes adultos (Zambonino Infante *et al*., 2008; Kolkovski, 2001; Moyano *et al*., 1996; Sarasquete *et al*., 1993). Contudo, em dourada e noutros peixes, as actividades da fosfatase, tripsina e ATPase são observadas logo aos 3 ou 4 DAE e aminopeptidases estão presentes anteriormente à eclosão (Kolkovski, 2001; Kurokawa e Suzuki, 1998).

Cara *et al*. (2003), estudando a ontogenia dos enzimas digestivos do sargo (*Diplodus sargus*), observou um pico de actividade por volta dos 22 DAE. Segundo estes autores, este padrão pode indicar o início da digestão acídica, que é o terceiro passo da maturação das funções digestivas de uma larva, embora seja o menos relevante em comparação com os dois primeiros: aquisição de função secretória do pâncreas e o início da actividade dos enzimas da membrana do prato estriado, visto estes últimos também estarem envolvidos na digestão de proteínas (Gisbert *et al*., 2009).

A tripsina é um enzima pancreático especializado na degradação de péptidos em tamanhos mais pequenos (Guerreiro *et al*., 2010; Ronestad e Morais, 2008). Apresenta um valor baixo de actividade desde o início da alimentação exógena, que aumenta durante o desenvolvimento larvar (Zambonino Infante e Cahu, 1999; Sarasquete *et al*., 1993; Lauff e Hofer, 1984; Vu, 1983;). No presente estudo a actividade específica da tripsina aos 42 DAE é inferior à actividade registada aos 20 DAE, em todos os grupos com a excepção do 20/100, significativamente mais alta que os restantes. Esta diminuição pode ser explicada pelo aumento natural das proteínas nos tecidos das larvas em crescimento, reflectindo mudanças anatómicas e fisiológicas e não uma diminuição da quantidade de enzimas digestivos (Zambonino-Infante *et al*., 2008). Considerando que o protocolo 20/100 não segue este padrão, pode dizer-se que a alimentação de copépodes preservados pode levar a um atraso do aumento de proteínas nos tecidos larvares. Este resultado também pode ser explicado pelo menor crescimento dos peixes deste grupo aos 42 DAE, que conduz a uma menor deposição de proteína no peixes e, consequentemente a uma maior actividade específica da tripsina. Aos 20 DAE, os valores de actividade específica obtidos neste estudo são praticamente iguais entre protocolos alimentares e são semelhantes aos valores registados para a mesma idade no robalo branco (*Atractoscion nobilis*) (Galvaniz *et al*., 2011), apesar de ligeiras diferenças no comprimento total. Resultados semelhantes foram reportados para rodovalho (*Scophthalmus maximus*) (Cousin et al., 1987) e robalo (*Dicentrarchux labrax*) (Cahu e Zambonino-Infante, 1997). Contudo, estes autores reportaram uma actividade específica deste enzima aos 40 DAE igual à registada aos 20 DAE, o que não acontece neste estudo.

Os enzimas aminopeptidase e amilase, também presentes no início da alimentação exógena, complementam a digestão proteolítica e asseguram a digestão de gorduras e carbohidratos existentes na larva (Moyano *et al*., 1996; Sarasquete *et al*., 1993; Verreth *et al*., 1992; Segner *et al*., 1989; Lauff e Hofer, 1984).

A actividade específica da aminopeptidase foi muito semelhante entre os protocolos alimentares estudados em ambas as idades, sendo as larvas do 50/50 as que revelaram menor actividade. Os valores de actividade neste estudo aos 20 DAE foram muito inferiores ao reportado por Guerreiro *et al*. (2010) em sargo. No entanto, estes autores utilizaram a larva inteira enquanto neste estudo apenas se utilizaram os segmentos intestinais para as homogeneizações. Aos 42 DAE observou-se uma redução da actividade específica para valores quase indetectáveis. Este é um enzima intestinal e a sua actividade está relacionada com a capacidade digestiva intestinal (Martínez-Lagos *et al*., 2014; Castro *et al*., 2013; Guerreiro *et al*., 2010). Considerando a redução observada aos 42 DAE face à actividade aos

20 DAE, podia concluir-se que os copépodes conduziam a um atraso do desenvolvimento intestinal e maturação dos enterócitos, no entanto esta tendência também se verificou no protocolo Controlo.

A actividade da amilase é maior em larvas mais novas do que em mais velhas, exibindo um descréscimo gradual durante o desenvolvimento (Zambonino Infante *et al*., 2008; Ribeiro *et al*., 1999b; Zambonino Infante e Cahu, 1994). No presente estudo a actividade específica da amilase em ambas as idades foi muito semelhante entre os protocolos 50/50 e Controlo que diferem, não significativamente, do protocolo 20/100 que apresenta um valor maior aos 20 DAE e duas vezes superior aos 42 DAE. Alguns autores explicam a presença da amilase como um resultado da ingestão de Artémia e, consequentemente, uma alteração no padrão alimentar deve resultar numa importante redução da actividade deste enzima (Martínez *et al*., 1999; Cousin *et al*., 1987). Esta afirmação não está de acordo com o que foi observado neste estudo pois o protocolo alimentar sem Artémia foi aquele que apresentou maior actividade específica da amilase. No entanto, aos 42 DAE a actividade total do protocolo 20/100 é inferior em relação aos restantes, mas não é significativa. Outras razões podem explicar estes resultados como a independência da composição dietética no decréscimo da actividade da amilase durante o desenvolvimento larvar, proposta por Galvaniz *et al*. (2011) e Péres *et al*. (1996) ou a hipótese da regulação da actividade da amilase ser resultado de expressão genética programada, sugerida por vários autores (Guerreiro *et al*., 2010; Ma *et al*., 2001; Zambonino-Infante e Cahu, 2001; Douglas *et al*., 2000; Péres *et al*., 1996). Segundo Galvaniz *et al*. (2011), a actividade específica da amilase tem uma tendência oscilante a partir dos 16 DAE. Aos 20 DAE os autores registaram um valor para a actividade específica próximo dos resultados do presente ensaio, também inferior ao do protocolo 20/100 e aos 40 DAE, os valores de actividade específica reportados eram duas vezes superior aos obtidos neste estudo. Em contraste, Moyano *et al*. (1996) reportou valores inferiores aos do presente estudo para a actividade específica da amilase, principalmente comparando com o protocolo 20/100, superior ao dobro do obtido pelos autores, aos 20 DAE. A actividade total aos 20 DAE é inferior no presente estudo, sensivelmente metade, em todas as dietas, face ao reportado pelos autores. No entanto, este resultado é espectável pois Moyano *et al*. (1996) utilizaram a larva inteira e não apenas o segmento digestivo como foi efectuado no presente estudo. Aos 42 DAE, os valores de ambas as actividades deste estudo seguem a mesma tendência reportada pelos autores. Zambonino Infante *et al*. (2008) também determinaram os níveis da actividade específica deste enzima, que estão em concordância tanto em tendência como em valores com os obtidos neste ensaio.

As fosfatases são um grupo de enzimas envolvidas em processos de nutrição, mineralização, transporte intestinal e hidrólise de proteínas fosforiladas (Ribeiro *et al*., 2002; Martínez *et al*., 1999; Moyano *et al*., 1996; Letelier *et al*., 1985; Fraisse *et al*., 1981). As actividades tanto da fosfatase alcalina como ácida têm sido detectadas durante o desenvolvimento larvar em diferentes peixes marinhos (Martínez *et al*., 1999; Moyano *et al*., 1996; Zambonino e Cahu, 1994). No presente estudo, a actividade específica da fosfatase ácida dos peixes do protocolo 20/100 foi bastante semelhante ao Controlo em ambas as idades, sendo maior do que o valor de actividade para o Controlo aos 20 DAE e vice-versa aos 42 DAE. O protocolo alimentar 50/50 foi o que registou maior actividade específica aos 42 DAE, embora não significativa das restantes. Este enzima mostra uma diminuição da actividade específica ao longo do desenvolvimento. Esta redução pode ser resultado de uma maior actividade intestinal indicando o início da maturação do enterócitos e fim do recurso a processos de pinocitose, que noutros Sparidae perdura durante as primeiras três semanas de vida (Guerreiro *et al*., 2010). A actividade total foi quase igual entre protocolos aos 20 DAE e semelhante aos 42 DAE entre os grupos 50/50 e Controlo, com o grupo 20/100 a registar um valor muito reduzido face aos outros grupos, embora não significativo. Guerreiro *et al*. (2010) reportaram em sargo (*Diplodus sargus*) valores para as actividades específica e total da amilase muito superiores ao obtido neste estudo. Contudo, isto pode ser explicado pela utilização da larva inteira na determinação da actividade enzimática por estes autores, ao invés de apenas o segmento intestinal no presente estudo. Também, Moyano *et al*. (1996) reportaram valores de actividade específica e total da fosfatase ácida inferiores aos obtidos neste ensaio, no entanto a tendência é semelhante.

A fosfatase alcalina é um enzima intestinal envolvido na assimilação de nutrientes (Guerreiro *et al*., 2010). Neste estudo as actividades específicas foram praticamente iguais aos 20 DAE entre os diferentes protocolos. Aos 42 DAE as actividades específicas dos três protocolos foram significativamente diferentes entre si, sendo o protocolo 20/100 o que mais se destaca pela actividade quase duas vezes superior ao Controlo e superior ao dobro face ao grupo 50/50. Segundo Guerreiro *et al*. (2010) o aumento deste enzima durante o período larvar pode indicar uma melhoria da capacidade digestiva do intestino ao longo do desenvolvimento da larva. Pode dizer-se que os copépodes parecem favorecer a capacidade digestiva larvar. A tendência crescente do protocolo 20/100 foi concordante com o reportado por Suzer *et al*. (2007a) para (*Diplodus puntazo*), que mostrou um crescimento constante até aos 50 DAE. No entanto, em outras espécies o pico de actividade para este enzima foi encontrado mais cedo (Cara *et al*., 2003; Guerreiro *et al*., 2010; Gisbert *et al*., 2009). Moyano

et al. (1996) observaram o mesmo padrão para as actividades específica e total da fosfatase alcalina ao longo do desenvolvimento mas valores muito inferiores aos obtidos neste ensaio.

Neste ensaio observou-se que a actividade específica da fosfatase alcalina era muito superior à mesma actividade da fosfatase ácida, o que leva a crer que a digestão de macromoléculas na porção apical intestinal é favorecida, em detrimento de uma digestão citosólica (Moyano *et al*., 1996). Outros processos metabólicos e fisiológicos que ocorrem ao longo do desenvolvimento larvar podem influenciar, directa ou indirectamente o nível de actividade dos enzimas digestivos (Guerreiro *et al*., 2010). Por exemplo, as fosfatases ácida e alcalina, para além da importância das suas actividades nos processos digestivos, exibem actividades semelhantes noutros tecidos como o osso, concretamente na sua formação e mineralização (Guerreiro *et al*., 2010; Piattelli *et al*., 1997). Esta pode ser outra justificação para o aumento significativo da actividade específica da fosfatase alcalina aos 42 DAE do grupo 20/100 face aos restantes, visto nesta idade a estrutura esquelética das larvas deste grupo mostrar um desenvolvimento inferior em relação às outras larvas.

A actividade total dos enzimas digestivos aumentou com a idade para a maioria dos enzimas estudados, o que indica o aumento da capacidade digestiva da larva ao longo do desenvolvimento (Guerreiro *et al*., 2010). O único enzima que não seguiu esta tendência, nos três protocolos estudados, foi a aminopeptidase. Este resultado não está de acordo com o reportado por outros autores para diferentes espécies e não é considerado o padrão normal (Guerreiro *et al*., 2010; Ribeiro *et al*., 2008, 1999; Lazo *et al*., 2007; Suzer *et al*., 2007a). Diferentes taxas de desenvolvimento e/ou *performance* larvares podem estar na origem deste resultado.

Após análise dos enzimas digestivos neste ensaio, concluiu-se que não existiram diferenças na actividade enzimática dos peixes alimentados com copépodes preservados para a maior parte dos enzimas analisados. Apenas as actividades específicas da tripsina e fosfatase alcalina revelaram-se significativamente diferentes entre protocolos, sendo no grupo 20/100 onde se registaram os maiores valores de actividade. A presença de fosfatases, juntamente com a tripsina, permite que a larva consiga digerir proteínas, e absorver e transportar as macromoléculas através das membranas (Moyano *et al*., 1996). Assim, pode afirmar-se que os copépodes parecem favorecer a digestão, absorção e transporte de proteínas ao longo do desenvolvimento larvar.

Neste estudo também se destacou a ausência de diferenças no padrão de actividade enzimática das larvas co-alimentadas com copépodes preservado (grupo 50/50) face ao padrão das larvas Controlo. Assim, a inclusão deste alimento preservado acaba por ser uma forma de

economizar os gastos tão dispendiosos inerentes à produção e enriquecimento de Artémia. Este resultado enaltece o sucesso da co-alimentação de alimento vivo e inerte, observado desde os anos 90 (Piccinetti *et al*., 2014; Kolkovski, 2001; Kolkovski *et al*., 1997b; Rosenlund *et al*., 1997; Person-Le Ruyet *et al*., 1993). Uma possível explicação para os bons resultados da co-alimentação pode ser a contribuição dos enzimas digestivos provenientes do alimento vivo. Estes enzimas activam os enzimas digestivos endógenos das larvas e facilitam o processo de digestão até ao completo desenvolvimento e diferenciação do sistema alimentar larvar (Papadakis *et al*., 2009; Kolkovski, 2001; Dabrowski, 1984). Apesar da componente inerte utilizada no presente estudo não ser uma microdieta formulada mas sim zooplâncton preservado, podem existir ingredientes de ligação ou encapsuladores no método de preservação que dificultem a digestão desse zooplâncton por parte das larvas (Kolkovski, 2001). Adicionalmente, o alimento vivo contém neuropeptidos intestinais e factores de crescimento nutricionais que favorecem a digestão (Papadakis *et al*., 2009; Kolkovski, 2001). No entanto, alguns autores suportam a hipótese contrária de que a digestão do alimento em larvas de alguns peixes marinhos depende dos enzimas produzidas pela larva em vez daqueles fornecidos pelo alimento vivo (Martínez *et al*., 1999; Kurokawa *et al*., 1998)

O mecanismo básico do desenvolvimento organogénico e sistemático é semelhante em todos os teleósteos, mas existem diferenças inter-específicas consideráveis no que toca o momento da diferenciação, desenvolvimento e funcionalidade, principalmente no tracto digestivo, durante os primórdios da vida larvar (Zambonino Infante *et al*., 2008; Pradhan *et al*., 2012; Treviño *et al*., 2011).

O fígado é um órgão muito importante como um indicador do estado nutricional e fisiológico do peixe (Gatta *et al*., 2011; Hibiya, 1982; Segner e Juario, 1986), funcionando como o maior reservatório principal de energia em várias espécies como robalo e dourada (Kaushik, 1997). Neste estudo não se observaram diferenças na estrutura do fígado entre dietas, assim como a diminuição da quantidade e tamanho das zonas de reserva, o que está em conformidade com outros autores (Sarasquete *et al*., 1995, 1993).

Também não se detectaram alterações relevantes na organização histológica do intestino anterior e posterior, ao longo do desenvolvimento, com a excepção do número e tamanho das vilosidades da mucosa intestinal, que são em maior número e mais longas, aos 42 DAE (Sarasquete *et al*., 1995, 1993). Estes resultados são semelhantes aos de Pradhan *et al*. (2012), em larvas de peixe-gato (*Ompok bimaculatus*) alimentadas com copépodes.

O regime alimentar está directamente relacionado com a fisiologia digestiva da larva (Papadakis *et al*., 2009; Segner e Verreth, 1995), mas parece não influenciar o momento em

que os principais estádios ontogenéticos de desenvolvimento do sistema digestivo surgem, devido à ausência de diferenças significativas verificadas neste estudo, à semelhança de outras espécies (Papadakis *et al*., 2009). Estes autores também propõem existir controlo genético forte para a ontogénese do sistema digestivo larvar. Para além do conteúdo dietético, os factores ambientais têm sido reportados como importantes agentes da taxa ontogénica do sistema digestivo. Neles incluem-se a salinidade, pH, concentração de oxigénio, qualidade da água e, o mais importante de todos, a temperatura (Pradhan *et al*., 2012; Papadakis *et al*., 2009; Zambonino Infante *et al*., 2008; Kalmer, 2002), que no presente estudo foram parâmetros idênticos para todos os protocolos alimentares.

Tanto aos 20 como aos 42 DAE, observou-se que os copépodes em pouco ou nada influenciaram a organogénese, estrutura e número celular do sistema digestivo das larvas de dourada, com resultados bastante semelhantes aos da dieta Controlo. Notou-se uma clara evolução nas estruturas entre a primeira e a segunda idades analisadas em todos os protocolos alimentares estudados. No fígado observou-se uma redução das substâncias de reserva, o pâncreas aumentou de tamanho e em conteúdo proteico e no intestino aumentou o número e tamanho das vilosidades. Aos 42 DAE o estômago encontrava-se diferenciado, embora pouco perceptível visto a sua diferenciação só ter ocorrido dois dias antes desta análise (Moyano *et al*., 1996). Estes resultados reforçam a hipótese de que a presença de copépodes não atrasa o normal desenvolvimento do sistema digestivo larvar. Contudo, detectaram-se variações aparentes nos tamanhos dos órgãos dos peixes do grupo 20/100, em relação aos outros grupos. Esta observação foi significativa apenas para a espessura do epitélio intestinal da porção posterior aos 42 DAE, entre os grupos Controlo e 20/100. Isto pode ser explicado pelo menor crescimento obtido para os peixes do grupo 20/100, mais evidente nesta idade, pois como os peixes são mais pequenos, os seus órgãos também o são. Outros autores associaram o menor crescimento em larvas sujeitas a um regime alimentar com rotíferos e alimento inerte sem artémia a um período de fome (Papadakis *et al*., 2009). O intestino e fígado são os primeiros órgãos a reflectir condições de fome, devido a processos autolíticos (O'Connel e Paloma, 1981), mas outros órgãos do tracto digestivo também evidenciam grave danificação dos tecidos, quando os peixes passam fome (Kjorsvik *et al*., 1991). Em dourada, a privação de alimento afecta o fígado reduzindo as suas substâncias de reserva e influencia o tamanho nuclear dos hepatócitos (Powel *et al*., 2000). Tendo em conta a informação reportada por estes autores, podia-se colocar a hipótese dos peixes alimentados com o protocolo 20/100 terem passado por um período de fome. Contudo, esta suposição desaparece quando não se observam qualquer das patologias associadas a privação de alimento em dourada. Pode

concluir-se que não houve influência do produto experimental preservado na qualidade do sistema digestivo, pelo que as larvas não estão mal nutridas nem atrasadas quanto ao seu desenvolvimento normal.

Os peixes em aquacultura estão frequentemente expostos a uma gama de factores durante o cultivo que podem induzir um *stress* agudo ou crónico (Piccinetti *et al*., 2014; Koven *et al*., 2003, 2001; Tanaka *et al*., 1995).

Um dos indicadores de *stress* mais utilizado em vertebrados é a concentração do principal corticosteroide, o cortisol (hidrocortisona) (Piccinetti *et al*., 2014; Tort *et al*., 2001; Mommsen *et al*., 1999). A razão pela qual é muito utilizado prende-se com a facilidade de análise, ou seja, pode ser facilmente determinado por diversos métodos, um deles os *kits* de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), também aplicado neste ensaio para as amostras de dourada (Mommsen *et al*., 1999). Contudo, existem inconsistências na literatura relativamente à importância do cortisol como indicador do nível de *stress* em peixes. Muitas delas são devidas a diferenças entre espécies, métodos de determinação e amostragem e condições nutricionais (Mommsen *et al*., 1999; Reddy *et al*., 1995; Vijayan e Moon, 1994; Iwama *et al*., 1989).

No presente estudo verificou-se que todos os peixes amostrados não resistiram após a realização do teste de *stress*. Este resultado pode ser melhor explicado pela elevada sensibilidade e fraca resistência, característica desta fase, a qualquer elemento perturbador, do que por influência do alimento. Os níveis de cortisol obtidos para a dourada neste ensaio foram superiores nas duas dietas alimentadas com copépodes face ao controlo. No entanto, os resultados referentes à dieta 20/100 são pouco suportados pela amostra de apenas um tanque. Os mesmos resultados foram obtidos por Piccinetti *et al*. (20014), sugerindo que as larvas alimentadas com copépodes conseguiriam responder melhor às consequências causadas pela indução de *stress* agudo, apesar dos elementos causadores de *stress* aplicados serem o aumento de temperatura e da densidade e não a exposição ao ar, como no presente estudo. Os mesmos autores referem que os copépodes marinhos podem estar envolvidos no aumento da tolerância e resposta ao *stress* devido à sua composição nutricional. Comparando com os resultados apresentados por Koven *et al*. (2003), que mostram um aumento do nível de cortisol em larvas alimentadas com quantidades crescentes de ARA (ácido araquidónico), pode-se inferir que os resultados do presente estudo para as larvas alimentadas com copépodes são espectáveis visto os copépodes serem um alimento rico em ARA (Støttrup e Jensen, 1990; Ajiboye *et al*., 2011). Contudo, o *stress* considerado por estes autores foi a transferência de larvas para outros tanques, que difere do método de exposição ao ar. De

acordo com vários autores (Van Anholt *et al*., 2004; Koven *et al*., 2001; Tanaka *et al*., 1995), pode-se dizer que o ARA dietético melhora a resistência ao *stress* em larvas de dourada, principalmente durante as fases mais sensíveis de metamorfose.

Van Anholt *et al.* (2004) realizaram um teste de *stress* bastante semelhante ao do presente estudo e os resultados de cortisol reportados, imediatamente após o teste, foram superiores aos do presente estudo. Apesar das larvas utilizadas pelos autores serem mais velhas (50 DAE), logo com maior peso, o que pode ser um factor importante, este resultado não era espectável pois os mesmos autores determinaram que larvas mais novas (28 DAE) eram mais sensíveis a distúrbios pela indução aguda de *stress*. Outro aspecto importante a retirar do trabalho destes autores é o aumento dos níveis de cortisol maioritariamente 20 minutos após e não imediatamente após a indução do factor de *stress*, como foi realizado no presente estudo. Este resultado pode explicar a pouca diferença que existe entre os valores iniciais e finais de cortisol registados neste ensaio e também o porquê de não haver diferenças significativas entre esses valores ou entre dietas. No entanto, o que se pode afirmar é que a inclusão de copépodes não teve qualquer efeito negativo na resistência ao *stress*.

Introdução de copépodes preservados como ingrediente na formulação de dietas inertes no cultivo juvenil de linguado

Neste ensaio os resultados de peso húmido e comprimento total dos linguados alimentados com ambas as dietas seguiram a mesma tendência crescente ao longo do ensaio, apesar dos valores superiores nos peixes da dieta Controlo face aos peixes da dieta com copépodes. O peso húmido dos linguados do grupo Controlo deste ensaio foi superior ao reportado por Ribeiro *et al*. (2002) (sendo os dados referentes ao comprimento total análogos) e semelhante aos obtidos por outros autores (Dinis *et al*., 2000; Esteban *et al*.,1995; Rodriguez *et al*., 1995). Segundo Dinis *et al*. (2000), elevadas mortalidades em linguado são comuns e relacionadas com vários factores como parâmetros ambientais, condições inadequadas nos sistemas de cultivo devido á transição súbita para um comportamento bentónico, deficiências no estado nutricional larvar ou eventual fraca qualidade dos ovos. No entanto, no presente ensaio, a sobrevivência foi muito superior ao reportado por estes autores e outros (Ribeiro *et al*., 2002).

Existe pouca informação relativa a peixes planos no mesmo intervalo de idade e peso húmido utilizado neste estudo, alimentados com dietas inertes. Os resultados publicados estão

mais focados no período larvar (Boglino *et al*., 2012; Engrola, 2008; Fernández-Díaz *et al*., 2006; Cañavante e Fernández-Díaz, 1999; Martínez *et al*., 1999; Ribeiro *et al*., 1999a, b), no período juvenil mas com peso superior a 1g (Pérez-Jiménez *et al*., 2014; Borges *et al*., 2009) ou de pré-engorda/engorda (Gomes, 2012; Castelo Branco *et al*., 2006; Castelo Branco, 2003). Contudo, algumas das diferenças nos ritmos de crescimento podem dever-se maioritariamente a diferenças de temperatura do que a deficiências dietéticas pois a temperatura considerada óptima para o bom desenvolvimento do linguado é geralmente superior (> 23-25^{o}C) (Fonde e Saksena, 1977; Branco *et* al., 2006) ao habitualmente registado em cultivos semelhantes ao do presente estudo.

Apesar do menor crescimento dos peixes alimentados com copépodes, as diferenças entre dietas só foram significativas nos últimos pontos de amostragem para o comprimento total e peso húmido. Estes resultados podem estar relacionados com a habituação ao anterior regime alimentar, desconhecido, a que estes linguados foram sujeitos aquando das principais etapas de crescimento e metamorfose. Adicionalmente, a inclusão dos copépodes preservados foi baixa (10%), devido a dificuldades técnicas na formulaçãa da dieta inerte com maior percentagem deste produto. Apesar da elevada qualidade dos copépodes, esta pequena percentagem pode não ter sido suficiente para suplementar a diminuição da inclusão de outros componentes constituintes da dieta.

O índice de condição (IC) representa a saúde geral de um peixe e, no linguado, é o parâmetro que mostra mais homogeneidade entre as dietas. No início do ensaio, os juvenis apresentavam um IC inferior a 1, ou seja, os peixes tinham um peso inferior ao normal esperado para aquele comprimento. Esta situação mudou ao longo do ensaio, onde os IC obtidos passaram a ser superiores a 1 até ao final do ensaio, ou seja, os linguados estavam a engordar mais do que a crescer em comprimento. Em conclusão, os linguados, no início do ensaio, estavam a ingerir menor quantidade de alimento em comparação com a porção necessária para obter a energia requerida para viver, movimentar-se e realizar outras actividades, enquanto no final do ensaio, passaram a ingerir mais energia que aquela realmente exigida para realizarem as suas actividades. Esta alteração nos valores de IC com o decorrer do ensaio pode indicar que se administrou mais quantidade que aquela realmente precisa para o crescimento saudável do linguado. No entanto não houve evidências de tal ter ocorrido pelos constantes acertos na quantidade de ração administrada efectuados a cada 10 dias ao longo do ensaio.

Muitas espécies de peixes, principalmente peixes planos, podem desenvolver anomalias na sua pigmentação tanto no estado selvagem (Honma, 1990; Gartner, 1986) como

em cativeiro (Dedi *et al*., 1995; Dickey-Collas, 1993). Estas anomalias revelam-se normalmente na forma de albinismo e ambicoloração (Divanach *et al*., 1996). Neste ensaio apenas se verificaram ocorrências de albinismo com uma média de 3% e de ambicoloração inferior a 1%, em ambas as dietas. Cinzento claro é a cor com maior percentagem em ambas as dietas, no entanto, a cor exacta segundo a bibliografia (Castelo Branco e Ramos, 1998) é o cinzento acastanhado. Esta ligeira diferença pode ser explicada pelo facto do linguado cultivado tentar adaptar a sua cor de pele àquela do tanque ou substrato (Reig *et al*., 2010) e o azul dos tanques de cultivo ser mais claro que muitos substratos naturais. As anomalias mais frequentes são os pequenos desvios em relação à pigmentação *standard* no estado selvagem, que são na generalidade reversíveis (Divanach *et al*., 1996). Normalmente, estas são resultado de condições de cultivo inapropriadas, factores ambientais, ou manipulação pós-colheita especial (uso de água fria e/ou de gelo), mas, se pouco intensas, acabam por não ser limitantes para o cultivo (Dinis *et al*., 1999) nem ter um efeito significativo no valor de mercado (Divanach *et al*., 1996). No cultivo de outras espécies de peixes planos como linguado comum (*Solea vulgaris*), rodovalho (*Psetta maxima*) (Lebegue, 1982) e alabote (*Paralychtys olivaceus*) (Seikai e Matsumoto, 1994) também são frequentes anomalias na pigmentação.

Para além do aspecto exterior, a pigmentação é uma característica que também afecta o crescimento (Reig *et al*., 2010). Esta relação não foi evidente neste estudo pois os peixes de ambas as dietas não mostraram diferenças na sua pigmentação que justificassem o menor crescimento dos peixes da dieta com copépodes. No entanto, a influência da pigmentação no crescimento tem sido demonstrada tanto em peixes planos (Yamamone et al., 2005) como noutras espécies (Papoutsoglou *et al*., 2005, 2000), onde peixes cultivados em tanques com cores claras apresentam um aumento no seu crescimento somático (Yamamone et al., 2005).

Sergner *et al*., 1995 considera que os peixes chatos são um grupo interessante dado que tanto as alterações anatómicas e fisiológicas (ocorridas no estádio larvar) são comparativamente mais dramáticas que aquelas que acontecem noutras espécies marinhas, e que apresentam um efeito mais significativo na actividade dos diferentes enzimas (Martínez *et al*., 1999). Ribeiro *et al*. (1999b) reportaram, em larvas de linguado, um padrão característico de animais em desenvolvimento que consiste no aumento da actividade enzimática durante os primeiros 10 DAE, seguindo-se um decréscimo. O padrão de desenvolvimento dos principais enzimas digestivos encontrados neste peixe é similar ao descrito para outras espécies de peixes planos (Martínez *et al*., 1999).

No presente estudo não se observaram diferenças significativas entre as dietas para nenhuma das actividades de nenhum dos enzimas analisados. Este resultado pode justificar-se

pelo facto de o linguado adquirir um modo de digestão adulta no final do desmame, como foi sugerido por Hamza *et al*. (2007) e reportado por Engrola *et al*. (2009) e, como tal, aos 136 DAE já ser capaz de processar todos os componentes de uma ração inerte. É também importante realçar que os linguados utilizados neste estudo tinham 74 DAE aquando do início do ensaio, o que significa que a maioria dos principais marcos de desenvolvimento tinham já sido atingidos (Ribeiro *et al*., 1999a) e que as principais diferenças entre as duas dietas testadas neste ensaio são relativas ao crescimento, à semelhança dos resultados de outros estudos (Ribeiro *et al*., 2002).

Os peixes alimentados com copépodes apresentaram uma actividade específica da tripsina ligeiramente superior à dos peixes do grupo controlo. Isto pode ser explicado pelo conteúdo proteico superior da dieta Copépodes, que conduz a níveis de actividade específica da tripsina mais elevados (Ribeiro *et al*., 2002; Tseng *et al*., 1982).

A aminopeptidase é um enzima associado ao desenvolvimento específico do prato estriado intestinal (Kolkovski, 2001). Tanto na análise ao segmento intestinal como após purificação do prato estriado, as actividades estudadas não mostraram diferenças entre dietas. Estes dados reforçam que a introdução de copépodes não afecta a digestão e absorção correctas de nutrientes, existente nos linguados a partir dos 31 DAE (Yúfera e Darías, 2007; Ribeiro *et al*., 1999b) pela presença de um tracto digestivo morfologicamente completo.

Castro *et al*. (2013) estudaram a actividade específica da amilase em juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) e sargo (*Diplodus sargus*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes percentagens de levedura de cerveja. Os resultados foram bastante inferiores face aos obtidos neste ensaio, apesar das quantidades de proteína e gordura brutas dietéticas serem inferiores às deste estudo assim como o *pool* de secções intestinais utilizado. Contudo, à semelhança do observado para o linguado neste ensaio, não se observaram diferenças entre dietas para ambas as espécies.

Os linguados alimentados com copépodes tiveram maior actividade específica mas menor actividade total do enzima fosfatase ácida, embora não significativas. Mais uma vez os copépodes não interferem com os processos de transformação de proteínas fosforiladas relativos a este enzima.

O aumento da actividade da fosfatase alcalina no intestino normalmente ocorre durante o desenvolvimento larvar e pós-larvar (Ribeiro *et al*., 1999b; Cahu e Zambonino Infante, 1994) e corresponde ao processo maturacional dos enterócitos e estabelecimento de uma digestão eficiente ao nível da membrana do prato estriado (Ribeiro *et al*., 2002; Martínez *et al*., 1999). Este enzima suporta o papel absortivo das células epiteliais (Grau *et al*., 1992).

Ribeiro *et al*. (2002) afirmam que a presença de maior actividade da fosfatase alcalina nos linguados sugere que estes peixes estão em melhor estado nutricional e de desenvolvimento. Embora não se detectem variações significativas, os linguados alimentados com copépodes têm sempre um valor de actividade específica superior. Assim, conclui-se que a inclusão de copépodes no alimento favoreceu a qualidade dos linguados, face à dieta Controlo. Os mesmos autores reportaram a mesma tendência encontrada neste ensaio para a actividade específica da fosfatase alcalina entre a amostra do homogenado (menor) e o prato estriado (maior).

Com este estudo concluiu-se que a introdução de copépodes preservados não altera em nada a fisiologia digestiva do juvenil de linguado, podendo até favorecer, face a uma dieta comercial.

É durante a fase juvenil que vários factores se combinam para reduzir o potencial de crescimento e, consequentemente, o potencial para a actividade comercial de cultivo. Nestes factores incluem-se o comportamento alimentar, susteptibilidade a doenças e as densidades de *stock* (Borges *et al*., 2009; Rubio *et al*., 2009; Imsland *et al*., 2003). No caso do linguado, a alimentação e nutrição são pontos considerados particularmente críticos para um bom desenvolvimento (Gatta *et al*., 2011; Yúfera e Darías, 2007). Além destes, a morfologia digestiva peculiar, com um estômago relativamente pequeno sem cecos pilóricos e um intestino longo, também podem limitar o crescimento (Gatta *et al*., 2011).

À semelhança do já referido para a dourada, no linguado o fígado também é um órgão essencial como indicador de qualidade e como armazenamento de energia. Segundo (Gatta *et al*., 2011), pode-se afirmar que os fígados dos linguados analisados neste estudo são considerados normais pela ausência de gotas lipídicas intracitoplasmáticas nos hepatócitos (esteatose), ou seja, não são fígados gordos quer na presença ou ausência de copépodes. Alterações e patologias no fígado podem ser causadas por vários factores nutricionais (Caballero *et al*., 2004,1999; Tacon, 1994), como desequilíbrios dos lípidos (Bautista e De La Cruz, 1988; Watanable *et al*., 1989) e ácidos gordos dietéticos (Caballero *et al*., 2004). Considerando que nenhuma patologia foi encontrada nos linguados alimentados com copépodes e que não se verifica esteatose pela porção de gordura bruta ser praticamente a mesma em ambas as dietas, pode-se concluir que existe um bom balanço entre as porções de ácidos gordos assim como de lípidos e que os copépodes não diminuem ou empobrecem a qualidade deste órgão.

O mesmo se observou na análise ao estômago e intestino. O estômago apresentou-se estruturalmente semelhante ao reportado por Arellano *et al*. (2001), embora em peixes

adultos. Os intestinos analisados neste ensaio mostraram-se normais e sem diferenças entre dietas experimentais, à semelhança do obtido para a aparência morfológica do intestino dos juvenis de linguado do Egipto (*Solea aegyptiaca*) (Bonaldo *et al*., 2006), alabote do Atlântico (Grisdale-Helland *et al*., 2002) e peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) (Evans *et al*., 2005) em ensaios de nutrição.

Assim, pela análise dos cortes histológicos percebe-se que a inclusão de copépodes na dieta do juvenil de linguado não afectou a organogénese e a estrutura do sistema digestivo de linguado. Os órgãos analisados mostraram-se bastante semelhantes entre todos os peixes com a excepção do tamanho, que aparentava ser inferior nos juvenis da dieta Copépodes. Esta suposição é com certeza justificada pelo peso húmido e comprimento total inferiores destes peixes relativamente aos peixes da dieta Controlo. Isto significa que a razão mais provável para a existência de órgãos mais pequenos volta a ser a influência dos copépodes na biometria dos juvenis e não no desenvolvimento. Diferenças no tamanho também foram reportadas por outros autores como explicação para variações entre resultados (Bonaldo *et al*., 2006).

Todavia a medição do epitélio intestinal e a determinação do número de hepatócitos, por extrapolação, realizadas no presente estudo vêm contrariar estas suposições, visto não existirem diferenças entre as duas dietas nestas análises, o que prova a igualdade da qualidade destes órgãos nas duas dietas.

À semelhança do já descrito para os estádios larvares, os juvenis dos peixes de aquacultura estão sujeitos a *stress*. Os factores causadores de *stress* estão maioritariamente relacionados com as condições de cultivo, tais como manuseamento, transporte, densidade, vacinação e alterações de temperatura. Estes factores induzem alterações fisiológicas nos organismos dos peixes, como resposta ao *stress* imposto, e podem limitar o seu bom desempenho (Costas *et al*., 2011; Aragão *et al*., 2008; Koven *et al*., 2003; Shreck, 1982).

A ausência de mortos, em ambas as dietas, após o teste de *stress* realizado no linguado pode ser explicada por este ser um peixe resistente ao *stress* em termos de sobrevivência (Aragão *et al*., 2008). Além disso, e à semelhança do já referido para a dourada, parece que os níveis de cortisol são mais evidentes ou detectáveis ao fim de algum tempo após a indução de *stress*, ao passo que neste ensaio os peixes foram recolhidos imediatamente após o teste.

Apesar de existirem vários estudos acerca da determinação de *stress* em peixes (Mommsen, 1999), poucos são os que se referem a *stress* pontual devido a manuseamento. No linguado, há estudos de *stress* causado: por dois agentes (diferentes densidades de cultivo seguidas por diferentes salinidades) (Wunderink *et al*., 2011; Arjona *et al*., 2008); elevadas densidades de cultivo (Salas-Leiton *et al*., 2010; Costas *et al*., 2008); desafios osmóticos

(Aragão *et al*., 2010; Arjona *et al*., 2009,2007) e temperatura (Arjona *et al*., 2010), quando comparados com peixes Controlo. Aragão *et al*. (2008) e Silva *et al*. (2010) elaboraram ensaios de indução de *stress* por manuseamento, semelhantes ao realizado no presente estudo, mas o primeiro consistiu na indução repetitiva ao longo de um período de tempo em dois tratamentos, sendo um deles o Controlo sem qualquer indução de *stress*, e o segundo ensaio incidiu na determinação de *stress* individual de peixes alimentados com a mesma dieta.

O *Stress* é um processo de grande necessidade energética que aumenta a taxa metabólica e consumo de oxigénio no peixe (Van Anholt *et al*., 2004; Koven *et al*., 2003; Barton *et al*., 1987; Mommsen, 1986). Os peixes da dieta Copépodes apresentaram um valor de cortisol sensivelmente duas vezes superior ao resultado da dieta Controlo, mas não significativo, apesar da elevada variabilidade que se registou nesta dieta. Como a dieta Copépodes tem aproximadamente mais 1% de energia bruta, esta pode ter originado uma maior produção de cortisol e assim justificar o aumento de cortisol face aos peixes do grupo Controlo. Apesar de tudo, é importante realçar que o cortisol está sempre presente nos vertebrados, até em condições sem *stress*, com papéis de manutenção do organismo ("housekeeping roles") (Mommsen *et al*., 1999). Além disto, um aumento agudo dos níveis de cortisol podem alertar o sistema imunitário para a preparação de possíveis consequências de um factor de *stress* e assim funcionar como uma função adaptativa (Costas *et al*., 2011; Verburg-van Kemenade *et al*., 2009; Koven *et al*., 2003; Wendelaar Bonga, 1997). Assim, a introdução de copépodes preservados pode actuar como prevenção contra possíveis ataques, sendo de extrema importância principalmente durante o período de crescimento e engorda onde as condições de *stress* tendem a reduzir a homeostase imunológica e a aumentar a possibilidade de patologias durante o cultivo (Piccinetti *et al*., 2014).

Considerações finais

Os copépodes preservados revelaram ser um alimento adequado para ambas as espécies. Apesar das larvas de dourada e dos juvenis de linguado, sujeitos a uma dieta com copépodes preservados, apresentarem crescimentos e pesos inferiores aos dos peixes alimentados com uma dieta habitual para cada fase de desenvolvimento, de uma forma geral, a qualidade de ambas as espécies foi semelhante para todos os protocolos alimentares estudados.

Nas larvas de dourada um dos principais motivos que podem estar na origem de resultados pouco positivos é o facto de os copépodes preservados não terem movimento e afundarem mais rapidamente do que o alimento vivo, podendo não dar oportunidade à larva de o capturar. Apesar da composição nutricional deste alimento ser a indicada esta pode perder-se, aquando da lavagem antes da administração no tanque, ou simplesmente durante o trajecto desde a superfície até ao fundo, caso a direcção do fluxo de ar não seja a adequada. Todavia esta é uma questão complicada de resolver pois é necessário um fluxo praticamente inexistente nos períodos iniciais da vida larvar, mas que acaba por conduzir ao afundamento mais rápido do alimento inerte.

Poderá ser necessária a introdução de qualquer tipo de atractante (visual ou olfactivo) que permita uma melhor detecção por parte das larvas ou que as estimule na caça ao alimento. Seria interessante, também, no futuro, estudar esta possibilidade num ensaio semelhante.

Os resultados subóptimos ou indiferentes obtidos para o crescimento de juvenis de linguado alimentados com copépodes podem ter várias razões. Uma delas pode ser o facto de a dieta formulada não ser a adequada, pois é necessária a formulação de uma dieta que seja especificamente desenhada para a complementação da fisiologia digestiva dos peixes marinhos. Pode ainda dar-se o caso de a inclusão de apenas 10% de copépodes ser muito redutora para a confirmação dos resultados biométricos e de haver dificuldade por parte dos peixes na digestão de possíveis partículas rígidas ou restos de cistos acoplados aos copépodes no momento da apanha no meio natural. Apesar das dificuldades técnicas na formulação de uma dieta com maior quantidade de copépodes preservados seria interessante realizar um estudo semelhante ao presente e testar várias percentagens de inclusão de copépodes preservados na dieta para avaliação de diferenças.

Outro factor poderá centrar-se nas características físicas da dieta administrada. Quando em contacto com a água notava-se que as partículas se mantinham bastante tempo em flutuação, o que pode levar a efeitos de lixiviação, perdendo-se qualidade ou qualquer

elemento atractivo, até afundar e entrar em contacto com os linguados. Notou-se, também, que a ração quando era misturada previamente em água, para acelerar a chegada ao fundo, se espalhava igualmente de forma rápida e uniforme pelo tanque, sem afundar mais depressa. Quando as partículas assentavam no fundo do tanque, detectou-se um efeito contrário, pois estas tinham tendência para se aglomerarem perto da difusora de ar de onde, normalmente, os linguados se mantinham mais afastados. Tendo em conta que os linguados apresentam um comportamento passivo face ao alimento, isto pode ter um efeito negativo numa captura e alimentação com sucesso.

Com este trabalho pode-se concluir que os copépodes são um bom substituto parcial em protocolos alimentares larvares e um bom aditivo para dietas inertes. Adicionalmente é um alimento que tem a vantagem de diminuir as necessidades e custos de produção de uma cadeia alimentar, tornando-se um produto rentável, pois embora não possa substituir na totalidade a alimentação larvar é um substituto que suporta a sobrevivência e necessidades nutricionais da larva.

Contudo, são imprescindíveis melhoramentos neste produto preservado de forma a que a sua utilização possa ser ainda mais rentável e proveitosa para a nutrição piscícola. Os requerimentos precisos para uma correcta administração e preservação são questões a resolver e melhorar no futuro para uma manipulação menos morosa e mais facilitada, com rumo a uma produção sustentável e de qualidade.

5. *Referências*

Administração da Região Hidrográfica do Centro I.P., Junho de 2012. Plano de Gestão das Bacias Hidrográficas dos rios Vouga, Mondego e Lis Integradas na Região Hidrográfica 4 – Sector da Pesca, Aquicultura e Portos, Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território.

Ajiboye, O.O., Yakubu, A.F., Adams, T.E., Olaji, E.D., Nwogu, N.A. 2011. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 21(2), 225-246.

Andrades, J.A., Becerra, J., Fernandez-Llebrez, P. 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture, 141:1-11.

Aragão, C., Conceição, L.E.C., Fyhn, H.S., Dinis, M.T. 2004. Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different lifestyles: Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture 242:589–605.

Aragão, C., Corte-Real, J., Costas, B., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. 2008. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup 1758. Amino Acids 34, 143–148.

Aragão, C., Costas, B., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Dinis, M.T., Mancera, J.M., Conceição, L.E.C. 2010. Changes in plasma amino acid levels in a euryhaline fish exposed to different environmental salinities. Amino Acids 38, 311–317.

Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. 2001. Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. Histology and Histopathology 16:511-521.

Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. 2002. Ultrastructural study on the intestine of Senegal sole, *Solea senegalensis*. Journal of Applied Ichthyology, 18(3), 154-158.

Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Martín del Río, M. P., Flik, G., Mancera, J. M., Klaren, P. H. M. 2008. The involvement of thyroid hormones and cortisol in the osmotic acclimation of *Solea senegalensis*. General and comparative endocrinology, 155(3), 796-803.

Arjona, F.J., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Martín del Río, M.P., Flik, G., Mancera, J.M., Klaren, P.H.M. 2010. Acclimation of *Solea senegalensis* to different ambient temperatures: implications for thyroidal status and osmoregulation. Mar. Biol. 157, 1325–1335.

Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. 2009. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. Aquaculture 287, 419–426.

Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. 2007. Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. Comp. Biochem. Physiol. 148A, 413–421.

Bagarinao, T., Kungvankij, P. 1986. An incidence of swimbladder stress syndrome in hatchery-reared sea bass (*Latescalcarifer*) larvae in the Phillipines. Aquaculture 51:181-188.

Baglole, C. J., Murray, H. M., Goff, G. P. Wright, G. M. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology* 51, 120–134.

Barahona-Fernandes, M.H. 1982. Body deformation in hatchery reared European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Types, prevalence and effect on fish survival. J. Fish Biol. 21, 239–249.

Barton, B.A., Schreck, C.B., Barton, L.D. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress response in juvenile rainbow trout. Dis Aquat Org 2: 173–185.

Bautista, M.N., De la Cruz, M.C. 1988. Linoleic (ω6) and linolenic (ω3). acids in the diet of fingerling milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). Aquaculture 71, 347–358.

Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R. 2003. Optimizing lipid nutrition in first feeding flatfish larvae. Aquaculture 227:211–220.

Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J. 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimetres of serum. J. Biol. Chem. 164, 321–329.

Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Fernández-Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead seabream (Sparus aurata L.) larvae. Aquaculture 179, 265–275.

Boglino, A., Darias, M. J., Ortiz-Delgado, J. B., Özcan, F., Estévez, A., Andree, K. B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Gisbert, E. 2012. Commercial products for *Artemia* enrichment affect growth performance, digestive system maturation, ossification and incidence of skeletal deformities in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture, 324, 290-302.

Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M., Cataudella, S. 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). Aquaculture, 192(1), 1-22.

Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., De Marzi, P., Cataudella, S. 2009. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. Aquaculture, 291(1), 48-60.

Bolker, J.A., Hill, C.R. 2000. Pigmentation development in hatchery - reared flatfishes. J. Fish Biol. 56, 1029-1052.

Bonaldo, A., Roem, A.J., Pecchini, A., Grilli, E., Gatta, P.P. 2006. Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology of Egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles. Aquaculture, 261(2), 580-586.

Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceição, L., Valente, L. M. 2009. Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. British journal of nutrition, 102(07), 1007-1014.

Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Fernández, A. J., Rosenlund, G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. Journal of Fish Diseases, 27(9), 531-541.

Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S., Férnandez, A. J. 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 179(1), 277-290.

Cahu, C., Zambonino-Infante, J., Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture 227, 245–258.

Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? Aquaculture International 5, 151 160.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200, 161– 180.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 109, 213–222.

Cañavate, J. P., Fernández-Dıaz, C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. Aquaculture, 174(3), 255-263.

Cara, J. B., Moyano, F. J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. Journal of Fish Biology, 63(1), 48-58.

Castelo Branco, M. A., Moura, O., Gamito, S. 2006. Growth and survival of post-larvae of sole (*Solea senegalensis*) in net cages at the bottom of earthen ponds. Aquaculture, 259(1), 278-282.

Castelo Branco, M. A., Moura, O., Gamito, S. 2006. Growth and survival of post-larvae of sole (Solea senegalensis) in net cages at the bottom of earthen ponds, Aquaculture, Volume 259, Issues 1-4, 8 September 2006, Pages 278-282.

Castelo Branco, M.A., Ramos, M.A. 1998. Crescimento de pós-larvas de linguado-branco (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) em pisciculturas do estuário do Sado. Divulgação Ipimar, Nº 4.

Castelo Branco, M.A. 2003. Estudo da produção de linguado (*Solea senegalensis* KAUP, 1858) em tanques de terra. Trabalho apresentado ao IPIMAR no âmbito das Provas Publicas de acesso a Categoria de Investigador auxiliar da Carreira de Investigação Científica. Ipimar, Portugal. 180 pp.

Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Coutinho, F., Pousão-Ferreira, P., Brandão, T. M., Oliva-Teles, A., Peres, H. 2013. Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewer's spent yeast supplementation. Aquaculture, 416, 322-327.

Cataldi, E., Cataudella, S., Monaco, G., Rossi, A., Tancioni, L. 1987. A study of the digestive tract of sea-bream, *Sparus aurata*. J. Fish Biol. 30, 135– 145.

Chatain, B., Dewavrin, G. 1989. Influence des anomalies de développement de la vessie natatoire sur la mortalité de *Dicentrarchus labrax* au cours du sevrage. Aquaculture, 78(1), 55-61.

Chatain, B. 1987. La vessie natatoire chez *Dicentrachus labrax* et *Sparus aurata*. II. Influence des anomalies de développement sur la croissance de la larve. Aquaculture, 65: 175- 181.

Chatain, B. 1994a. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrachus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 97: 169-180.

Chatain, B. 1994b. In: Kestemont, P., Muir, J., Sevila, F., Williot, P. _Eds.., Quality Assessment of Marine Fish Larvae and Juveniles. Cemagref, Edition.

Chatain, B. 1994c. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*D. labrax*). and sea bream (*S. aurata*). Aquaculture 119, 371–379.

Conceição, L.E.C., Aragão, C., Richard, N., Engrola, S., Gavaia, P., Mira, S., Dias, J. 2009. Novel methodologies in marine fish larval nutrition. Fish Physiol Biochem 36:1–16.

Conceição, L.E.C., Grasdalen, H., Rønnestad, I. 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. Aquaculture 227:221–232.

Conceição, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F., Dinis, M.T. 2007. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture 268, 64-81.

Conceição, L.E.C., Van der Meeren, T., Verreth, J.A.J., Evjen, M.S., Houlihan, D.F., Fyhn, H.J. 1997. Amino acid metabolism and protein turnover in larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed natural zooplankton or *Artemia*. Mar Biol 129:255–265.

Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. Aquac. Res. 39, 1–9.

Costas, B., Conceição, L. E., Aragão, C., Martos, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., Afonso, A. 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. Aquaculture, 316(1), 68-76.

Cousin, J.B.C., Baudin-Laurencin, F., Gabaudan, J. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, Scophthalmus maximus L. Journal of Fish Biology 30, 15–33.

Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. Reprod., Nutr., Dev. 24, 807–833.

Dedi, J., Takeushi, T., Seikai, T., Watanabe, T. 1995. Hypervitaminosis and safe levels of Vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed Artemia nauplii. Aquaculture, 133:135-146.

Dhert, P., Sorgeloos, P., Devresse, B. 1993. Contribution towards a specific DHA enrichment in the live food *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp. In: Reinertsen, H., Dahle, L.H., Jørgensen, L., Tvinnerheim, K. (eds) Proceedings from the international conference on fish farming technology, Trondheim,Norway. A.A.Balkema,Rotterdam, pp 109–115.

Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., da Conceição, L. E., 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(12), 1122-1130.

Dickey-Collas, M. 1993. The occurrence of juvenile pigmentation abnormalities in plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae fed on enriched and unenriched Artemia salina nauplii. Journal of Fish Biology, 42: 787-795.

Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 300(1), 182-188.

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.

Dinis, M.T. 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to an artificial diet. Aquacult. Fish. Manage. 23, 515-520.

Dinis, M.T., Ribeiro, L., Conceição, L.E.C., Aragão, C. 2000. Larvae digestion and new weaning experiments in *Solea senegalensis*. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification, 24-28 May, Zaragoza, pp. 193-204.

Divanach, P., Boglione, C., Menu, B., Koumoundourous, G., Kentouri, M., Cataudella, S. 1996. Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects, 45 66.

Douglas, S.E., Mandla, S., Gallant, J.W. 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during the development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. Aquaculture 190: 247-260.

Drake, P., Arias, A.M., Rodriguez, A. 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cadiz): II. Características de la produccion de peces. Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq. 116, 1–23.

Elbal, M. T., Garcıa Hernández, M. P., Lozano, M. T., Agulleiro, B. 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. Aquaculture, 234(1), 215-238.

Engrola, S. 2008. Improving growth performance of Senegalese sole postlarvae. Faculdade de ciências e tecnologia, Universidade do Algarve, 2008. 192 p. Dissertação de Doutoramento.

Engrola, S., Mai, M., Dinis, M. T., Conceição, L. E. 2009. Co-feeding of inert diet from mouth opening does not impair protein utilization by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture, 287(1), 185-190.

Esteban, J. C., Calderon, J. A., Carrascosa, M., Pecci, F. 1995. Cria larvaria, destete y preengorde del lenguado (Solea senegalensis) realizado en el departamento de cultivos marinos del IES Sancti-Petri. In V Congreso Nacional de Acuicultura, Sant Carles de la Ràpita (pp. 10-13).

Evans, J.J., Pasnik, D.J., Peres, H., Lim, C., Klesius, P.H. 2005. No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed heat-treated and non-heat-treated raw soybean meal. Aquaculture Nutrition 11, 123–129.

Evjemo J.O, Reitan K.I, Olsen Y. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. Aquaculture 227:191–210.

Evjemo, J.O., Olsen, Y. 1997. Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. Hydrobiologia 358:159–162.

FAO, Fisheries and Aquaculture Department. 2013. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Sparus aurata*. in: FAO, Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en

Faustino, M., Power, D. M. 1998. Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology* 52, 11–22.

Faustino, M., Power, D. M. 1999. Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. *Journal of Fish Biology* 54, 1094–1110.

Faustino, M., Power, D.M. 2001. Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. Journal of Fish Biology, 58(2), 537-572.

Fernández-Díaz, C., Kopecka, J., Cañavate, J.P., Sarasquete, C., & Solé, M. 2006. Variations on development and stress defences in *Solea senegalensis* larvae fed on live and microencapsulated diets. Aquaculture, 251(2), 573-584.

Fernandez-Diaz, C., Yufera, M. 1996. Detecting growth in gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae fed microcapsules. Aquaculture 153, 93–102.

Fernández-Díaz, C., Yýfera, M., Cañavate, J. P., Moyano, F. J., Alarcón, F. J., & Díaz, M. 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. Journal of fish Biology, 58(4), 1086-1097.

Fond, M., Saksena, V.P. 1977. The daily food intake of young soles (*Solea solea*) in relation to their size and the water temperature. 3rd Meeting of the ICES Working Group on Mariculture. Brest, France, pp. 51–58.

Foscarini, R. 1988. A review: intensive farming procedure for red sea bream (*Pagrus major*) in Japan. Aquaculture, 72:191-246.

Fraisse, M., Woo, N.Y.S., Noaillac-Depeyre, J. and Murat, J.C. 1981. Distribution pattern of digestive enzyme activities in the intestine of the catfish (*Ameiurus nebulosus* L.) and of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Comp. Biochem. Physiol. 70A: 443–446.

Francescon, A., Freddi, A., Barbaro, A., Giavenni, R. 1988. Daurade *S. aurata* L. reproduite artificiellement et daurade sauvage. Expériences paralleles en diverses conditions d'elevage. Aquaculture 72, 273–285.

Fyhn, H.J., Finn, R.N., Helland, S., Rønnestad, I., Løvmsland, E.R. 1993. Nutritional value of phytoplankton and zooplankton as live food for marine fish larvae. In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, K., Tvinnereim, K. (eds) Fish farming technology. Balkema, Rotterdam, pp 121–126.

Fyhn, H.J., Rønnestad, I., Berg, L. 1995. Variation in protein and free amino acid content of marine copepods during the spring bloom. Spec Publ Eur Aquac Soc 24:321–324.

Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A., López, L. M. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. Aquaculture, 318(1), 162-168.

Gartner, J. V. Jr. 1986. Observations on anomalous conditions in some flatfishes (Pisces: Pleuronectiformes), with a new record of partial albinism. Environmental Biology of Fishes, 7(2): 141-152.

Gatta, P.P., Parma, L., Guarniero, I., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R., Bonaldo, A. 2011. Growth, feed utilization and liver histology of juvenile common sole (Solea solea L.) fed isoenergetic diets with increasing protein levels. Aquaculture research, 42(3), 313-321.

Gavaia, P.J., Sarasquete, C., Cancela, M.L. 2000. Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. Biotechnic & Histochemistry, 75(2), 79-84.

Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex Dentex dentex during early ontogeny. Aquaculture 287, 381–387.

Gomes, J. 2012. Utilização de fontes proteicas em dietas para linguado do Senegal (*Solea senegalensis*). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Gordon, M. 1954. The genetics of fish diseases. Transactions of American Fisheries Society, 83:229-240.

Govoni, J.J., Bochlert, G.W., Watanake, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. Environ. Biol. Fishes 16, 59–77.

Grau, A., Crespo, S., Sarasquete, M.C., González de Canales, M.L. 1992. The digestive tract of the amberjack, *Seriola dumerili* Risso: A light and scanning electron microscope study. Mar. Biol., 41: 287-303.

Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Baeverfjord, G., Berge, G.M. 2002. Full-fat soybean meal in diets for Atlantic halibut: growth, metabolism and intestinal histology. Aquaculture Nutrition 8, 265–270.

Guerreiro, I., Vareilles, M., Pousão-Ferreira, P., Rodrigues, V., Dinis, M. T., Ribeiro, L. 2010. Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). Aquaculture. 300:194-205.

Halver, J. E., Hardy, R. W. (Eds.). 2002. Fish nutrition. Academic Press.

Hamza, N., Mhetli, M., Kestemont, P., 2007. Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (Sander lucioperca) larvae. Fish Physiol. Biochem. 33, 121–133.

Helland, S., Terjesen, B.F., Berg, L. 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. Aquaculture 215:213–228.

Hernandez Molejon, O.G., Alvarez-Lajonchere, L. 2003. Culture experiments with *Oithona oculata* Farran, 1913 (Copepoda: Cyclopoida), and its advantages as food for marine fish larvae. Aquaculture 219:471–483.

Hibiya, T. 1982. An Atlas of Fish Histology: Normal Pathological and Features. Kodansha, Tokyo, Japan.

Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J. 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. J. Nutr. 118, 515–520.

Holt, G.J. 2003. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation (Cato, J.C. & Brown, C.L. eds), pp 251–254. Iowa State Press, Ames, IA.

Honma, Y. 1990. Droplets from the Sado Marine Biological Station, Niigata University – V. Some anomalous fishes. Report of the Sado Marine Biological Station, Niigata University 20:19-28.

Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P. 2003. A review of the culture potential of Solea solea and S. senegalensis. Rev. Fish Biol. Fish. 13, 379–407.

Iwama, G.K., McGeer, J.C. and Pawluk, M.P. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool*. 67, 2065–2073.

Kamler, E. 2002. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. Reviews in Fish Biology and Fisheries 12, 79–103.

Katavic, I. 1986. Diet involvement in mass mortality of sea bass (*Dicentrachus labrax*) larvae. Aquaculture 58:45-54.

Kaushik, S.J. 1997. Nutritional and the improvement of the seabass and seabream production in the Mediterranean region. Recent Developments in the Nutrition and Feeding of Marine Finfish of Interest to the Mediterranean. ALIIA Trades Show, Thessaloniki, Greece, September 27th.

Kitajima, C., Watanabe, T., Tsukashima, Y., Fujita, S. 1994. Lordotic deformation and abnormal development of swim bladders in some hatchery-bred marine physoclistous fish in Japan. J. World Aquacult. Soc. 25 (1), 64–77.

Kjorsvik, E., Van der Meeren, T., Kryvi, H., Arnfinnson, J., Kvenseth, P.G. 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, Gadus morhua during start-feeding and starvation. Journal of Fish Biology 38, 1–15.

Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. Aquaculture, 200(1), 181-201.

Kolkovski, S., Arieli, A., Tandler, A. 1997a. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. Aquaculture International 5, 527–536.

Kolkovski, S., Koven, W., Tandler, A. 1997b. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture, 155(1), 193-205.

Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P. Stefanakis, S. Kentouri, M. 1995. Osteological study of the origin and development of the abnormal caudal fin in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fry. P.16-18. In: Quality in Aquaculture. Europian Aquaculture Society, Special Publication No. 23, Gent, Belgium. p.413.

Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., Kentouri, M. 1997a. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in (*Sparus aurata*) L fry. Aquaculture 149:215–226.

Koumoundourous, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S., Kentouri, M., 1997b. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. Aquaculture 149, 215–226.

Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. Aquaculture 194, 107-121.

Koven, W., Van Anholt, R., Lutzky, S., Ben Atia, I., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A. 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratua*) exposed to handling or daily salinity change. Aquaculture, 228(1), 307-320.

Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T. 1998. Qualification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanoticus* larvae. Aquaculture 161, 491–499.

Kurokawa, T., Suzuki, T. 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 162, 113–124.

Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. Aquaculture 267, 3-19.

Langdon, C. 2003. Microparticle types for delivery of nutrients to marine fish larvae. Aquaculture 227, 259-275.

Lauff, M., Hofer, R. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture 37, 335–346.

Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., Arnold, C.R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (Sciaenops ocellatus). Aquaculture 256, 194–205.

Lebegue, E. 1982. Etude morphologique et experimentale sur la pigmentation de larves et de juveniles de sole (*Solea vulgaris* Q.) et de turbot (*Psetta maxima* L.) Thèse du3ème cycle, Universite de Bretagne Occidentale, France.

Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Mar Biol Ann Rev 24:521–623.

Léger, P., Bengtson, D.A., Sorgeloos, P., Simpson, K.L., Beck, A.D. 1987. The nutritional value of *Artemia*: a review. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decleir, W., Jaspers, E. (eds) *Artemia* research and its applications, vol 3. Universa Press, Wetteren, pp 357–372, 556 Lester RJG, Hayward CJ (2006) Phylum.

Letlier, M.E., Repetto, Y., Alduane, J. and Morello, A. 1985. Acid and alkaline phosphatase activity in *TITpanosoma crttzi* epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol. 81: 47-5 I.

Loy, A., Boglione, C., Cataudella, S. 1998. Geometric morphometrics and morpho-anatomy: a combined tool in the study of sea bream _*S. aurata*. shape. J. Appl. Ichthyol. 14, 104–110.

Luizi, F.S., Gara, B., Shields, R.J., Bromage, N.R. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepodod and Artemia prey. Aquaculture 176, 101– 116.

Ma, P., Sivaloganathan, B., Reddy, P.K., Chan, W.K., Lam, T.J. 2001. Ontogeny of amylase gene expression in sea bass larvae (*Lates Calcarifer*). Mar. Biotechnol. 3: 463-469.

Mair, G. C. 1992. Caudal deformity syndrome (CDS): an autosomal recessive lethal mutation in the tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of Fish Diseases, 15(1), 71-75.

Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J. 1973. The aminopeptidase fromhog-intestinal brush border. Biochim. Biophys. Acta 321, 282–295.

Martínez, I., Moyano, F. J., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiology and Biochemistry, 21(4), 317-323.

Martínez-Lagos, R., Tovar-Ramírez, D., Gracia-López, V., Lazo, J. P. 2014. Changes in digestive enzyme activities during larval development of leopard grouper (Mycteroperca rosacea). Fish physiology and biochemistry, 1-13.

Matsuoka, M. 1987. Development of skeletal tissue and skeletal muscle in the red sea bream, *Pagrus major*. Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab. 65, 1–102.

McEvoy, L.A., Naess, T., Bell, J.G., Lie, Ø. 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. Aquaculture 163:237–250.

McKay, L.R., Gjerde, B. 1896. Genetic variation for a spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, vol. 52, 4: 263-272.

Mckinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G., Robino, B. 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. Aquaculture 223:89–106.

Métais, P., Bieth, J. 1968. Détermination de l'a-amylase par une microtechnique. Ann. Biol. Clin. 26, 133–142.

Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., Moon, T. W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9(3), 211-268.

Mommsen, T.P. 1986. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. *Can. J. Zool*. 64, 1110–1117.

Moyano, F. J., Diaz, M., Alarcon, F. J., Sarasquete, M. C. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry, 15(2), 121-130.

Moyano, F.J., Sarasquete, M.C. 1993. A screening on some digestive enzyme activities of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. World Aquaculture'93. Special Publication No. 19. Torremolinos. Spain. n-n.

Munilla-Moran, R., Stark, J.R., Barbour, A. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture 88, 337–350.

Nanton, D.A., Castell, J.D. 1999. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as live food for marine fish larvae. Aquaculture 175:167–181.

Nelson, J.S. 1971. Absence of the pelvic complex in ninespine sticklebacks, *Pungitius pungitius*, collected in Ireland and Wood Buffalo Natitonal Park Region, Canada, with notes on meristic variation. Copeia 1971:707-717.

O'Connell, C.P., Paloma, P.A. 1981. Histochemical indications of liver glycogen in samples of emaciated and robust larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fishery Bulletin 76, 806–812.

Okumura, D.T. 2011. Estudos ecotoxicológicos com as espécies *Argyrodiaptomus furcatus* e *Notodiaptomus iheringi* (Copepoda, Calanoida). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2011. 312f. Dissertação de Doutoramento.

Olivotto, I., Nozzi, V., Cossignani, L. Carnevali, O. 2010b Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture. Aquaculture, 308, 124–131.

Olivotto, I., Piccinetti, C.C., Avella, M.A., Molina Rubio, C. Carnevali, O. 2010a Feeding strategies for striped blenny Meiacanthus grammistes larvae. Aquac. Res., 41, 307–315.

Papadakis, I. E., Zaiss, M. M., Kyriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P., Mylonas, C. C. 2009. Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). Aquaculture, 286(1), 45-52.

Papandroulakis, N., Papaioannou, D., Anezaki, L., Stefanakis, S., Hatziathanasiou, A., Bengoa, V., Divanach, P. 1998. Automated management and feeding system for intensive hatcheries. In: First Balkan Congress on Aquaculture. Thessaloniki, Greece, 18–21 September 1998. Fishing News 211, 74–83 (In Greek).

Paperna, I. 1978. Swimbladder and skeletal deformations in hatchery bred *Sparus aurata*. Jounal of Fish Biology, 12:109-114.

Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Chiras, G. 2005. Dietary L-tryptophan and tank colour effects on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles reared in a recirculating water system. Aquacult. Eng. 32, 277–284.

Papoutsoglou, S.E., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N.P., Chadio, S. 2000. Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. Aquacult. Eng. 22, 309–318.

Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Le Gall, M.M., Quazuguel, P. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 15(3): 237–242.

Pérez-Jiménez, A. Peres, H., Oliva-Teles, A. 2014. Effective replacement of protein-bound amino acids by crystalline amino acids in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. Aquaculture Nutrition 20; 60-68.

Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, U., Mugnier, C. 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? J. World Aquacult. Soc. 24, 211–224.

Piattelli, A., Piattelli, M., Scarano, A. 1997. Simultaneous demonstration of alkaline and acid phosphatase activity in bone, at bone-implant interfaces and at the epiphyseal growth plate in plastic-embedded undemineralized tissues. Biomoterials 18, 545–549.

Piccinetti, C.C., Tulli, F., Tokle, N.E., Cardinaletti, G., Olivotto, I. 2014. The use of preserved copepods in sea bream small scale culture: biometric, biochemical and molecular implications. Aquaculture Nutrition, 20(1), 90-100.

Piccinetti, C.C., Ricci, L.A., Tokle, N. *et al*. 2012. Malnutrition may affect common sole (*Solea solea*) growth, pigmentation and stress response. Molecular, biochemical and histological implications. Comp. Biochem. Physiol., part A, 161, 361–371.

Pousão-Ferreira, P.M. 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. Ed. IPIMAR, 235 p.

Power, D.M., Melo, J., Santos, C.R.A. 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. Journal of Fish Biology 56, 374–387.

Pradhan, P. K., Jena, J. K., Mitra, G., Sood, N., Gisbert, E. 2012. Ontogeny of the digestive tract in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae. Fish physiology and biochemistry, 38(6), 1601-1617.

Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y. 1994. Effect of short and long term lipid enrichment on total lipids, lipid class and fatty acid composition in rotifers. Aquac Int 2:19–32.

Reddy, P.K., Vijayan, M.M., Leatherland, J.F. and Moon, T.W. 1995. Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? *J. Fish Biol*. 46, 341–359.

Reig, L., Duarte, S., Valero, J., Oca, J. 2010. Preference of cultured sole (*Solea senegalensis*) for different substrates differing in material, texture and colour. Aquacultural engineering, 42(2), 82-89.

Rema, P., Conceição, L. E. C., Evers, F., CASTRO-CUNHA, M., Dinis, M. T., Dias, J. 2008. Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture Nutrition, 14(3), 263-269.

Ribeiro, L., Couto, A., Olmedo, M., Álvarez-Blázquez, B., Linares, F., Valente, L.M.P. 2008. Digestive enzyme activity at different developmental stages of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). Aquacult. Res. 39, 339–346.

Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C., Dinis, M. T. 2002. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed Artemia and a compound diet. Fish Physiology and Biochemistry, 27(1-2), 61-69.

Ribeiro, L., C. Sarasquete, Dinis, M.T. 1999a. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup 1858) larvae. Aquaculture 171: 293-308.

Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T. 1999b. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquaculture 179, 465–473.

Rocha, F.S. 2009. Requisitos de ácidos araquidónico em microdietas para larvas de dourada (*Sparus aurata*, L., 1758). Faculdade de ciências e tecnologia, Universidade do Algarve, 2009. 69 p. Dissertação de Mestrado.

Rodriguez, J. P., Perdigonéz, C., Grande, I., Gordo, T., Elvira, A. M. 1995. Estrategias de cultivo de lenguado (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) en estanques de la Bahía de Cádiz. Datos preliminares. In: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, Sant Carles de la Ràpita (Vol. 10, No. 13, pp. 874-878).

Ronestad, I., Morais, S. 2008. Digestion. In: Finn, R.N., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Larval Physiology. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 201–262.

Rønnestad, I., Helland, S., Lie, Ø. 1998. Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. Aquaculture 165:159–164.

Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N. 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. Aquaculture 177:201–216.

Roo, F.J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernández-Cruz, C.M., Fernández, A., Fernandez-Palacios, H. 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. Aquaculture 179, 499– 512.

Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. Aquaculture 155, 183–191.

Rosenthal, H.L., Rosenthal, R.S. 1950. Lordosis, a mutation in the guppy. Journal Heredity, 41:217-218.

Rubio V.C., Boluda Navarro D., Madrid J.A. Sánchez-Vaázquez F.J. 2009. Macronutrient self-selection in *Solea senegalensis* fed macronutrient diets and challenged with dietary protein dilutions. Aquaculture 291,95^100.

Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Cañavate, J.P., Manchado, M. 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. Fish Shellfish Immunol. 28, 296–302.

Santamaría, J. A., Andrades, J. A., Herráez, P., Fernández-Llebrez, P. Becerra, J. 1994. Perinotochordal connective sheet of gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*, L.) affected by axial malformations: an histochemical and immunocytochemical study. *The Anatomical Record* 240, 248–254.

Sarasquete, M.C., Polo, A., Gonzalez de Canales, M.L. 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of *Sparus aurata*. Histochem. J.24, 337–344.

Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, Sparus aurata L. Aquaculture 130, 79–92.

Schipp, G. 2006. The use of Calanoid copepods in semiintensive, tropical marine fish larviculture. En: Editores: Cruz Suárez LE, Marie DR, Salazar MT, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Ortega AG. Avances en Nutrición Acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15–17 November. Universidad Autónoma de Nuevo León, México, pp 84–94.

Segner, H., Roesch, R., Verreth, J., Witt, U. 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. J World Aquacult Soc 24:121–134.

Segner, H., Juario, J.V. 1986. Histological observations on the rearing of milkfish, *Chanos chanos*, fry using different diets. J. Appl. Ichthyol. 4, 162–173.

Segner, H., Rosch, V., Schmidt, H., von Poeppinghausen, K.J. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaratus*. Journal of Fish Biology 35, 249–263.

Segner, H., Verreth, J. 1995. Metabolic enzyme activities in larvae of the African catfish, *Clarias gariepinus*: changes in relation to age and nutrition. Fish physiology and biochemistry, 14(5), 385-398.

Seikai, T., Matsumoto, J. 1994. Mechanism of pseudoalbinism in flatfish: an association between pigment cell and skin differentiation. J. World Maricult. Soc. 25, 78–85.

Shansudin, L., Yusof, M., Azis, A., Shukri, Y. 1997. The potential of certain indigenous copepod species as live food for commercial fish larval rearing. Aquaculture 151:351–356.

Shields, R.J. 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. Aquaculture 200:55–88.

Shreck, C.B. 1982. Stress and rearing of salmonids. Aquaculture 28, 241– 249.

Silva, P. I. M., Martins, C. I., Engrola, S., Marino, G., Øverli, Ø., Conceição, L. E. 2010. Individual differences in cortisol levels and behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles: Evidence for coping styles. Applied animal behaviour science, 124(1), 75-81.

Soares, F., Dinis, M. T., & Pousão-Ferreira, P. 1994. Development of the swim bladder of cultured *Sparus aurata* L.: a histological study. Aquaculture Research, 25(8), 849-854.

Støttrup, J.G., Jensen, J. 1990. Influence of algal diet on feeding and egg production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. J Exp Mar Biol Ecol 141:87–105.

Støttrup, J.G. 2000. The elusive copepods. Their production and suitability in marine aquaculture. Aquac Res 31:703–711.

Støttrup, J.G., Norsker, N.H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. Aquaculture 155:231–247.

Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, Ş., Fırat, K., Alpbaz, A. 2007. Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). Comp. Biochem. Physiol. A 148, 470–477.

Tacon, A. 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species. Alternatives to fish meal and other fishery resources. Fish Circ. No. 881. FAO, Rome.

Tanaka, M., Tanangonan, J.B., Tagawa, M., De Jesus, E.G., Nishida, H., Isaka, M., Kimura, R., Hirano, T. 1995. Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. Aquaculture 135, 111 – 126.

Tandler, A., Anav, F.A., Choshniak, I. 1995. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream *Sparus aurata*, larvae. Aquaculture 135:343-353.

Tandler, A., Kolkovski, S. 1991. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful use of microdiet in *Sparus aurata* larvae. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. ŽEds.., LARVI'91—Fish and Crustacean Larviculture Symp. Europ. Aquacult. Soc. Spec. Publ., Gent, Belgium, 15, pp. 169–171.

Taniguchi, N., Azuma, K., Umeda, S. 1984. Difference due to Parents in Incidence of Vertebral Malformation in Artificially-bred Red Seabream. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries/Nissuishi, 50 (5): 787-792.

Terra, W.R., Ferreira, C., De Bianchi, A.G. 1979. Distribution ofdigestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of Rhynchosciara and its physiological significance. J. Insect Physiol. 25, 487–494.

Tort, L., Montero, D., Robaina, L., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S. 2001. Consistency of stress response to repeated handling in the gilthead sea bream Sparus aurata Linnaeus, 1758. Aquacult. Res. 32, 593–598.

Treviño, L., Alvarez-Gonzáalez, C.A., Perales-Garcíia, N., Arevalo-Galan, L., Uscanga-Martínez, A., Marquez-Couturier, G., Fernáandez, I., Gisbert, E. 2011. A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Gunther, 1862 from hatching to the juvenile stage. J Appl Ichthyol 27:73–82.

Tseng, H.C., Grendell, J.H., Rothman, S.S. 1982. Food, duodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. Am. J. Physiol. 243, G304–G312.

Van Anholt, R.D., Koven, W.M., Lutzky, S., Wendelaar Bonga, S.E. 2004. Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. Aquaculture, 238(1), 369-383.

Van der Meeren, T. 2003. Analysis of biochemical components in copepods for evaluation of feed quality for juvenile production of marine fish. Prosjektrapportnr 5 2003. Havforskningsinstituttet, 39 pp.

Van der Meeren, T., Olsen, R.E., Hamre, K., Fyhn, H.J. 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. Aquaculture 274:375–397.

Verburg-van Kemenade, B.M.L., Stolte, E.H., Metz, J.R., Chadzinska, M. 2009. Neuroendocrine–immune interactions in teleost fish. In: Bernier, N.J., Van Der Kraak, G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), Fish Physiology, vol. 28. Academic Press Inc., San Diego, USA, pp. 313–364.

Verreth, J.A.J., Torreele, E., Spazier, E., Rombout, J.H.W.M., Booms, R., Segner, H. 1992. The development of a functional digestive system in the African catfish, *Clarias gariepinus* (BurchelI). *J. World Aquacult. Soc.* (in press).

Vijayan, M.M. and Moon, T.W. 1994. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool*. 72, 379–386.

Vu, T.T. 1983. Etude histoenzymologique des activities proteasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar, Dicentrarchus labrax (L). Aquaculture 32, 57–69.

Walford, J., Lam, T.J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass *Lates calcarifer* larvae and juveniles. Aquaculture 109, 187–205.

Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S. 1983. Nutritional values of live feed organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture 34:115–143.

Watanabe, T., Thongrod, S., Takeuchi, T., Satoh, S., Kubota, S.S., Fujimaki, Y., Young-Cho, C. 1989. Effect of dietary *n*-6 and *n*-3 fatty acids on growth, fatty acid composition and histological changes of white fish *Coregonus laĺaretus maraena*. Nippon Suisan Gakkaishi 55, 1977–1982.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591–625.

Wunderink, Y. S., Engels, S., Halm, S., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., Flik, G., Klaren, P.H.H., Mancera, J. M. 2011. Chronic and acute stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): The involvement of cortisol, CRH and CRH-BP. General and comparative endocrinology, 171(2), 203-210.

Yamamone, T., Amano, M., Takahashi, A. 2005. White background reduces the occurrence of staining, activates melanin-concentrating hormone and promotes somatic growth in barfin flounder. Aquaculture 224, 323–329.

Yúfera, M., Darias, M. J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture, 268(1), 53-63.

Yúfera, M., Fernandez-Diaz, C., Pascual, E. 2005. Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. Aquaculture 248, 253–262.

Zambonino-Infante, J.L., and C.L. Cahu. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. J. Nutr. 129: 1195-1200.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. J. Nutr. 127, 608-614.

Zambonino-Infante, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutierrez, J., Cahu, C.L. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino JEO, Bureau D, Kapoor BG (eds) Feeding and digestive functions of fish. Science Publishers Inc., Enfield, pp 277–344.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 12, 399-408.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology 130C, 477-487.