

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

SARAH PITTIGLIANI IKEBATA

**EFEITO DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LARVAS
DE *Hippocampus reidi***

FLORIANÓPOLIS - SC

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

SARAH PITTIGLIANI IKEBATA

EFEITO DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LARVAS
*DE **Hippocampus reidi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência para obtenção do Diploma de
Graduação em Zootecnia da Universidade Federal
de Santa Catarina.

Orientadora: Prof. Dr^a Mônica Yumi Tsuzuki

Coorientadora: Ana Paula Lira Souza

FLORIANÓPOLIS - SC

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ikebata, Sarah Pittigliani

EFEITO DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LARVAS DE *Hippocampus reidi*

/ Sarah Pittigliani Ikebata ;

orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki, coorientadora, Ana Paula
Lira Souza, 2018.

50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. *Hippocampus reidi*. 3. Atividade
enzimática. 4. Privação alimentar. 5. Vitelo. I. Tsuzuki,
Mônica Yumi. II. Souza, Ana Paula Lira. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Zootecnia. IV.
Título.

Sarah Pittigliani Ikebata

**EFEITO DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LARVAS
DE *Hippocampus reidi***

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 13 de Novembro de 2018.

Orientadora:



Prof.ª Mônica Yumi Tsuzuki, Dr.ª
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:



Renata Ávila Ozório, Dr.ª
Universidade Federal de Santa Catarina



Cristina Rios, Msc.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais e a todos que fizeram o experimento acontecer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças e me permitir chegar a qualquer lugar que eu precise chegar.

Agradeço aos meus pais, Rogéria e Kanji, e toda minha família! Vocês são os meus maiores incentivadores, sempre fazendo tudo por mim, me apoiando e estando ao meu lado em todos os momentos. Devo tudo a vocês!

Obrigada à Prof^a Mônica pela orientação, por confiar e permitir eu participar por tanto tempo do LAPOM, me proporcionando novos conhecimentos e experiências.

Ao Prof.^o Roberto Derner e ao LCA, a todos do LAPMAR e LMM, à Cris e ao Prof.^o Carlos, meu muito obrigada! Vocês foram essenciais para a realização do meu trabalho.

Gratidão aos professores do curso de Zootecnia, por terem me auxiliado não só na formação acadêmica, mas também na formação pessoal e de valores dentro da profissão.

Inúmeros agradecimentos à equipe LAPOM, em especial à Re (melhor técnica), Paulinha (melhor coorientadora) e Rao (só incomoda), por terem sempre me salvado e caminhado comigo desde 2014. Eu aprendi muito com vocês. Obrigada pela leveza e segurança que vocês transmitem, e o mais importante de tudo, obrigada pela amizade!

Aos queridos, Ilson, Fer, Marcinha, Mari, Rafinha, Carol e Helen, que me ajudaram de alguma forma no experimento, muito obrigada, por isso e por tudo! No geral, agradeço a todos do Lab e aos que estiveram de passagem, pela boa companhia e troca de conhecimento, além dos ex integrantes (Amandinha, Douglas, Daner, Re quero-quero e Yuri), que também foram importantes durante a minha passagem na Aquicultura. Sassá, você é demais, obrigada!

Aos meus amados Cassiano, Ana Clara, Robertinha, Giovanna, Fred, Bacan, Dedéco, Isa, Tutu, Santini, Marcão, e Vini, muito obrigada por esses anos! A minha caminhada não seria a mesma coisa sem vocês!

RESUMO

O fornecimento de alimento vivo é comum para larvas recém-nascidas de cavalos-marinhos. Porém, questiona-se a sua necessidade visto que estudos comprovam o baixo aproveitamento do alimento devido à presença do saco vitelínico nas larvas de peixes marinhos, aliado ao desenvolvimento incompleto do trato digestório. Desta forma, este estudo foi realizado para determinar o efeito da inanição e do atraso na primeira alimentação sobre o crescimento, a sobrevivência e a atividade de enzimas digestivas (quimotripsina, tripsina e amilase) das larvas de *Hippocampus reidi*. Três tratamentos foram analisados até o 10º dia, em triplicata: TC-controle: larvas foram alimentadas logo após o nascimento; T1: larvas foram submetidas a privação alimentar até o 3º dia, posteriormente alimentadas; T2: larvas submetidas ao jejum até o 5º dia, posteriormente alimentadas. Houve mortalidade de 100% no 8º e 6º dia de idade das larvas que ficaram em jejum por 3 (T1) e 5 dias (T2), respectivamente. Ao final do 10º dia, a sobrevivência no tratamento controle foi de 31%. As larvas de cavalo-marinho mostraram mesmo crescimento em altura até o 3º dia de idade para qualquer dos tratamentos testados (T1, T2 e TC), o mesmo não aconteceu em relação ao peso dos animais, que na mesma idade, os peixes do tratamento 1 e 2 mostraram diferença significativa em relação ao TC. Assim, os peixes do tratamento T1 e TC apresentaram em média, no 3º dia de idade, valores de altura e de peso de 6,60 mm e 1,64 mg, respectivamente. Quanto ao tratamento 2 os valores do peso e altura foram 1,71 e 1,04 vezes menores, respectivamente que o tratamento controle. No 5º dia, o T2 apresentou crescimento negativo no peso e altura, com valores de $1,26 \pm 0,86$ mg e $6,49 \pm 0,99$ mm, respectivamente, em relação ao TC que obtiveram peso e altura de $3,69 \pm 0,99$ e $7,43 \pm 1,03$, respectivamente. Não houve diferença significativa no T1, em relação aos valores de atividades específicas da tripsina, quimotripsina e amilase, quando comparados com TC, no 3º dia de vida. Também foi observado que após o 3º dia, pela possível reabsorção do vitelo e a necessidade de enzimas exógenas, as larvas do T2 mostraram os menores valores de atividade específica da tripsina ($3,90 \pm 0,09$ U animal⁻¹), quimotripsina ($3,23 \pm 0,07$ U animal⁻¹) e amilase ($18,10 \pm 1,07$ U animal⁻¹), quando comparadas com as atividades de tripsina ($11,03 \pm 0,90$ U animal⁻¹), quimotripsina ($11,43 \pm 0,86$ U animal⁻¹) e amilase ($21,08 \pm 1,13$ U animal⁻¹) do TC. Os valores das atividades enzimáticas das larvas que foram alimentadas com rotíferos e *Artemia* nos primeiros 10 dias de vida, foram bem abaixo quando comparado aos demais trabalhos, fato possivelmente relacionado à baixa qualidade dos filhotes que nascerem de pais bastante jovens e/ou à baixa qualidade nutricional do vitelo. Nas condições do presente estudo, concluímos que a privação alimentar de 3 e 5 dias após o nascimento resultaram em baixa sobrevivência, crescimento e atividade das enzimas digestivas até o 10º dia, se comparados ao TC, observando que os tratamentos em inanição não atingiram o crescimento compensatório. Neste caso, este resultado pode estar relacionado com a inaptidão fisiológica e a capacidade reprodutiva reduzida dos cavalos-marinhos jovens, influenciando no tamanho e qualidade de ovos e larvas recém-nascidas. Portanto, nas condições das larvas testadas, concluímos que a privação alimentar prejudicou a sobrevivência e o crescimento das larvas de *Hippocampus reidi* nos primeiros dias de vida.

Palavras-chave: Atividade enzimática. *Hippocampus reidi*. Privação alimentar. Vitelo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de recirculação para as larvas (LAPOM)	23
Figura 2: Medidas utilizadas para definir a altura.....	24
Figura 3: Sobrevivência de larvas de <i>Hippocampus reidi</i> submetidas a diferentes dias de privação alimentar.....	25
Figura 4: Peso (média \pm DP) de larvas de <i>Hippocampus reidi</i> submetidas a diferentes dias de privação alimentar.....	29
Figura 5: Altura (média \pm DP) de larvas de <i>Hippocampus reidi</i> submetidas a diferentes dias de privação alimentar.....	29
Figura 6: Atividade enzimática específica da tripsina das larvas de <i>Hippocampus reidi</i> submetidas a diferentes dias de privação alimentar.....	31
Figura 7: Atividade enzimática específica da quimotripsina das larvas de <i>Hippocampus reidi</i> submetidas a diferentes dias de privação alimentar.....	32
Figura 8: Atividade enzimática específica da amilase das larvas de <i>Hippocampus reidi</i> submetidas a diferentes dias de privação alimentar.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Celsius

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CITES: Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção

cm: Centímetro

DHA: Ácido docosa-hexaenóico (Do inglês Docosahexaenoic Acid)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNS: Dinitrosalicílico

DP: Desvio padrão

EPA: Ácido eicosapentaenoico (Do inglês Highly Unsaturated Fatty Acids)

g: Grama

h: Hora

HUFA's: Ácidos Graxos Altamente Insaturados

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IUCN: União Internacional para a Conservação da Natureza

L: Litro

mg: Miligramas

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimol

nm: Nanômetro

pH: Potencial Hidrogeniônico

PL/PL's: Pós-larva/ Pós-larvas

p-NA: p-nitroanilina

PNR: Ponto-de-não-retorno

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

U: Unidade de atividade enzimática padrão

µL: Microlitro

µm: Micrometro

µmol: Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2.2.1 Quantificar a atividade das enzimas digestivas de larvas de <i>H. reidi</i> em diferentes dias de privação alimentar;	14
2.2.2 Avaliar a sobrevivência e o crescimento de larvas de <i>H. reidi</i> submetidas a diferentes dias de privação alimentar.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 CAVALOS-MARINHOS	15
3.2 COMÉRCIO DE CAVALOS-MARINHOS E AQUICULTURA.....	16
3.3 ENTRAVES PARA PRODUÇÃO DE CAVALO-MARINHO EM CATIVEIRO.....	17
3.3.1 Alimentação inicial.....	17
3.3.2 Pivação alimentar nos primeiros dias de larvicultura.....	18
3.4 ATIVIDADES DE ENZIMAS DIGESTIVAS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 ORIGEM DOS ANIMAIS E CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO	21
4.2 ALIMENTO VIVO	22
4.3 DESENHO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	22
4.4 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS	24
4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	25
4.5.1 EXTRATO ENZIMÁTICO	25
4.5.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	25
4.5.3 ATIVIDADE AMILÁSICA	26
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO	27
5.2 ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	30
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	48

1 INTRODUÇÃO

Os cavalos-marinhos pertencem à família Syngnathidae e se agrupam em um só gênero, o *Hippocampus*. Estão distribuídos globalmente em áreas tropicais e subtropicais, entre as latitudes de 50° Sul e 50° Norte (LOURIE *et al.*, 2004). No Brasil, três espécies de cavalos-marinhos são encontradas: *Hippocampus reidi*, *H. erectus* e *H. patagonicus* (SILVEIRA *et al.*, 2014), sendo o primeiro a espécie mais abundante e a única encontrada por toda a costa brasileira (ROSA *et al.*, 2007; SILVEIRA, 2011).

O mercado de cavalos-marinhos se divide entre o comércio de animais mortos e secos destinados, principalmente, à Medicina Tradicional Chinesa (MTC), mas também com fins alimentícios, religiosos e como souvenirs, e vivos para o mercado da aquarioria (FOSTER *et al.*, 2014; FOSTER *et al.*, 2016 ROSA *et al.*, 2011). Sua reduzida capacidade de natação os torna vulneráveis à coletas (VINCENTE *et al.*, 2011; HARASTI, 2016), adicionalmente, são vítimas da captura acidental da pesca de arrasto (ROSA *et al.*, 2011; FOSTER *et al.*, 2016) e da degradação do seu habitat. Estes fatores tornam o *H. reidi* uma espécie considerada quase ameaçada de extinção pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2018)

H. reidi é reconhecido como uma espécie difícil de ser criada em cativeiro (GIWOJNA, 2002), sendo a alimentação um dos aspectos que ainda precisa ser melhor compreendido. A alimentação na larvicultura de *H. reidi* é basicamente composta de rotíferos, náuplios de *Artemia* e copépodes, porém muitos desses alimentos não atendem as exigências nutricionais deste peixe (PAYNE e RIPPINGALE, 2000). Os rotíferos e *Artemia sp.* são comumente utilizados pela maior disponibilidade e conveniência (HOFF *et al.*, 2008), mas são naturalmente pobres em ácidos graxos altamente insaturados (HUFAs). Já os copépodes, apesar de apresentar alto valor nutricional em termos de ácidos graxos altamente insaturados (HUFA's), como ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA), ambos essenciais para os primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes marinhos (SARGENT *et al.*, 1997), apresentam dificuldade na sua produção intensiva.

Visto que a maioria das espécies de cavalos-marinhos não aceita alimento inerte, a utilização de alimentos vivos na larvicultura, apesar de apresentar melhores resultados de desempenho zootécnico, pode tornar o cultivo de cavalos-marinhos economicamente inviável, além das dificuldades inerentes a coleta e do cultivo desses alimentos (WOODS e VALENTINO, 2003; FELICIO *et al.*, 2006; OLIVOTTO *et al.*, 2008; KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010).

Os cavalos-marinhos, quando recém-nascidos, possuem o seu trato digestório pouco desenvolvido e são capazes de se alimentar de presas vivas (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010; OLIVOTTO *et al.*, 2011; BLANCO *et al.*, 2014). Alguns trabalhos têm mostrado que larvas aos primeiros dias de vida podem sobreviver quando submetidas a um período de privação alimentar entre 1 e 7 dias (CHANG & SHOUTHGATE, 2001; SHENG *et al.*, 2007; WILLADINO *et al.*, 2012; BLANCO *et al.*, 2014; HORA *et al.*, 2015), porém, a duração da privação após a reabsorção do vitelo em larvas, pode resultar em mau desenvolvimento morfológico, degeneração do trato digestório, além da redução na capacidade de captura dos alimentos (HEMING, 1982; TAYLOR e FREEBERG, 1984; RICE *et al.*, 1987). O ponto de não retorno (PNR) é a resposta dos animais em função da privação alimentar, ou seja, quando os efeitos da inanição tornam-se irreversíveis e quando 50% das larvas que sobreviveram ao jejum, perderam a capacidade de se alimentar, mesmo quando ofertado o alimento (BLAXTER e HEMPEL, 1963). Conhecer esse ponto de não retorno é de vital importância no manejo alimentar das larvas, já que baseado nele podemos verificar por quanto tempo as larvas resistem à privação alimentar, já que para algumas espécies que possuem vitelo, não é interessante ofertar o alimento exógeno, evitando assim o custo com a alimentação (Rotta, 2003).

De acordo com Novelli *et al.* (2015), as larvas de cavalo-marinho possuem a presença do saco vitelínico até o 2º dia após o nascimento, e com a reabsorção do mesmo, começam a ocorrer mudanças metabólicas, como diferenciação e a maturidade de órgãos especializados para a digestão e a reabsorção dos nutrientes (DABROWSKI, 1989). Lira (2018) aponta a presença das atividades da tripsina, quimotripsina e da amilase nas larvas de *H. reidi* no primeiro dia de vida. Este mesmo autor cita que, uma vez que a taxa de ingestão nesta idade foi baixa, comparada com outras idades, é possível que a atividade destas enzimas estivesse mais relacionada às enzimas do vitelo do que do alimento vivo (CHONG *et al.*, 2002; KORTNER *et al.*, 2011; SANZ *et al.*, 2011).

Apesar de alimentos vivos serem introduzidos logo após o nascimento das larvas, questiona-se a necessidade de seu fornecimento durante a presença de reservas vitelínicas, sendo que Rotta (2003) relata que, possivelmente ocorra um baixo aproveitamento do alimento vivo pelas larvas quando o vitelo ainda não foi totalmente reabsorvido e o trato digestivo ainda encontra-se em desenvolvimento.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da privação alimentar sobre a sobrevivência, crescimento e atividade enzimática das larvas de cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, até o 10º dia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da privação alimentar nos primeiros 10 dias da larvicultura do *H. reidi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Quantificar a atividade das enzimas digestivas de larvas de *H. reidi* em diferentes dias de privação alimentar;

2.2.2 Avaliar a sobrevivência e o crescimento de larvas de *H. reidi* submetidas a diferentes dias de privação alimentar.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CAVALOS-MARINHOS

Os cavalos-marinhos, peixes-cachimbo, cavalos-cachimbo e os dragões-do-mar pertencem à família Syngnathidae. Os cavalos-marinhos estão inclusos em um único gênero, o *Hippocampus*, composto por 55 espécies (FROESE e PAULY, 2013). Estão amplamente distribuídos em todo o mundo, principalmente em zonas tropicais e subtropicais (KUITER, 2009), e devido à sua aparência atraente e ecologia peculiar são frequentemente utilizados como espécies emblemáticas para promover a conservação marinha.

Possuem características morfológicas e biológicas incomuns, como um corpo composto por uma armadura de placas ósseas (LOURIE *et al.*, 2004), com orientação vertical ao seu eixo, olhos independentes um do outro, um longo focinho tubular, sem dentes, para sugar os alimentos, e uma cauda preênsil para se fixar ao substrato (FOSTER e VINCENT, 2004; KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010; LEYSEN *et al.*, 2011). Também podem apresentar uma variação grande nos padrões de cor e desenvolver filamentos dérmicos que auxiliam na camuflagem (HORA, 2015). Também distinguem-se por sua estratégia reprodutiva peculiar, uma vez que são os machos que ficam "grávidos", e a incubação de ovos ocorre dentro de uma bolsa específica na qual embriões e larvas são desenvolvidos (NOVELLI *et al.*, 2015; STOLTING e WILSON, 2007).

A maioria das espécies vive em águas costeiras tropicais e temperadas (FOSTER e VINCENT, 2004; KUITER, 2009). *Hippocampus reidi* (cavalo-marinho do focinho longo), *H. erectus* (cavalo-marinho raiado) e recentemente registrado *H. patagonicus* (cavalo-marinho do focinho curto) (SILVEIRA *et al.*, 2014), são as três espécies encontradas no Brasil (SILVEIRA *et al.*, 2014)

Conhecido como cavalo-marinho brasileiro ou "longsnout" (FIGUEIREDO e MENEZES, 1980), o *H. reidi* é encontrado em maior abundância no Brasil (CORRÊA *et al.*, 2011). Considerado um dos cavalos-marinhos de maior tamanho, quando adultos podem atingir até 24 cm de comprimento (LOURIE *et al.*, 1999; HORA *et al.*, 2010). A espécie distribui-se dos EUA até zonas tropicais e temperadas do Norte ao litoral sul do Brasil (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980; FROESE e PAULY, 2013)

sendo encontrada em recifes, baías, em meio a macroalga *Sargassum* sp., manguezais, canais e lagunas (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980).

3.2 COMÉRCIO DE CAVALOS-MARINHOS E AQUICULTURA

O interesse no cultivo de cavalos-marinhos reflete a preocupação com a sua sobreexploração na natureza, e conseqüente declínio das populações, e a alta valorização no mercado (VINCENT, 1996; LOURIE *et al.*, 1999). Em comparação com outros peixes de recife, a criação de cavalos-marinhos é uma indústria relativamente nova, porém com alto potencial econômico devido à demanda crescente e aos altos preços de mercado (OLIVOTTO *et al.*, 2011).

Milhares destes animais secos são destinados para fins medicinais (Medicina Tradicional Chinesa), artigos religiosos e decorativos, e vivos são comercializados como peixes ornamentais (LOURIE *et al.*, 1999; VINCENT *et al.*, 2011; KUMARAVEL *et al.*, 2012; FOSTER *et al.*, 2016). Os medicamentos tradicionais (TM), particularmente da medicina tradicional chinesa (MTC) e seus derivados, são responsáveis pela maior captura de cavalos-marinhos (FOSTER e VINCENT, 2004). Foster *et al.* (2016) relatam que os cavalos-marinhos são coletados principalmente de países em desenvolvimento da Ásia e comercializados secos para países mais desenvolvidos, como a China. Já os animais vivos são destinados aos Estados Unidos e União Européia, sendo *H. kuda* e *H. reidi* as espécies mais comercializadas.

Os cavalos-marinhos estão entre os peixes ornamentais mais exportados de acordo com os dados da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção - CITES (CITES, 2017). No Brasil, a demanda também é grande e apesar de estarem sob proteção legal, são classificados como “vulneráveis” na lista do ICMBio (MMA, 2014), “ameaçados de extinção” pelo IBAMA (MMA, 2016) e “quase ameaçados de extinção” pela Lista Vermelha da IUCN (IUCN, 2018). Adicionalmente, a falta de ferramentas que quantifiquem o comércio ilegal e doméstico, e as falhas nos dados da CITES entre valores de importação e exportação (FOSTER *et al.*, 2016), resultam na falta de controle e crescimento do comércio ilegal destes animais.

A aquicultura sustentável de cavalos-marinhos pode desempenhar um papel importante na conservação e no atendimento à demanda mundial. Segundo Hora

(2007), a aquicultura comercial para o cultivo de espécies mais vulneráveis, como os cavalos-marinhos, auxiliaria na diminuição da pressão de sobreexploração, além de ajudar no desenvolvimento da indústria de cultivo de peixes ornamentais marinhos.

3.3 ENTRAVES PARA PRODUÇÃO DE CAVALO-MARINHO EM CATIVEIRO

3.3.1 Alimentação inicial

Cavalos-marinhos juvenis são predadores que buscam presas vivas (FELÍCIO et al., 2006). Alimentos vivos, como rotíferos, *Artemia*, misidáceos e copépodos são necessários na criação de muitas espécies de cavalos-marinhos.

Os náuplios de *Artemia* e rotíferos (*Brachionus* sp.) costumam ser a primeira opção escolhida como alimentação, pois são facilmente cultivados em grandes quantidades e altas densidades (OLIVOTTO et al., 2008). Embora sejam de fácil cultivo, estes alimentos possuem apenas alguns ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) (WATANABE et al., 1983), havendo a necessidade de enriquece-los com alguns ácidos graxos antes de serem oferecidos às larvas, a fim de fornecer uma nutrição adequada, o que pode aumentar o custo de produção do peixe. Além disso, nem sempre o tamanho destes alimentos é adequado para a captura pelas larvas (FAULK e HOLT, 2005).

Palma et al., (2014) observaram que cavalos-marinhos possuem trato intestinal simples, sem estômago funcional, e podem apresentar dificuldades na digestão. Aliado a isto, náuplios de *Artemia*, são caracterizados pela baixa digestibilidade (PAYNE e RIPPINGALE, 2000; OLIVOTTO et al., 2011). Em cultivos de peixes marinhos, também observa-se uma alta mortalidade de larvas alimentadas com rotíferos. A substituição de rotíferos por náuplios de copépodes pode promover uma maior eficiência alimentar (KUHLMANN et al., 1981; DOI et al., 1997), além de melhorar o conteúdo nutricional da larvicultura (KRAUL et al., 1992).

O cultivo de copépodes, especialmente os calanóides, em altas densidades, de maneira econômica, ainda não foi alcançado (HOLT, 2003; OLIVOTTO et al., 2006) e coletar zooplâncton selvagem pode ser trabalhoso, além da possibilidade de introduzir patógenos nocivos e/ou organismos indesejáveis em sistemas de aquicultura (BURHANS e MELECHINSKY, 2000). Os copépodes são conhecidos por terem altas concentrações de HUFA, serem ricos em ácido docosaheptaenóico

(DHA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido araquidônico (AA), se comparados com rotíferos e náuplios de *Artemia* (WATANABE *et al.*, 1983; SARGENT *et al.*, 1997; FLEEGER, 2005). Seu cultivo em massa é mais difícil, pois possuem baixa taxa de reprodução e atingem baixas densidades. Além disso, as culturas são caras e muito trabalhosas, pois precisam de microalgas para se alimentar (FLEEGER, 2005). Bersano (2002) relata que para obter cultivos de copépodes com produção elevada e contínua para a utilização rotineira na larvicultura de piscicultura marinha, ainda é um desafio.

3.3.2 Privação alimentar nos primeiros dias de larvicultura

Na larvicultura, os peixes são mais vulneráveis às variações físico-químicas da água e a fatores nutricionais, por estarem em desenvolvimento. Dentro do manejo alimentar, a frequência e a quantidade de alimento oferecido, podem influenciar no crescimento e na sobrevivência das larvas, e conseqüentemente otimizar a mão de obra, escalonar a alimentação, e por fim, aumentar a produtividade (JOMORI *et al.*, 2003; LUZ e PORTELLA, 2005a; ZUANON *et al.*, 2011).

Algumas espécies de peixes, podem apresentar um período misto de alimentação antes da completa exaustão do vitelo (ZHANG *et al.*, 2009), porém, outras só iniciam a primeira alimentação logo após a total absorção do saco vitelínico (HOUDE, 1974) ou dias depois (GISBERT e WILLIOT, 1997; GISBERT *et al.*, 2004). Desta forma, presume-se que o início da primeira alimentação deve ser realizada dentro do limite de tolerância ao jejum de cada espécie. As larvas de *H.reidi* reabsorvem o seu vitelo por completo no 2º dia de vida (NOVELLI *et al.*, 2015) e já são capazes de se alimentar de presas vivas desde que nascem (KOLDEWEY E MARTIN-SMITH, 2010; OLIVOTTO *et al.* 2011; BLANCO *et al.*, 2014). Apesar das larvas de peixe serem normalmente alimentadas desde o 0 dia, Rotta (2003) afirma que há pouco aproveitamento do alimento, pois o trato digestivo está em desenvolvimento e não houve a total reabsorção do vitelo.

Desta maneira, é importante avaliar se há necessidade do fornecimento de alimento vivo nos primeiros dias após o nascimento. Quando desnecessárias, as elevadas quantidades de alimento vivo podem tornar a produção mais onerosa, além de provocar maior deterioração da qualidade da água pelos compostos nitrogenados

na água devido aos excessos não consumidos e aceleração metabólica desses animais quando alimentados (WINFREE, 1998; BEERLI *et al.*, 2004; LUZ *et al.*, 2005b; ZUANON *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos têm mostrado que larvas de cavalos marinhos nos primeiros dias de vida podem sobreviver quando submetidas a um curto período, entre 1 e 7 dias, de privação alimentar (CHANG & SHOUTHGATE, 2001; SHENG *et al.*, 2007; WILLADINO *et al.*, 2012; BLANCO *et al.*, 2014; HORA *et al.*, 2015). Tais estudos são importantes porque permitem determinar o tempo máximo no qual os peixes são capazes de suportar a ausência do alimento até alcançar o ponto de não retorno (GISBERT *et al.*, 2004; PEÑA e DUMAS, 2005). Segundo Blaxter e Hempel (1963), ponto de não retorno é quando larvas submetidas à privação alimentar alcançam um estado de inanição irreversível, tornando-se demasiadamente fracas para se alimentar, morrendo em seguida.

3.4 ATIVIDADES DE ENZIMAS DIGESTIVAS

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras dos processos biológicos, aumentando a velocidade da reação bioquímica sem serem consumidas no processo, possuem como função facilitar a digestão. A intensidade da atividade enzimática ao longo do intestino varia com o hábito alimentar e morfologia intestinal dos organismos (KUZ'MINA, 1984; KUZ'MINA e SMIRNOVA, 1992), tipos de alimentos e necessidades nutricionais (MOYANO *et al.*, 1996; MARTÍNEZ *et al.*, 1999).

A atividade das enzimas digestivas têm sido uma ferramenta útil para detectar distúrbios fisiológicos em organismos (CHARRON *et al.*, 2014), sendo indicadores fáceis e confiáveis dos processos digestivos e do estado nutricional das larvas (UEBERSCHAR *et al.*, 1988). As diferenças nas atividades das enzimas digestivas no desenvolvimento inicial podem refletir mudanças na capacidade digestiva e podem ser usadas para identificar transições alimentares precoces do desenvolvimento (HAMMER *et al.*, 2000).

Enzimas pancreáticas parecem ser particularmente sensíveis à privação de alimento em larvas de teleósteos (ZAMBONINO INFANTE e CAHU, 2001). Segundo Lira (2018), larvas de *H. reidi* já apresentam atividades de tripsina, quimotripsina e

amilase, desde o primeiro dia de vida. A mesma autora afirma que, a taxa de ingestão nesta idade foi baixa, comparada às larvas com mais idade, sugerindo que a atividade destas enzimas estariam mais ligadas às enzimas do saco vitelínico da própria larva do que do alimento vivo (CHONG *et al.*, 2002; KORTNER *et al.*, 2011; SANZ *et al.*, 2011).

Com a reabsorção do saco vitelínico, começam a ocorrer mudanças metabólicas, como a diferenciação e a maturidade de órgãos especializados para a digestão e a reabsorção dos nutrientes (DABROWSKI, 1989), além disso, as larvas começam a depender de enzimas exógenas dos alimentos vivos, para a hidrólise dos principais nutrientes, como proteínas, lipídios e hidratos de carbono (GISBERT *et al.*, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DOS ANIMAIS E CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO

Reprodutores de *H. reidi* selvagens foram coletados em Marataízes, Espírito Santos (autorização SISBIO/ICMBio n° 22051-5) e utilizados durante o experimento realizado no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina. As análises enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Bioquímica, UFSC.

Foram formados nove casais de reprodutores mantidos separadamente em aquários de 90L, conectados a um sistema de tratamento e recirculação de água equipado com skimmer, filtro biológico de cerâmica, filtro mecânico (Shark Bag 50 Micra). Os cavalos-marinhos foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas escuro, temperatura controlada através de termostatos-aquecedores a $26,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (média \pm desvio padrão), monitorada diariamente com um termômetro de mercúrio. A salinidade foi mantida em $25,0 \pm 2,0 \text{ g L}^{-1}$, verificada diariamente através de um refratômetro óptico. Os testes de qualidade de água eram realizados semanalmente, mantendo-se o pH a $8,0 \pm 0,5$, e o nitrito e a amônia total abaixo de $0,25 \text{ mg /L}$.

Os reprodutores foram alimentados duas vezes ao dia com uma dieta constituída de pós-larvas (PL 20) de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* cultivado, ofertada na quantidade total de 20 PLs (dividido em duas refeições) por reprodutor. Duas vezes na semana, a primeira alimentação era embebida durante 30 min em uma mistura de 1:1 da dieta líquida Epilite-Z/Epicore, rica em ácidos graxos, antes de ser ofertada. Os aquários eram sifonados antes da alimentação para remoção de restos de alimentos e fezes.

Para o experimento, utilizou-se um sistema de recirculação de água equipado com skimmer, filtro biológico de cerâmica, filtro mecânico (shark bag 50 micras) em aquários de 20 L (34,5cm de altura x 24 cm de comprimento x 24 cm de largura) com paredes azuis. O fluxo de água de cada aquário era de 45 L.h^{-1} .

4.2 ALIMENTO VIVO

As culturas de rotífero *Brachionus plicatilis* utilizadas no experimento foram mantidas em caixas de 90 L a 26-28 °C de temperatura e 25 g L⁻¹ de salinidade, alimentados com solução de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), e com trocas de água realizadas duas vezes por semana. Para eclosão da *Artemia* sp., em torno de 1 a 2 g de cistos (High 5 – INVE) foram incubados em cones de 1 L de água a 30-33 g L⁻¹ de salinidade para que eclodissem após 24 h sob luz e forte. Os copépodes *Parvocalanus crassirostris* foram cultivados em bombonas de 200L, mantidos a 24-26°C de temperatura e 33 g L⁻¹ de salinidade, alimentados com alga *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri*.

4.3 DESENHO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Após o nascimento, larvas de cavalos-marinhos, provenientes de três casais de reprodutores, foram divididas em aquários cônicos de 5 L (125 indivíduos por aquário), onde foram testados diferentes tratamentos de privação alimentar em triplicata (Figura 1): Tratamento controle (TC)- larvas alimentadas continuamente desde o nascimento; Tratamento 1 (T1)- larvas submetidas ao jejum do nascimento até o 3º dia, posteriormente alimentadas até o 10º dia; Tratamento 2 (T2)- larvas submetidas ao jejum do nascimento até o 5º dia, posteriormente alimentadas até o 10º dia.



Figura 1: Sistema de recirculação para as larvas (LAPOM). Foto: Autor (2018)

Para todos os tratamentos, durante o período alimentar, a dieta foi composta por rotíferos *Brachionus* sp. ($9 \text{ indivíduos.mL}^{-1}$) e copépodes *Parvocalanus crassirostris* ($0,5 \text{ indivíduos.mL}^{-1}$) até o 2º dia após o nascimento, e a partir do 3º dia aumentou-se a quantidade de copépodes oferecida ($1 \text{ indivíduo.mL}^{-1}$). No 5º ao 10º dia, as larvas eram alimentadas com náuplios de *Artemia* ($9 \text{ indivíduos. mL}^{-1}$). Os alimentos vivos eram oferecidos diariamente três vezes ao dia, às 8:00h; 12:00h e 16:00h.

O fotoperíodo foi ajustado em um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas escuro. Os sistemas de recirculação permaneceram estáticos durante o dia, sendo ligados por 13 horas somente durante a noite (19h00h às 8h00h).

Diariamente eram realizadas trocas parciais (10-20%), por sifonamento da água dos aquários, para remoção de excrementos. Ao longo do experimento e crescimento das larvas, a taxa de renovação foi aumentando gradualmente. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados com uso de termômetro de mercúrio, refratômetro óptico, oxímetro e teste colorimétrico Labcontest®. A temperatura e a salinidade foram mensuradas diariamente, e mantidas em $26,0 \pm 0,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $20 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Semanalmente o pH, o nitrito e a amônia não ionizada eram averiguados através do teste colorimétrico, mantidos respectivamente em $7,6 \pm 0,08$, $\leq 0,50 \text{ mg L}^{-1}$ e $\leq 0,035 \text{ mg L}^{-1}$. O oxigênio foi mensurado com um oxímetro (MO-910, Instrutherm, USA) e manteve-se entre $7,1 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.4 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS

A mortalidade foi verificada diariamente enquanto os tanques eram sifonados. A sobrevivência (S) foi calculada como: $100 \times [(\text{número de sobreviventes no dia}) / (\text{número de larvas inicial} - \text{número de juvenis amostrados no dia})]$.

No dia do nascimento dos filhotes, a altura e o peso, foram estimados a partir da média de 15 indivíduos amostrados ao acaso. A altura foi definida como a soma da altura da coroa, comprimento do tronco e o comprimento da cauda (figura 2). Estas medidas foram determinadas com auxílio do software “DinoCapture”, acompanhado de uma câmera USB Dino-Eye acoplada a uma lupa estereoscópica binocular e o peso aferido em balança analítica de precisão 0,001g.

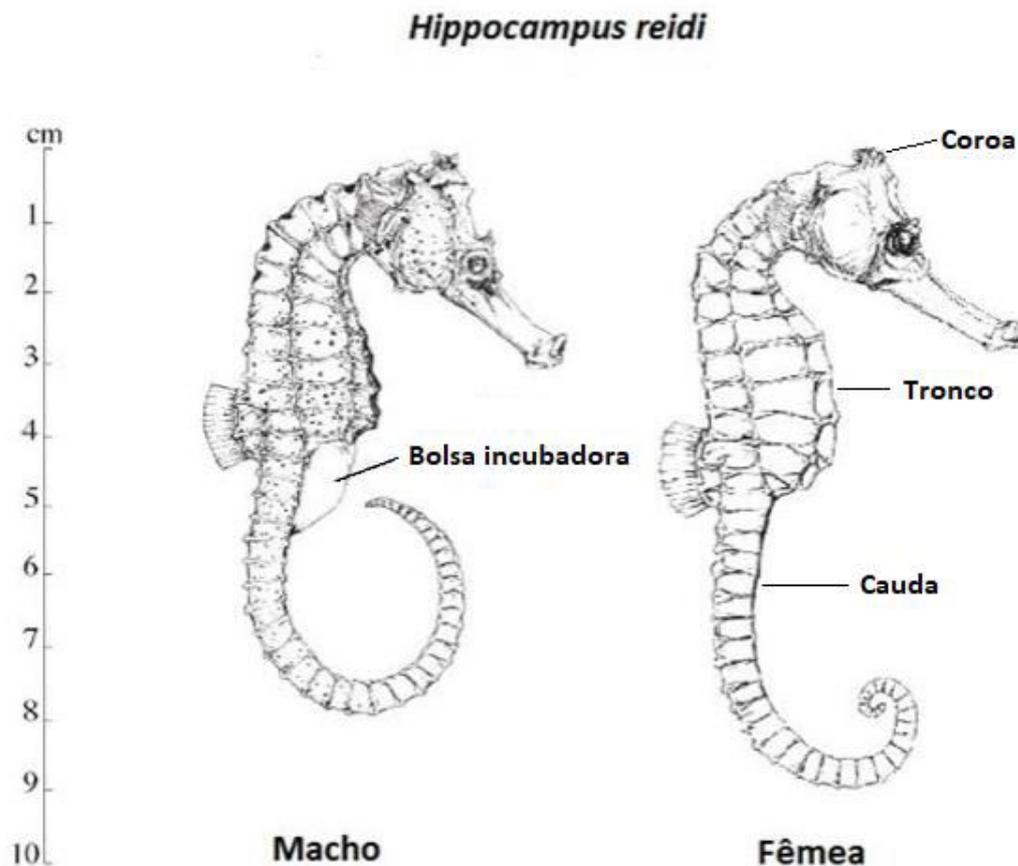


Figura 2: Medidas utilizadas para definir a altura. Foto: Adaptado de LOURIE, S.A.(2003)

4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para as análises enzimáticas, foram coletadas 15 larvas por tratamento nos seguintes dias: Tratamento C (controle) e Tratamento 1: coletas nos 0, 3, 5 e 10 dias de idade; Tratamento 2: coletas com 0, 5 e 10 dias de idade. As amostras foram imediatamente congeladas a -80°C até as análises posteriores. Todos os animais foram anestesiados e eutanasiados com óleo de cravo ($1,5\text{mL L}^{-1}$) (eugenol) (autorização do Comitê de Ética e Uso de Animais CEUA – UFSC nº 5196080616).

4.5.1 EXTRATO ENZIMÁTICO

As amostras foram manualmente processadas em homogeneizador Potter-Ekvehjem. Para obtenção do extrato enzimático, acrescentou-se 15 larvas inteiras de todas as idades estudadas em 2 mL de água destilada. Durante todo o processo de homogeneização, o material foi mantido em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a $15.500 \times g$ por 15 min a 4°C . E o sobrenadante (extrato enzimático) transferido para microtubos.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade de tripsina foi determinada utilizando o substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (bz-R-pNA) e a atividade de quimotripsina o Succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA), ambos dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2 mM e diluída 1:1 (v/v) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5 (concentração final 1 mM). Para análise da atividade enzimática da tripsina e quimotripsina foram misturados 50 μL de extrato enzimático (em triplicata) com 50 μL de substrato tampão (1:1, v/v), e as leituras de absorbância (410 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., California, USA) a cada 15 minutos de incubação a 30°C por 1 h. As atividades de tripsina e quimotripsina foram calculadas em unidades (U), que equivale a 1 μmol de p-nitroanilida formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de p-nitroanilida. No controle negativo, o extrato enzimático foi substituído por água bidestilada.

4.5.3 ATIVIDADE AMILÁSICA

A atividade da amilase foi determinada através da reação do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) com grupos redutores dos carboidratos. Como substrato foi utilizado uma solução de amido a 1% (m/v) em solução tampão (100 mM acetato de sódio, pH 5,5). Durante a reação foram misturados 25 μ L do extrato enzimático (em triplicata) e 25 μ L de substrato, e incubados em banho-maria a 30 °C por 1 h. A reação foi parada a cada 15 min adicionando 100 μ L de DNS. Ao final deste período, os tubos foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria com água a 100 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de água bidestilada em cada tubo, e após homogeneização foram transferidos 150 μ L de cada tubo para uma placa de 96 poços com fundo chato. As leituras de absorbância (550 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., California, USA) e a atividade da amilase foi calculada em unidades (U), que equivale a 1 μ mol de glicose formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de glicose. Como controle, o extrato enzimático foi substituído por água bidestilada.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos inicialmente de um teste de normalidade e homocedasticidade, posteriormente à Análise de Variância (ANOVA) em parcela subdividida para avaliar os efeitos dos tratamentos entre as idades e da mesma idade entre os tratamentos. Em seguida foi realizado o teste de Tukey para os efeitos que foram significativos. As análises foram realizadas pelo programa SAS versão 9.4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO

A taxa de sobrevivência nos diferentes tratamentos ao longo do experimento encontra-se apresentado na Figura 3.

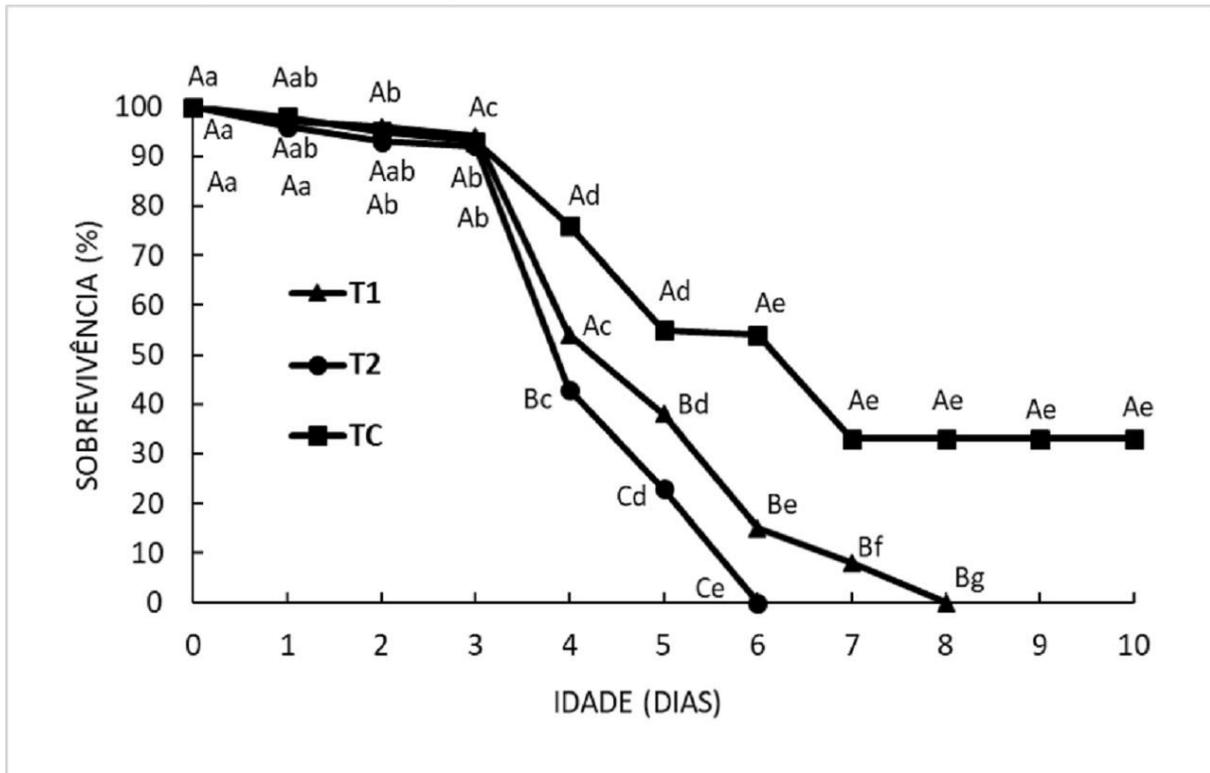


Figura 3: Sobrevivência (média) de larvas de *Hippocampus reidi* submetidas a diferentes dias de privação alimentar. T1= jejum de 3 dias; T2= jejum de 5 dias e TC= Tratamento com alimentação desde o nascimento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade, e minúsculas, diferenças entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$). Barras de desvio ou erro padrão foram retiradas para melhor visualização da figura.

Houve mortalidade de 100% no 8º e 6º dia de idade nos tratamentos em que as larvas de cavalo-marinho ficaram em jejum por 3 (T1) e 5 dias (T2), respectivamente. Hora *et al.* (2016) trabalhando com a mesma espécie, relataram mortalidade de 50% da população (TL50) de larvas de *H. reidi* após 7 dias de privação alimentar em salinidade 10, já na salinidade 20, o TL 50 foi de quase 6 dias (140h). Esta diferença em tempos de sobrevivência em condição de inanição encontrada neste e no nosso trabalho, pode ser uma resposta das larvas utilizadas por Hora *et al.* (2016) serem maiores tanto em peso como em altura em relação ao presente estudo. Larvas de *H. reidi* utilizadas no nosso trabalho morreram em um menor tempo de inanição possivelmente por conta da sua baixa qualidade, podendo estar relacionada com o

fato dos reprodutores serem muito jovens e assim com capacidade reprodutiva ainda inadequada, e sabemos que a resistência das larvas de peixes ao jejum está intimamente ligada à qualidade nutricional do vitelo e parental (RANA 1985; ZHAO *et al.* 2001), temperatura e a fase de desenvolvimento (juvenil ou adulto) em que os reprodutores se encontram (SHAN *et al.*, 2008). Em alguns peixes, mesmo um curto período de privação de alimento após a exaustão do vitelo, são observados problemas nutricionais das larvas, o que leva a uma drástica mortalidade nos estágios iniciais (KJØRSVIK *et al.*, 1991, GWAK e TANAKA, 2001).

Ao final do 10º dia, a sobrevivência no tratamento controle foi de 31%. A baixa sobrevivência nos primeiros 7 dias de vida das larvas dos cavalos-marinhos, é bastante comum por conta da deficiência natural de ácidos graxos essenciais (AGE) em presas vivas, como rotíferos e *Artemia*, comumente usados na larvicultura dos cavalos-marinhos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010). Olivotto *et al.* (2008) e Pham e Lin (2013) trabalhando com *H. reidi*, obtiveram no 10º e 14º dias após o nascimento, 39 e 41% de sobrevivência, respectivamente, com os animais que foram alimentados nos primeiros 6 dias com rotíferos e posteriormente com *Artemia*.

Os cavalos-marinhos nasceram com altura de $6,12 \pm 0,03$ mm e peso de $0,92 \pm 0,02$ mg, considerados valores abaixo dos relatados na literatura. Hora (2015), Massucatto (2016) e Lira (2018), encontraram a altura ao nascer, de $8,52 \pm 0,16$, $7,0 \pm 0,11$ e $8,12 \pm 0,92$ mm, respectivamente e o peso dos recém-nascidos de $1,58 \pm 0,10$; $1,61 \pm 0,39$ e $1,14 \pm 0,22$ mg, respectivamente.

No presente experimento, em geral, as larvas de cavalo-marinho mostraram mesmo crescimento em altura até o 3º dia de idade para qualquer dos tratamentos testados (T1, T2 e TC), o mesmo não aconteceu em relação ao peso dos animais, que na mesma idade, os peixes do tratamento 1 e 2 mostraram diferença significativa em relação ao TC. Assim, os peixes do tratamento T1e TC apresentaram em média, no 3º dia de idade, valores de altura e de peso de 6,60 mm e 1,64 mg, respectivamente. Quanto ao tratamento 2 os valores do peso e altura foram 1,71 e 1,04 vezes menores, respectivamente que o tratamento controle. Pode-se observar que até o 3º dia, a privação alimentar do T1 em relação ao TC não teve influência na altura, no entanto as larvas submetidas à privação foram afetadas no peso e na sobrevivência final.

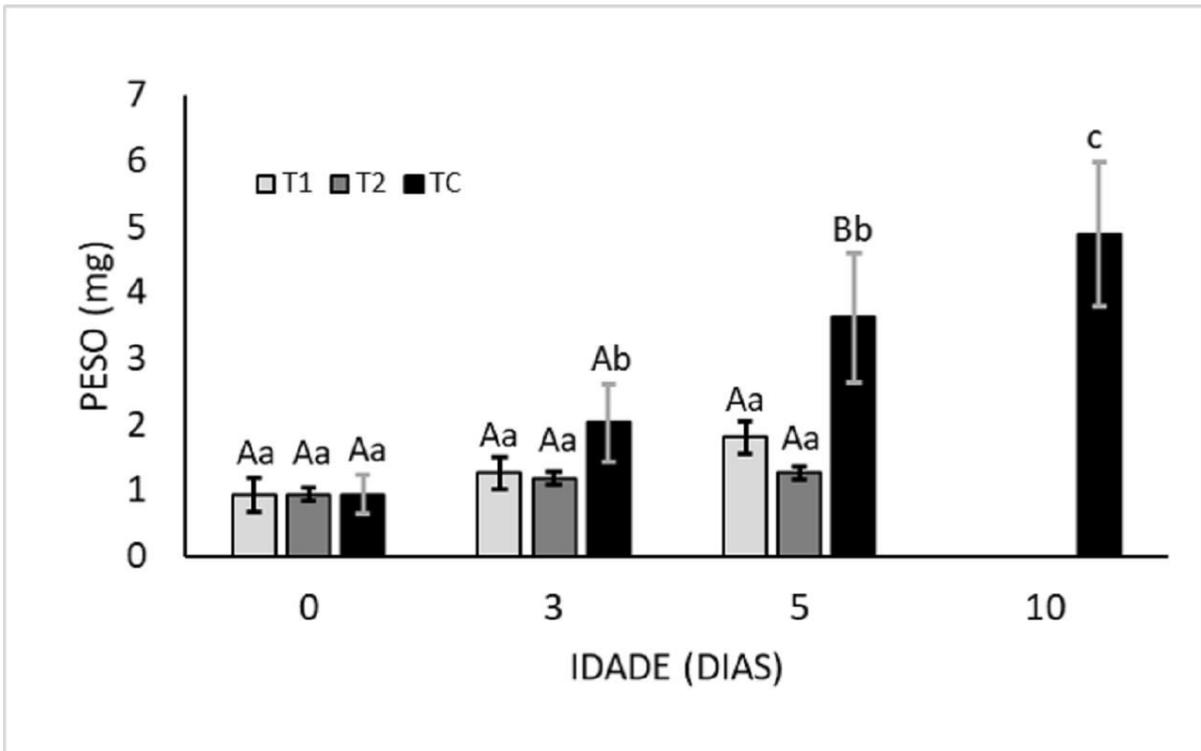


Figura 4: Peso (média ± DP) de larvas de *Hippocampus reidi* submetidas a diferentes dias de privação alimentar. T1= jejum de 3 dias; T2= jejum de 5 dias e TC= Tratamento com alimentação desde o nascimento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade, e minúsculas, diferenças entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

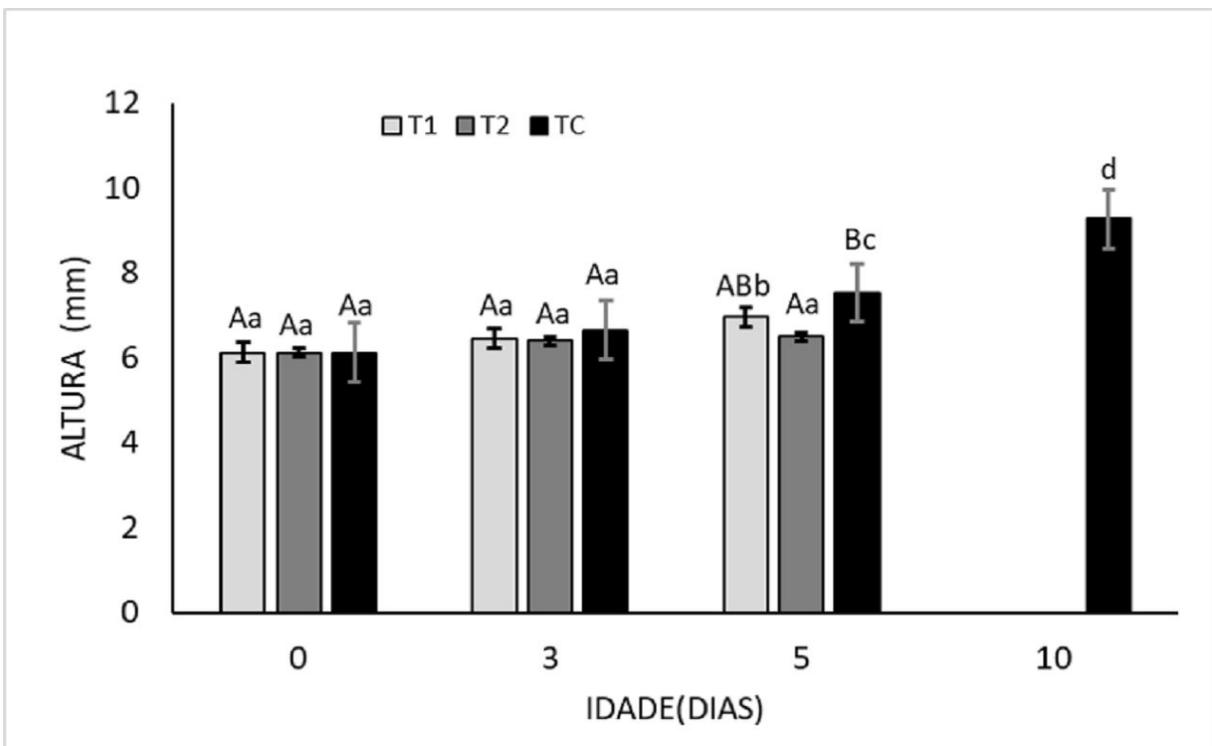


Figura 5: Altura (média ± DP) de larvas de *Hippocampus reidi* submetidas a diferentes dias de privação alimentar. T1= jejum de 3 dias; T2= jejum de 5 dias e TC= Tratamento com alimentação desde o nascimento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade, e minúsculas, diferenças entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Também foi observado que após o 3º dia de vida, o crescimento em peso e altura das larvas de *H. reidi* também foram afetados pelo jejum em ambos os tratamentos, e o crescimento compensatório total não foi observado a partir do 5º dia de vida no tratamento T1, e especialmente no T2. Assim, podemos dizer que em ambos os tratamentos durante a privação alimentar, as reservas energéticas estariam sendo mobilizadas para a manutenção do metabolismo o que resultou em perda de peso corporal, enquanto que na realimentação a alocação dos nutrientes estaria sendo utilizada para a restauração das reservas energéticas, diminuindo desta forma a velocidade de crescimento.

Assim, as larvas de cavalo-marinho nos tratamentos T2 apresentaram crescimento negativo no peso e altura, com valores de $1,26 \pm 0,86$ e $6,49 \pm 0,99$, respectivamente, em relação ao tratamento controle que obtiveram peso e altura de $3,69 \pm 0,99$ e $7,43 \pm 1,03$, respectivamente.

Segundo Sumpter *et al.* (1991), os efeitos da privação alimentar são mais evidentes em larvas e peixes mais jovens devido a maior taxa de crescimento dos animais durante essa fase, quando comparada aos peixes adultos, levando a um consumo maior das reservas armazenadas. Além disso, os autores também afirmam que peixes adultos e de grande porte têm maior quantidade de massa muscular armazenada em seu organismo do que peixes jovens.

5.2 ANÁLISE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática específica da tripsina, quimotripsina e amilase do trato digestório das larvas de cavalo-marinho estão apresentadas nas Figuras 6, 7 e 8.

Conforme o resultado dos dados das análises de enzimas digestivas, foi observado que no 3º dia de vida não houve diferença significativa na atividade enzimática das larvas do tratamento T1 (3 dias de jejum) e T2 (5 dias de jejum) em relação ao TC (controle), sendo a média da atividade específica da tripsina, quimotripsina e amilase dos três tratamentos de aproximadamente $3,87 \text{ U mg de proteína}^{-1}$; $3,98 \text{ U mg de proteína}^{-1}$; e $15,50 \text{ U mg de proteína}^{-1}$, respectivamente.

Possivelmente, este resultado encontrado nas análises enzimáticas em relação às larvas com 3 dias de vida nestes tratamentos tenha ocorrido devido ao fato das larvas ainda apresentarem vitelo. De acordo com Novelli *et al.* (2015), *H. reidi* possui saco vitelínico até o 2º dia após o nascimento. A outra explicação para o fato de não

haver diferença significativa nas atividades enzimáticas entre os cavalos-marinhos com três dias de vida que estavam em jejum em comparação aos que se alimentavam desde o início do experimento, tenha sido por conta da pouca absorção dos nutrientes inicialmente ingeridos ou pela baixa digestibilidade dos animais continuamente alimentados. De acordo com Rotta (2003), este pouco aproveitamento do alimento ingerido, ocorre devido ao fato de não ter havido ainda a total reabsorção do vitelo, bem como do trato digestivo das larvas ainda não estar bem desenvolvido.

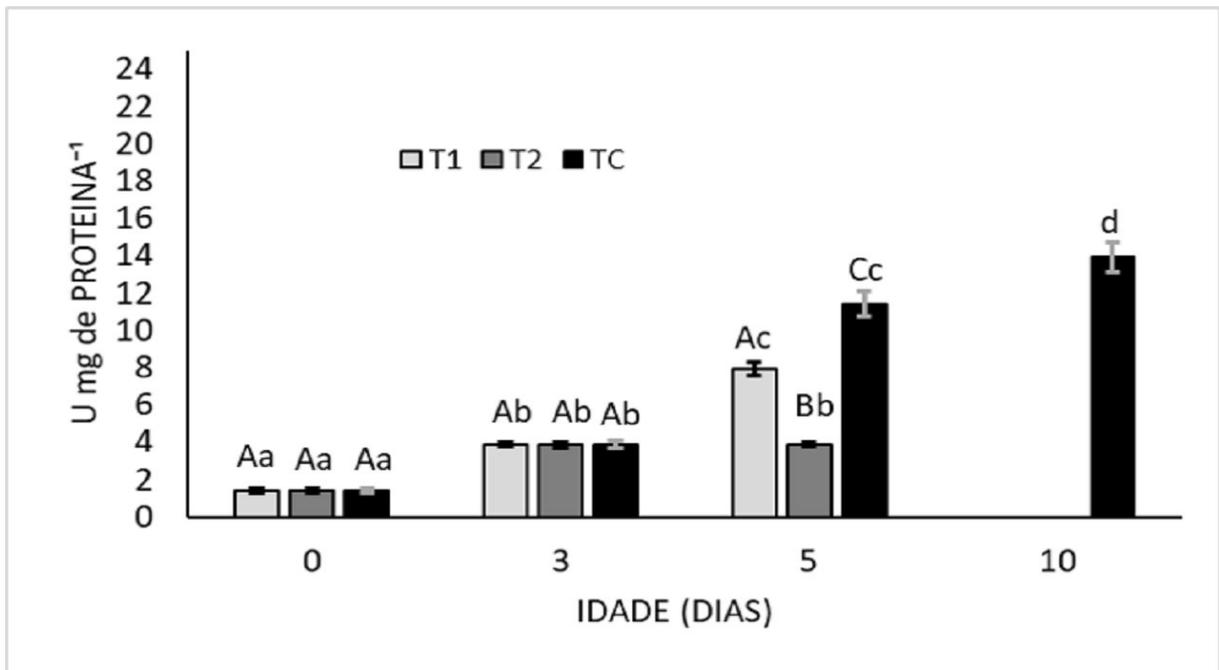


Figura 6: Atividade enzimática (média \pm DP) específica da tripsina das larvas de *Hippocampus reidi* submetidas a diferentes dias de privação alimentar. T1= jejum de 3 dias; T2= jejum de 5 dias e TC= Tratamento com alimentação desde o nascimento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade, e minúsculas, diferenças entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,0001$).

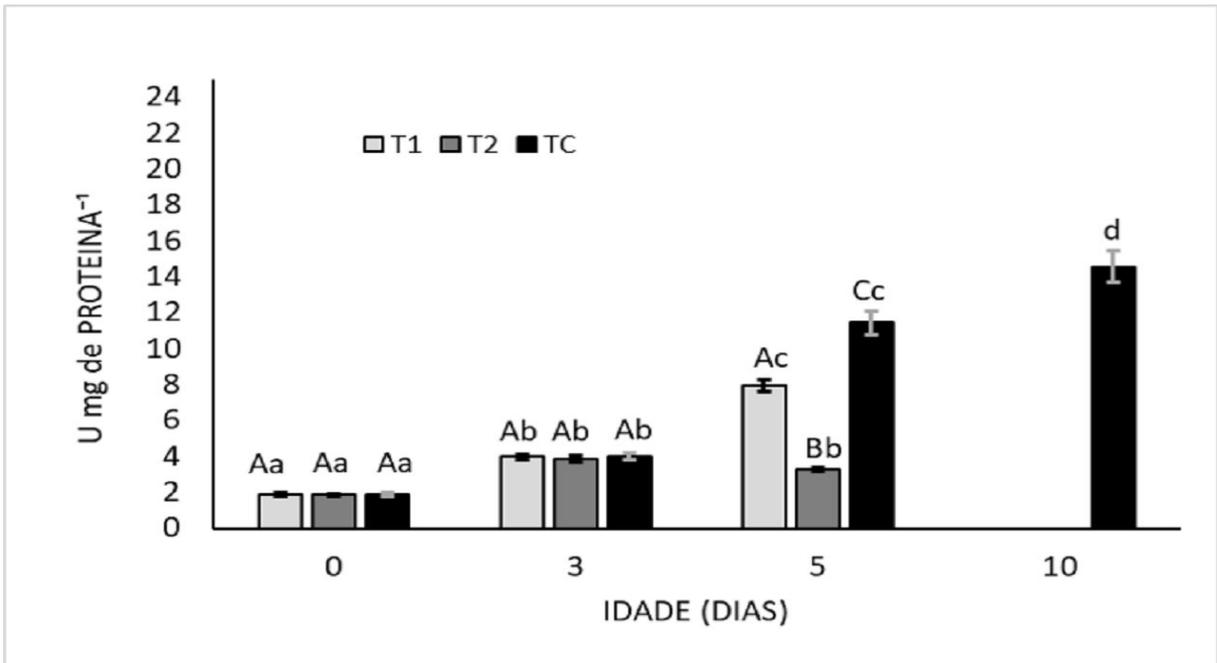


Figura 7: Atividade enzimática (média \pm DP) específica da quimotripsina das larvas de *Hippocampus reidi* submetidas a diferentes dias de privação alimentar. T1= jejum de 3 dias; T2= jejum de 5 dias e TC= Tratamento com alimentação desde o nascimento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade, e minúsculas, diferenças entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,0001$).

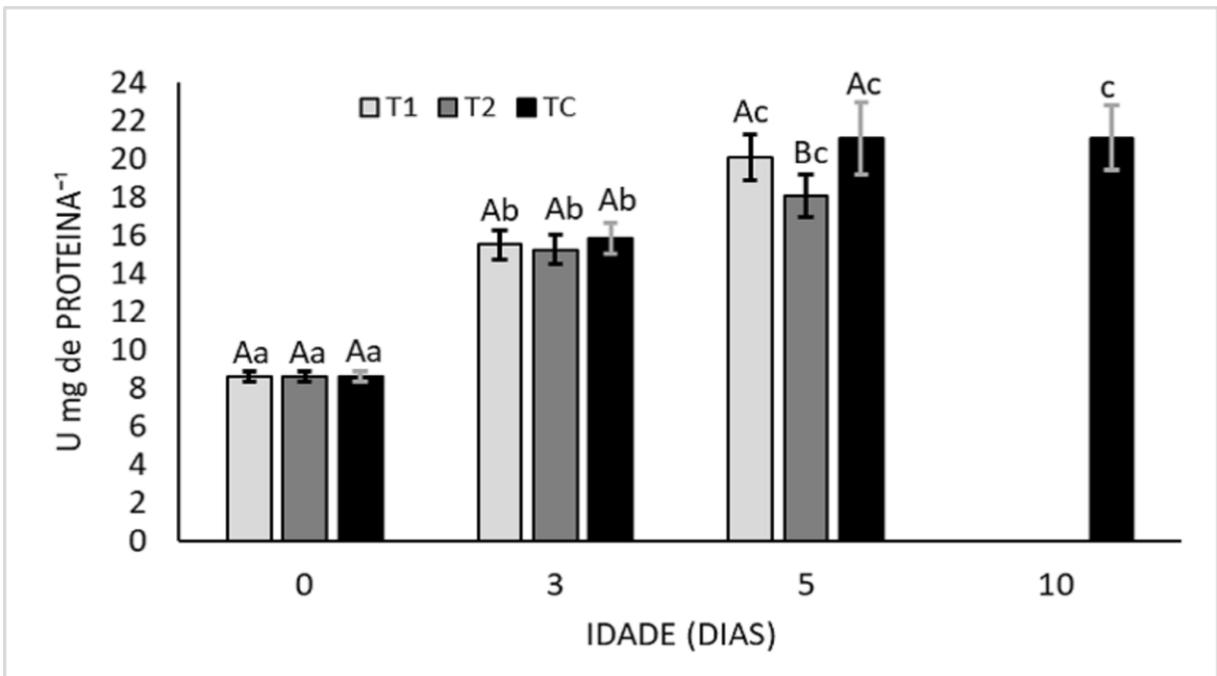


Figura 8: Atividade enzimática (média \pm DP) específica da amilase das larvas de *Hippocampus reidi* submetidas a diferentes dias de privação alimentar T1= jejum de 3 dias; T2= jejum de 5 dias e TC= Tratamento com alimentação desde o nascimento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade, e minúsculas, diferenças entre as idades no mesmo tratamento ($p < 0,0001$).

Já no quinto dia após o nascimento, houve diferença significativa na atividade das enzimas analisadas entre os tratamentos TC, T1 e T2 (Figuras 6, 7 e 8). O T1 apresentou valores menores de atividade específica da tripsina de $7,95 \pm 0,34$ U mg

de proteína⁻¹, da quimotripsina de 7,95±0,34 U mg de proteína⁻¹ e da amilase de 20,08±1,82 U mg de proteína⁻¹, respectivamente, quando comparados com as atividades de tripsina (11,43±0,67 U mg de proteína⁻¹), quimotripsina (11,43±0,67 U mg de proteína⁻¹) e amilase (21,08±1,9 U mg de proteína⁻¹) das larvas do TC. Já o T2, obteve valores de atividade específica da tripsina, quimotripsina, e amilase, 2,92; 3,53 e 1,16 vezes menor, respectivamente, em relação TC.

Provavelmente, os resultados aqui encontrados nas larvas com 5 dias de vida que sofreram privação alimentar durante 3 e 5 dias e mostraram uma diminuição significativa da atividade específica da tripsina, quimotripsina e amilase em relação as larvas foram alimentadas desde o nascimento, ocorreu por conta da falta de contribuição do alimento vivo (KOLKOVSKI, 2001). Esta contribuição acontece em grande parte pela ação das enzimas presentes no alimento vivo (exógenas), que são liberadas pela ação física das larvas durante a ingestão, desencadeando a hidrólise das moléculas complexas do próprio zooplâncton ingerido e estimulando a secreção das enzimas endógenas do trato digestivos das larvas (KUBTIZA, 1997 e 1998).

Em relação a atividade enzimática no mesmo tratamento em diferentes idades, foi observado que o T1 e o TC apresentaram um aumento gradativo da atividade específica de tripsina, quimotripsina e amilase conforme o avanço da idade. No 3º dia de vida, os valores das atividades específicas da tripsina, quimotripsina e amilase foram em média de 3,85 U mg de proteína⁻¹; 3,98 U mg de proteína⁻¹; e 15,68 U mg de proteína⁻¹, respectivamente. Diferente dos demais tratamentos, o T2 não apresentou um aumento entre o 3º ao 5º dia na atividade específica de tripsina e quimotripsina, já na amilase o aumento ocorreu de forma gradativa até o 5º dia.

No presente estudo, o aumento da atividade enzimática em larvas submetidas à privação alimentar, pode estar relacionada com as enzimas provenientes do próprio saco vitelínico das larvas (CHONG *et al.*, 2002), ou seja, as larvas de *H. reidi* ainda possuem enzima endógena suficiente para digerir os alimentos. Como observado no presente estudo, com o fornecimento de alimento vivo, a atividade das enzimas aumentou gradativamente no T1 e TC, visto que os alimentos vivos contribuem no processo de digestão dos peixes (KOLKOVSKI, 2001), e essa contribuição pode ser realizada de forma direta, onde os produtos da autólise dos alimentos estimulam a produção de enzimas (PERSON-LE RUYET, 1993) e indireta, na qual o alimento vivo incrementa a produção da bombesina (peptídeo que estimula o movimento peristáltico do intestino) (KOLKOVSKI, *et al.*, 1997; KOLKOVSKI,

2001). Já no T2, podemos justificar a estabilidade na atividade específica de tripsina e quimotripsina até o 5º dia de vida, pelo fato da privação alimentar em que as larvas deste tratamento foram submetidas.

As enzimas digestivas, naturalmente são secretadas no organismo durante todo o processo ontogenético das larvas (idade) e sua quantidade depende do tipo e do manejo alimentar, (tipo de alimentos, frequência alimentar, privação alimentar, entre outros. No caso da tripsina, o resultado aqui encontrado é característico dessa protease, pois esta enzima é a ativadora comum de todos os zimogênios pancreáticos e, assim, ela converte outras moléculas de tripsinogênio em tripsina e desencadeia uma cascata de atividade proteolítica (KOLKOVSKI, 2001; ROTTA, 2003; KLOMKLAO, 2008 OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Uma das proteases que não são analisadas nos trabalhos com cavalo-marinho, é a quimotripsina (WARDLEY, 2006; BLANCO *et al.*, 2016; NOVELLI *et al.*, 2016). Esta enzima em larvas de peixes é secretada em maior quantidade quando os animais ainda não possuem estômago, e quando ocorre o desenvolvimento desse órgão, a quimotripsina diminui de acordo que aumenta as proteases aspárticas (ALARCON *et al.*, 1998). No presente estudo, mostrou-se que o aparecimento desta enzima ocorreu e aumentou durante as idades simultaneamente com a da tripsina.

As atividades de quimotripsina do nascimento até o 10º dia de vida apresentada neste trabalho possivelmente está relacionada à não existência da digestão ácida dos cavalos-marinhos, já que em peixes agátricos, como é o caso do cavalo-marinho, a atividade das proteases serínicas (tripsina e quimotripsina por exemplo) podem compensar a atividade das proteases aspárticas ou ácidas (pepsina, renina e protease microbiana) (ALARCON *et al.*, 1997). Lembrando que em animais em jejum, as atividades enzimáticas foram oriundas do saco vitelínico.

No presente estudo, a atividade da amilase foi detectada desde o nascimento das larvas e foi aumentando gradativamente até o final do experimento (10 dias), em animais privados ou não de alimentação, o que difere dos relatos encontrados na literatura, onde a atividade da amilase na maioria das espécies de peixes marinhos carnívoros diminui progressivamente durante a ontogenia das larvas (KUZ'MINA, 1996; ZAMBONINO-INFANTE e CAHU, 2001; ZAMBONINO-INFANTE *et al.*, 2008).

No entanto, independente do tratamento e das idades das larvas de *H. reidi* neste trabalho, foi observado um aumento progressivo da atividade da amilase. A possível explicação para o aumento gradativo da atividade da amilase no *H. reidi*

nos diferentes tratamentos (T1, T2 e TC), talvez esteja na programação genética dessa espécie, corroborando com Péres *et al.*, (1998) e Zambonino-Infante e Cahu (2001), que sugerem que larvas com altos níveis iniciais e contínuo de amilase podem ser devido ao resultado da expressão gênica programada, ou seja, essas larvas possuem um alto nível de mRNA amilase, no qual controla a produção dessa enzima.

Observou-se que a atividade específica da tripsina, quimotripsina e amilase das larvas que foram alimentadas com rotíferos e *Artemia* nos primeiros 10 dias, foi bem inferior quando comparado aos demais trabalhos encontrados na literatura com cavalos-marinhos *Hippocampus guttulatus* (BLANCO *et al.*, 2016), *H. reidi* (NOVELLI *et al.*, 2016) e *Hippocampus abdominalis* (WARDLEY, 2006), possivelmente esse baixo valor das enzimas, deva estar relacionado à deficiência dos filhotes nascidos de pais recém maturos ou da primeira maturação, por serem bastante jovens e/ou a qualidade nutricional inadequada do vitelo.

Observou-se que no TC, todos os parâmetros analisados (altura, peso, atividade enzimática) foram positivos em relação aos tratamentos T1 e T2, porém se comparados a outros trabalhos com o gênero *Hippocampus*, esses resultados aqui encontrados são inferiores aos relatados na literatura, o que corrobora com o que foi discutido anteriormente em relação a estarem próximos à primeira maturação.

Desta forma, todos os dados aqui obtidos são possivelmente o resultado da capacidade reprodutiva reduzida dos reprodutores ainda muito jovens, resultando em uma menor qualidade dos ovos e das larvas. Assim, a utilização de cavalos-marinhos menores (com alturas inferiores ou iguais a $\cong 14$ cm), como o do presente trabalho, mesmo maturos sexualmente, não tiveram desempenho reprodutivo satisfatório. Além de verificado que as larvas nasceram fracas e com altura e peso inferior a outros trabalhos, os reprodutores também apresentaram diversas situações de inaptidão fisiológica para a reprodução como: abortos (larvas recém-nascidas mortas), partos prematuros (partos antes da data prevista resultavam em muitas larvas recém-nascidas mortas e/ou mal formadas e larvas vivas de má qualidade), e a rejeição de ovócitos da fêmea pelo macho (ovócitos eram encontrados no fundo do aquário). Faleiro (2016) comprovou a importância do tamanho dos cavalos-marinhos em relação ao potencial reprodutivo, sendo que pais maiores produziram larvas maiores, com maior probabilidade de maior sobrevivência. Estudos com *H. guttulatus* relatam que fêmeas maiores produzem oócitos maiores, com maior

quantidade de vitelo. Uma relação positiva entre o tamanho da fêmea e do oócito também foi encontrado em outros singnatídeos (por exemplo, BERGLUND *et al.*, 1986; GASPARINI e TEIXEIRA, 1999; TEIXEIRA e MUSICK, 2001; WATANABE, 2002). Em relação à capacidade reprodutiva de cavalos-marinhos machos, o tamanho do macho e da sua bolsa incubadora é positivamente correlacionado com o comprimento de juvenis recém-nascidos (FALEIRO, *et al.*, 2016). Além disso, casais com tamanhos distintos podem justificar a rejeição de ovócitos pelo macho, visto que muitos ovócitos não podem ser transferidos para a bolsa de machos menores, comparados às fêmeas, pois o número de larvas depende da capacidade de carga da bolsa incubadora do macho (TEIXEIRA e MUSICK, 2001).

Não foi possível identificar o dia exato do ponto de não retorno (PNR), devido aos fatores citados no parágrafo acima e a qualidade do alimento vivo ofertado após o período de privação alimentar. Sabendo que a capacidade de resistência à privação de alimentos antes do PNR depende do tamanho das larvas, da temperatura e das espécies de peixes (BLAXTER e EHRLICH, 1974; HOUDE, 1974) e as larvas estudadas de *H. reidi* nasceram com altura e peso inferiores, sugere-se que um novo estudo seja realizado com reprodutores e larvas maiores. Adicionalmente, é importante que a alimentação seja composta por maior quantidade de copépode nos tratamentos após a privação alimentar e no tratamento controle, verificando o real desempenho da larva e a sua resistência perante a privação alimentar, além do conhecimento do período exato de ponto de não retorno das larvas de *H. reidi*.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, concluímos que a privação alimentar de 3 e 5 dias após o nascimento resultaram em baixa sobrevivência, crescimento e produção de enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina e amilase) até o 10º dia, se comparados ao tratamento controle, observando que os tratamentos em inanição não atingiram o crescimento compensatório. No caso deste estudo, o resultado pode estar relacionado com a inaptidão fisiológica e a capacidade reprodutiva reduzida dos cavalos-marinhos jovens, visto que os reprodutores apresentaram abortos, partos prematuros, rejeição de ovócitos da fêmea pelo macho, além da baixa qualidade de ovos e larvas recém-nascidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, F. J.; DIAZ, M.; MOYANO, F. J. Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications. **Cahiers Options Méditerranéennes**, v.22, p.113-121, 1997.

BERGLUND, Anders; ROSENQVIST, Gunilla; SVENSSON, Ingrid. Mate choice, fecundity and sexual dimorphism in two pipefish species (Syngnathidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 19, n. 4, p. 301-307, 1986.

BERSANO, J. G. F.; BUSKEY, E. J.; VILLAREAL, T. A. Viability of the Texas brown tide alga, *Aureoumbra lagunensis*, in fecal pellets of the copepod *Acartia tonsa*. **Plankton Biology and Ecology**, v. 49, n. 2, p. 88-92, 2002.

BLANCO, A.; PLANAS, M.; MOYANO, F.J. Ontogeny of digestive enzymatic capacities in juvenile seahorses *Hippocampus guttulatus* fed on different live diets. **Aquaculture Research**, p.1–12, 2016.

BLANCO, A.; CHAMORRO, A.; PLANAS, M. Implications of physical key factors in the early rearing of the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. **Aquaculture**, v. 433, p. 214-222, 2014.

BLAXTER, J. H. S.; EHRLICH, K. F. Changes in behaviour during starvation of herring and plaice larvae. In: **The early life history of fish**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1974. p. 575-588.

BURHANS, R. A.; MELECHINSKY, D. Seahorse husbandry and propagation. In: **American Zoo and Aquarium Association (AZA) Annual Conference Proceedings**. 2000. p. 19-26.

CAHU, C.L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; BARBOSA, V. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *British Journal of Nutrition*, v. 90, n. 1, p. 21-28, 2003.

CASTRO, A.L.C; DINIZ, A.D., MARTINS, I.Z., VENDEL, A.L., DE OLIVEIRA, T.P.R.; ROSA, I.M.D.. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) as a study-case. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 4, p. 637-644, 2008.

CHANG, M.; SOUTHGATE, P.C. Effects of varying dietary fatty acid composition on growth and survival of seahorse, *Hippocampus* sp., juveniles. **Aquarium Sciences and Conservation**, v. 3, n. 1-3, p. 205-214, 2001.

CHARRON, L.; GEFFARD, O.; CHAUMOT, A.; COULAUD, R.; JAFFAL, A.; GAILLET, V.; DEDOURGE-GEFFARD, O.; GEFFARD, A. Influence of molting and

starvation on digestive enzyme activities and energy storage in *Gammarus fossarum*. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e96393, 2014.

CHONG, A.; HASHIM, R.; LEE, L.C., & ALI, A.B. (2002). Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciata* larva. **Aquaculture research**, v. 33, n. 9, p. 663-672, 2002.

CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna), 2014. Appendices I, II e III. www.cites.org. (Downloaded on 01 November 2017)

CONCEIÇÃO, L.E.; YÚFERA, M.; MAKRIDIS, P.; MORAIS, S.; DINIS, M.T. Live feeds for early stages of fish rearing. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 613-640, 2010.

DABROWSKI, K. (1989). Ontogenetic changes in the fish larval gut. In: Harvey B, Carolsfeld J (eds) Encontro de Larvicultura. **Canadian International Development Agency (ICSU)**, Pirassununga, SP, p.167, 1989.

DABROWSKI, K.; POZYCZYNSKI, P.; KÖCK, G. & BERGER, B. (1989). Effect of partially or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New in vivo test for exocrine pancreatic secretion. **Aquaculture**, v. 77, n. 1, p. 29-49, 1989.

DE SEIXAS FILHO, J.T.; DE MOURA BRÁS, J.; DE MENDONÇA GOMIDE, A. T.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G.; DONZELE, J. L.; & MENIN, E. (2000). Anatomia Funcional e Morfometria dos Intestinos e dos Cecos Pilóricos do Teleostei (Pisces) de Água Doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). **Rev. bras. zootec**, v. 29, n. 2, p. 313-324, 2000.

DOI, M.; OHNO, A.; TAKI, Y.; SINGHAGRAIWAN, T.; & KOHNO, H. (1997). Nauplii of the calanoid copepod, *Acartia sinjiensis* as an initial food organism for larval red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. **Aquaculture Science**, v. 45, n. 1, p. 31-40, 1997.

FALEIRO, F; ALMEIDA, A.J.; RÉ, P.; & NARCISO, L.. Size does matter: An assessment of reproductive potential in seahorses. **Animal reproduction science**, v. 170, p. 61-67, 2016.

FAULK, C.K.; HOLT, G.J. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. **Aquaculture**, v. 249, n. 1-4, p. 231-243, 2005.

FELÍCIO, A.K.C.; ROSA, I.L.; SOUTO, A.; & FREITAS, R.H. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. **Journal of ethology**, v. 24, n. 3, p. 219-225, 2006.

FIGUEIREDO, J.L de; MENEZES, N.A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil**. Universidad de São Paulo, Museu de Zoologia, 1980.

FLEEGER, J.W. The potential to mass-culture harpacticoid copepods for use as food for larval fish. **Copepods in aquaculture**, p. 11-24, 2005.

FOSTER, S. J.; VINCENT, A. C. J. Making Non-Detriment Findings for seahorses—a framework, Version 4. **Project Seahorse**, 2016.

FOSTER, S.J.; VINCENT, A.C.J. Conservation in practice: enhancing sustainability of the international trade in seahorses with a single minimum size limit. **Conservation Biology**, p.1044-1050, 2005.

FOSTER, S.J.; VINCENT, A.C.J. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. **Journal of Fish Biology** v.65, p.1–61, 2004.

FOSTER, S.; WISWEDEL, S.; VINCENT, A. Opportunities and challenges for analysis of wildlife trade using CITES data—seahorses as a case study. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 26, n. 1, p. 154-172, 2016.

FROESE, R.; ZELLER, D.; KLEISNER, K.; & PAULY, D. Worrysome trends in global stock status continue unabated: a response to a comment by RM Cook on “What catch data can tell us about the status of global fisheries”. **Marine biology**, v. 160, n. 9, p. 2531-2533, 2013.

GASPARINI, J.L.; TEIXEIRA, R.L. Reproductive aspects of the gulf pipefish, *Syngnathus scovelli* (Teleostei: Syngnathidae), from Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 1, p. 87-90, 1999.

GISBERT, E.; CONKLIN, D. B.; PIEDRAHITA, R. H. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 1, p. 116-132, 2004.

GISBERT, E.; MORAIS, S.; MOYANO, F. J. Feeding and digestion. Larval fish aquaculture. **Nova Publishers, New York**, 2013.

GISBERT, E.; WILLIOT, P. Larval behaviour and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian sturgeon. **Acipenser baeri**, p. 63-76, 1997.

GIWOJNA, P., 2002. Ocean rider: a horse of a different color. *Freshwater and Marine Aquarium*, vol. 3, no. 3, p. 122-150.

GWAK, W.S.; TANAKA, M. Developmental change in RNA:DNA ratios of fed and starved laboratory-reared Japanese flounder larvae and juveniles, and its application to assessment of nutritional condition for wild fish. **Journal of fish Biology**, v.59, p.902–915, 2001.

HAMMER, H.S.; BISHOP, C.D.; WATTS, S.A. Activities of three digestive enzymes during development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda). **Journal of Crustacean Biology**, v. 20, n. 4, p. 614-620, 2000.

HARASTI, D. Declining seahorse populations linked to loss of essential marine habitats. **Marine Ecology Progress Series**, v. 546, p. 173-181, 2016.

HARASTI, D.; MARTIN-SMITH, K.; GLADSTONE, W. Does a no-take marine protected area benefit seahorses?. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105462, 2014.

HEMING, T.A. Effects of temperature on utilization of yolk by chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs and alevins. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 39, n. 1, p. 184-190, 1982.

HEMPEL, G.; BLAXTER, J.H.S. On the condition of herring larvae. **Rapp PV Réunion Cons Int Explor Mer**, v. 154, p. 35-40, 1963.

HOFF, F.; SNELL, T.; NESLEN, J. Plankton culture manual, 6th edn. Florida Aqua Farms. **Inc., Dade City, FL**, 2008..

HOLT, G.J. Research on culturing the early life stages of marine ornamental fish. **Marine ornamental species: collection, culture and conservation**, p. 252-254, 2003.

HORA, M.S.C. Determinação de condições bióticas e abióticas ideais durante o estágio inicial de desenvolvimento de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* cultivados. 82 f. **Tese** (Doutorado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

HORA, M.S.C.; JOYEUX, J-C. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 292, n. 12, p. 37-42, 2010.

HORA, M.S.C.; JOYEUX, J-C.; RODRIGUES, R.V.; DE SOUSA-SANTOS, L.P.; GOMES, L.C., & TSUZUKI, M.Y. Tolerance and growth of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* at different salinities. **Aquaculture**, 463, 1-6, 2016.

HOUDE, E. D. Effects of temperature and delayed feeding on growth and survival of larvae of three species of subtropical marine fishes. **Marine biology**, v. 26, n. 3, p. 271-285, 1974.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis). Lista de exportação e importação de peixes ornamentais. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/biodiversidade134aquatica/aquariofilia/lista-de-peixes-permitidos-parapesca?id=969>. Acesso em: 09 de Setembro de 2018.

INFANTE, JL Zambonino; CAHU, C. L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 477-487, 2001.

ITIS (Integration Taxonomic Information System). Disponível em: <<http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt/>>. Acesso em: 06 de Setembro de

2018.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2. [WWWDocument]. URL. <http://www.redlist.org>. Acesso em: 28 de Agosto de 2018

JOMORI, R.K. et al. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.

KJØRSVIK, E.; VAN DER MEEREN, T.; KJRYVI, H.; ARNFINNSON, J.; KVENSETH, P.G. Early development of the digestive tract of cod larvae *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. **Journal of fish Biology**, V.38, p.1–15, 1991.

KLOMKLAO, S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, p.37–48, 2008.

KOLDEWEY, H.J.; MARTIN-SMITH, K.M. A global review of seahorse aquaculture. **Aquaculture**, v. 302, n. 3-4, p. 131-152, 2010.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v.200, p.181–201, 2001.

KORTNER, T.M.; OVERREIN, I.; ØIE, G.; KJØRSVIK, E.; BARDAL, T.; WOLD, P.A.; & ARUKWE, A. (2011). Molecular ontogenesis of digestive capability and associated endocrine control in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 2, p. 190-199, 2011.

KRAUL, S.; NELSON, A.; BRITTAIN, K.; AKO, H.; & OGASAWARA, A. Evaluation of live feeds for larval and postlarval mahimahi *Coryphaena hippurus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 23, n. 4, p. 299-306, 1992.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de peixes. **Piracicaba**, p.74, 1997.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação dos peixes cultivados. Campo Grande, Mato Grosso do Sul: **Ed. Projeto Pacu/Agropeixe**, p.108, 1998.

KUHLMANN, D.; QUANTZ, G.; WITT, U. Rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) on cultured food organisms and postmetamorphosis growth on natural and artificial food. **Aquaculture**, v. 23, n. 1-4, p. 183-196, 1981.

KUITER, R. H. Seahorses and their relatives. Seaford: Aqua Photographics, 334 p, 2009.

KUMARAVEL, K.; RAVICHANDRAN, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; & SONNESCHEIN, L. Seahorses—A source of traditional medicine. **Natural product research**, v. 26, n. 24, p. 2330-2334, 2012.

KUZ'MINA, V.V. Relative enzyme activity of the intestinal lumen and mucosa. *Journal of Ichthyology*, v. 24, p. 140-144, 1984.

KUZ'MINA, V.V.; SMIRNOVA, Y.G. Distribution of alkaline phosphatase activity along the length of the intestine of freshwater teleosts. **Journal of Ichthyology**, v. 32, p. 1-9, 1992.

LEYSEN, H.; ROOS, G.; ADRIAENS, D. Morphological variation in head shape of pipefishes and seahorses in relation to snout length and developmental growth. **Journal of morphology**, v. 272, n. 10, p. 1259-1270, 2011.

LIN, Q. et al. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. **Aquaculture**, v. 262, n. 2-4, p. 481-492, 2007.

LIRA, A.P. Caracterização do trato digestório e avaliação da sobrevivência e do crescimento na larvicultura do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* alimentado com copépode selvagem e *Artemia* suplementada com pancreatina suína. 144 f. **Tese** (Doutorado em aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

LOURIE, S.A.; FOSTER, S.J.; COOPER, E.W.T.; VICENT, A.C.J. A Guide to the identification of seahorses. **Project Seahorse and TRAFFIC North America**. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife fund, 2004.

LOURIE, S.A.; VINCENT, A.C.J; HALL, H.J. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. **Project Seahorse**, 1999.

LUZ, R.; PORTELLA, M.C. Diferentes densidades de estocagem na larvicultura do trairão *Hoplias lacerdae*. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, p. 95-101, 2005.

MA, H.; CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.; YU, H.; DUAN, Q.; LE GALL, M-M.; MAI, K. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Aquaculture**, v.245, p.239–248, 2005.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I. et al. The content and nutritional significance of minerals on fish flesh in the presence and absence of bone. **Food Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 503-509, 2000.

MASSUCATTO, A. Influência do copépodo *Acartia* sp. e uso de probiótico nos estágios iniciais de cultivo do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*. 60 f. **Dissertação** (Mestrado em aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MELO-VALENCIA, A.F. et al. Efecto de la salinidad en la supervivencia y crecimiento de crías de caballito de mar *Hippocampus reidi* Ginsburg en cautiverio. **Bol. Inv. Mar. Cost**, v. 42, n. 1, p. 193-201, 2013.

MOYANO, F.J. et al. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 121-130, 1996.

MMA (Ministério do Meio ambiente). Lista das Espécies da fauna Brasileira Ameaçadas de extinção. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/comunicacao/noticias/4destaques/6658-mma-e-icmbio-divulga-novas-listas-de-especies-ameacadas-de-extincao.html>. Acesso em: 05 de abril de 2016, 2014.

NOVELLI, B. et al. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. **Fish physiology and biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1233-1251, 2015.

NOVELLI, B.; OTERO-FERRER, F.; DIAZ, M.; SOCORRO, J.A.; CABALLERO, M.J.; MOLINA, DOMÍNGUEZ, L.; MOYANO, F.J. Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). **Aquaculture**, v. 464, p.196-204, 2016.

NOVELLI, B.; SOCORRO, J.A.; CABALLERO, M.J.; OTERO-FERRER, F.; SEGADÉ-BOTELLA, A.; MOLINA DOMINGUEZ, L. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1233–1251, 2015.

OLIVEIRA, V.M., ASSIS, C.R.D. & BEZERRA, R.S. (2014). Hidrolases digestivas de peixes: aspectos bioquímicos, fisiológicos e biotecnológicos. *Revista Eletrônica de Biologia*, 7(3), 330–341

OLIVOTTO, I. et al. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies. **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 92-96, 2008.

OLIVOTTO, I. et al. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 2, p. 135-166, 2011.

OURIE, S.A.; POLLOM, R.A.; FOSTER, S.J. A global revision of the Seahorses *Hippocampus Rafinesque 1810* (Actinopterygii: Syngnathiformes): taxonomy and biogeography with recommendations for further research. **Zootaxa**, v. 4146, n. 1, p. 1-66, 2016.

PALMA, J.; BUREAU, D.P.; ANDRADE, J.P.; The effect of diet on ontogenic development of the digestive tract in juvenile reared long snout seahorse *Hippocampus guttulatus*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 739-750, 2014

PAN, A. et al. Changes in water and beverage intake and long-term weight changes: results from three prospective cohort studies. **International journal of obesity**, v. 37, n. 10, p. 1378, 2013.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J.; CLEARLY, J.J. Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. **Aquaculture**, v. 194, n. 1-2, p. 137-150, 2001.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. **Aquaculture**, v.188, p.353–361, 2000.

PEÑA, R.; DUMAS, S. Effect of delayed first feeding on development and feeding ability of *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 640-651, 2005.

PÉRES, A., ZAMBONINO-INFANTE, J.L. & CAHU, C.L. (1998). Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, 19, 145.

PERSON-LE RUYET, J.; ALEXANDRE, J. C.; THOVAND, L.; MAGNIER, C. Martini fish larvae feeding: formulated diet or live prey. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 24, p. 211-224, 1993.

PESSOA, E. V.; KLEIN, V. L. M. Análise do valor proteico do rotífero *Brachionus plicatilis* submetido à diferentes dietas. In: **XI Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, I Congresso Latino-Americano de Engenharia de Pesca**. 1999. p. 262-268.

PHAM, N.K; LIN, J. The effects of different feed enrichments on survivorship and growth of early juvenile longsnout seahorse, *Hippocampus reidi*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, n. 3, p. 435-446, 2013.

RANA, K. J. Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return, and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry. **Aquaculture**, v. 46, n. 2, p. 119-131, 1985.

RICE, J.A.; CROWDER, L.B.; BINKOWSKI, F.P. Evaluating potential sources of mortality for larval bloater (*Coregonus hoyi*): starvation and vulnerability to predation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 44, n. 2, p. 467-472, 1987.

ROSA, I.L.; OLIVEIRA, T.P.R.; CASTRO, A.L.C.; MORAES, L.E.D.S.; XAVIER, J.H.A.; NOTTINGHAM, M.C.; DIAS, T.L.P.; BRUTO-COSTA, L.V.; ARAÚJO, M.E.; BIROLO, A.B.; MAI, A.C.G.; MONTEIRO-NETO, C. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). **Neotropical Ichthyology**, v.5, p.405-414, 2007.

ROSA, I.L. et al. Fisheries and trade of seahorses in Brazil: historical perspective, current trends, and future directions. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, n. 9, p. 1951-1971, 2011

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.

- SANZ, A. et al. Digestive enzymes during ontogeny of the sturgeon *Acipenser naccarii*: intestine and pancreas development. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 5, p. 1139-1146, 2011.
- SARGENT, J. R.; MCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, v. 155, n. 1-4, p. 117-127, 1997.
- SHAN, X. et al. Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles. **Aquaculture**, v. 281, n. 1-4, p. 70-76, 2008.
- SHENG, J. et al. Effect of starvation on the initiation of feeding, growth and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Hippocampus kuda* Bleeker. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 469-478, 2007.
- SILVEIRA, R.B. Registros de cavalos-marinheiros (Syngnathidae: Hippocampus) ao longo da costa brasileira. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 2, p. 316-325, 2011.
- SILVEIRA, R.B; SICCHA-RAMIREZ, R; RODRIGO, J; SILVA, S; OLIVEIRA, C. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three Hippocampus species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. **Zootaxa**, v.3861, p.317-332, 2014.
- SOUZA-SANTOS, L.P. et al. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. **Aquaculture**, v. 404, p. 35-40, 2013.
- STÖLTING, K.N.; WILSON, A.B. Male pregnancy in seahorses and pipefish: beyond the mammalian model. **BioEssays**, v. 29, n. 9, p. 884-896, 2007.
- SUMPTER, J. P. et al. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and comparative Endocrinology**, v. 83, n. 1, p. 94-102, 1991.
- TAYLOR, W.W.; FREEBERG, M.H. Effect of food abundance on larval lake whitefish, *Coregonus clupeaformis* Mitchill, growth and survival. **Journal of Fish Biology**, v. 25, n. 6, p. 733-741, 1984.
- TEIXEIRA, R. L.; MUSICK, J. A. Reproduction and food habits of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake Bay, Virginia. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 1, p. 79-90, 2001.
- TIPTON, K.; BELL, S.S. Foraging patterns of two syngnathid fishes: importance of harpacticoid copepods. **Marine Ecology Progress Series**, v. 47, p. 31-43, 1988.
- UEBERSCHÄR, Bernd. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analysing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. **Meeresforschung-Reports on Marine Research**, v. 32, p. 144-154, 1988.

VINCENT, A.C.J; FOSTER, S. J.; KOLDEWEY, H.J. Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae. **Journal of Fish Biology**, v. 78, n. 6, p. 1681-1724, 2011.

VITE-GARCÍA, N. et al. First feeding captive seahorse *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) using *Artemia* and freshwater amphipods. WAS, Book of Abstracts. **World Aquaculture. Veracruz**, p. 25-29, 2009.

WARDLEY, T. R. **A study on the feeding of the pot-bellied seahorse (*Hippocampus abdominalis*: reducing the reliance on brine shrimp (*Artemia*).** 2006. Tese de Doutorado. University of Tasmania.

WATANABE, T.; KITAJIMA, C.; FUJITA, S.. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. **Aquaculture**, v. 34, n. 1-2, p. 115-143, 1983.

WATANABE, S.; WATANABE, Y. Relationship between male size and newborn size in the seaweed pipefish, *Syngnathus schlegeli*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 65, n. 3, p. 319-325, 2002.

WILLADINO, L. et al. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. **Aquaculture**, v. 360, p. 10-16, 2012.

WINFREE, Robert A.; KINDSCHI, Greg A.; SHAW, Harry T. Elevated water temperature, crowding, and food deprivation accelerate fin erosion in juvenile steelhead. **The Progressive fish-culturist**, v. 60, n. 3, p. 192-199, 1998.

WOODS, C.M.C.; VALENTINO, F. Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 9, p. 757-763, 2003.

ZHANG, H. et al. Hypoxia-driven changes in the behavior and spatial distribution of pelagic fish and mesozooplankton in the northern Gulf of Mexico. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 381, p. S80-S91, 2009.

ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L; FURUYA, W.M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 165-174, 2011.

ANEXOS

Anexo 1: Sistema de recirculação para manutenção das matrizes (LAPOM)



Foto: Lira (2016)

Anexo 2: Reprodutores *Hippocampus reidi* (LAPOM)



Foto: Lira (2016)

Anexo 3: Larvas coletadas para amostragem, processo de anestesia e eutanásia com óleo de cravo



Foto: Autor (2018)

Anexo 4: Amostra para biometria das larvas ao 10º dia de vida

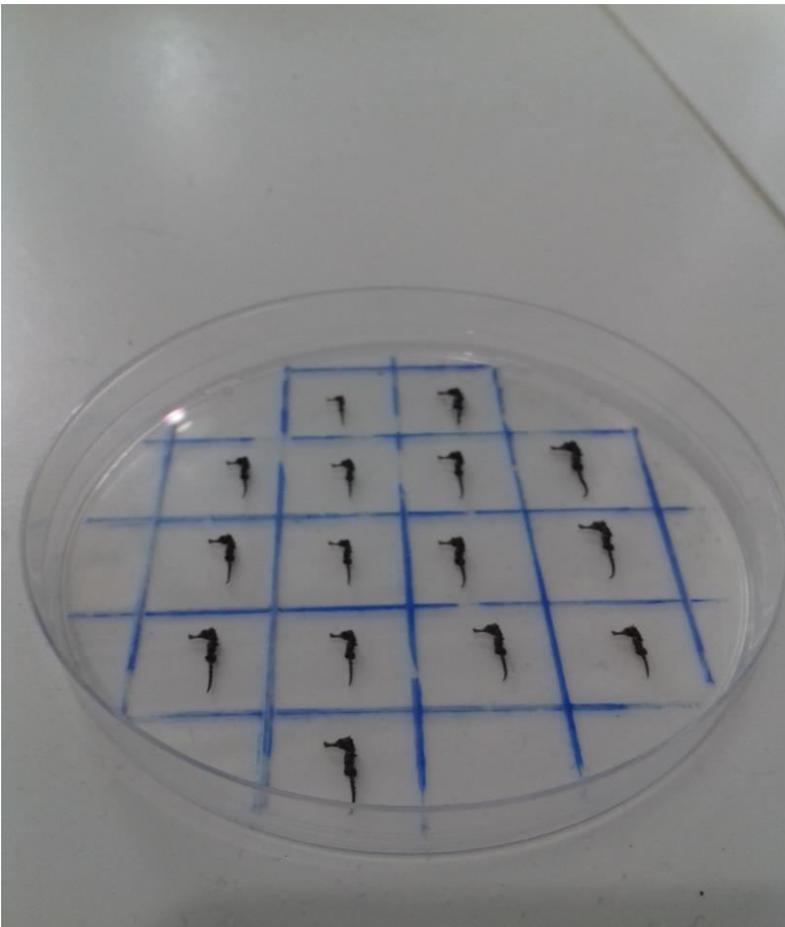


Foto: Autor (2018)

Anexo 5: Biometria das larvas do TC, T1 e T2.

Foto: Autor (2018)