

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA**

**LARVICULTURA DO DOURADO (*Salminus brasiliensis*):  
DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DE PROTEINASES DIGESTÓRIAS  
E TRANSIÇÃO ALIMENTAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em aqüicultura.

Orientadora: Dra. Débora Machado Fracalossi.  
Co-orientadora: Dra. Juliet Kiyoko Sugai.

**ORESTES MANUEL VEGA-ORELLANA**

FLORIANÓPOLIS  
2003

Vega-Orellana, Orestes Manuel

Larvicultura do dourado (*Salminus brasiliensis*): desenvolvimento ontogenético de proteinases digestórias e transição alimentar. – 2003.  
f. 69; grafs., tabs.

Orientadora: Dra. Débora Machado Fracalossi

Co-orientadora: Dra. Juliet Kiyoko Sugai

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agrárias.

Bibliografia: f. 69.

1. *Salminus brasiliensis*; 2. Larvas de peixes; 3. Transição alimentar; 4. Desenvolvimento ontogenético; 5. Enzimas digestórias.

**Larvicultura do dourado (*Salminus brasiliensis*): desenvolvimento ontogenético de proteinases digestivas e transição alimentar.**

**Por**

**ORESTES MANUEL VEGA ORELLANA**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

---

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.  
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

---

Dra. Débora Machado Fracalossi - *Orientadora*

---

Dr. Evoy Zaniboni Filho

---

Dra. Juliet Kiyoko Sugai

---

Dra. Maria Célia Portella.

Às pessoas que amo...

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fornecer sempre um grande amor, direção, amizade, saúde, estudos, bolsas, comida, roupa, casa e tudo.

“A mi madre y abuelita, por el grande amor, incansable dedicación y confianza depositados en mí”.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, funcionários e alunos, pela oportunidade de conhecê-los e formar parte dela.

A minhas orientadoras, pela ajuda, paciência, amizade e trabalho.

Aos professores: Aimê Rachel, Vinícius Ronzani, Evoy Zaniboni-Filho, pelos conselhos, apoio e orientação durante todo o mestrado.

Aos meus grandes colegas de turma: Karine, Claudinha, Zé, Willy, Samara, Ciça, Gustavo, Camila: pelo apoio, pela grande amizade (para sempre) e pela oportunidade de compartilhar coisas boas e ruins da vida durante estes três anos.

Aos meus grandes primeiros amigos, colegas e companheiros: o inesquecível Gilvan, Carina Maranhão, Adriana Recife, Hugo, Rodrigo Campagnolo, Gaúcho, Cris, Analice, Manuel de Karine e Glaucya.

A minha amiga-irmã-colega-etc., etc., etc. Adriana Gaúcha, por tudo!!!!

Ao grande “baixinho” Orlando Onofre Jr, pelo carinho e companhia durante muito tempo.

Aos meus dois grandes amigos, pela companhia, paciência e amizade eterna: Cleber Lins de Costa e Adilson de Sousa.

Aos meus grandes amigos, pelos momentos de conversa e descontração vividos (festas e mais festas): Fabian, Leandro, Tony, Fabiano, Márcio, Luis, Wagner.

Ao pessoal do LAPMAR e do LAPAD, especialmente Samira e Maude.

“A mis grandes amigos de Antofagasta que a través de emails, llamadas y cartas me dieron energía, alegría, fuerza y apoyo durante esta fase lejos de ellos, y me mostraron que la real amistad sobrevive a la distancia y tiempo, aunque éstos sean grandes. Gracias”.

E mais uma vez, obrigado a toooooodos pela paciência, ajuda e carinho  
para com este **gringo**.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ANEXOS .....	ix
LISTA DE APÊNDICES .....	x
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
REVISÃO DE LITERATURA .....	1
1. O DOURADO .....	1
1.1. Ciclo de vida .....	1
1.2. Sistema digestório .....	3
2. LARVICULTURA .....	4
2.1. Transição alimentar .....	5
2.2. Capacidade digestória da larva .....	7
2.3. Enzimas digestórias .....	10
LARVICULTURA DO DOURADO ( <i>Salminus brasiliensis</i> ): DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DE PROTEINASES DIGESTÓRIAS E TRANSIÇÃO ALIMENTAR .....	12
Resumo .....	12
1. Introdução .....	13
2. Materiais e Métodos .....	14
2.1. Larvicultura .....	14
2.2. Experimento 1: desenvolvimento ontogenético de três proteinases .....	15
2.2.1. Manejo e coleta das larvas .....	15
2.2.2. Análises bioquímicas .....	15
2.2.2.1. Extratos enzimáticos .....	15
2.2.2.2. Atividade de pepsina .....	16
2.2.2.3. Atividade de tripsina .....	16
2.2.2.4. Atividade de quimotripsina .....	17
2.2.2.5. Ensaios com inibidores de proteinases .....	17
2.2.2.5.1. Inibição de tripsina .....	18
2.2.2.5.2. Inibição de quimotripsina .....	18
2.3. Experimento 2: uso de três diferentes épocas de transição do alimento vivo para o artificial, de forma gradual ou total .....	18
2.4. Análises estatísticas .....	20
3. Resultados .....	20
3.1. Experimento 1: desenvolvimento ontogenético de três proteinases .....	20
3.1.1. Crescimento .....	20
3.1.2. Atividades enzimáticas .....	21
3.1.3. Atividade em presença de inibidores .....	23
3.2. Experimento 2: uso de três diferentes épocas de transição do alimento vivo para o artificial, de forma gradual ou total .....	24
4. Discussão .....	26
4.1. Desenvolvimento ontogenético de enzimas digestórias em larvas de dourado .....	26
4.2. Transição alimentar em larvas de dourado .....	30
5. Conclusões .....	33
Agradecimentos .....	33
Referências .....	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....	40
ANEXOS .....	46
APÊNDICES .....	49

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Crescimento em peso úmido total diário (g) das larvas de dourado durante o período experimental (sete dias).....	20
Figura 2: Perfil da atividade enzimática (média±desvio padrão) de tripsina, quimotripsina e pepsina em larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão (AE) .....	21
Figura 3: Efeito do inibidor TPCK e do solvente metanol sobre a atividade da quimotripsina em larvas de dourado durante a primeira semana de vida após a eclosão.....	23
Figura 4: Perfil de sobrevivência final de larvas de dourado no 9° dia após eclosão (AE), submetidas a transição alimentar no 3°, 5° ou 7° dias AE, com transição total (TT) ou gradual (TG) do alimento vivo.....	24
Figura 5: Comprimento total (A) e peso úmido total (B) de larvas de dourado no 9° dia após eclosão (AE), submetidas a transição alimentar no 3°, 5° ou 7° dias AE, com transição total (TT) ou gradual (TG) do alimento vivo.....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: ENZIMAS DIGESTÓRIAS ENCONTRADAS EM PEIXES TELEÓSTEOS.....	10
ARTIGO CIENTÍFICO: LARVICULTURA DO DOURADO ( <i>Salminus brasiliensis</i> ): DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DE PROTEINASES DIGESTÓRIAS E TRANSIÇÃO ALIMENTAR	
Tabela 1: Composição da ração como oferecida usada na transição alimentar de larvas de dourado.....	19
Tabela 2: Comparação das atividades específicas ( $U \cdot mg^{-1}$ de proteína) de tripsina e quimotripsina de larvas de dourado e curimba 24 e 48 h AE.....	22



**LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO 1</b>	Nome científico e comum, hábito alimentar e hábitat das espécies de peixes citadas no trabalho.....	47
<b>ANEXO 2</b>	NOMENCLATURA ANATÔMICA.....	48

**LISTA DE APÊNDICES**

<b>APÊNDICE 1</b>	A. Atividade específica de tripsina em larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão.....	50
	B. Atividade específica de quimotripsina em larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão.....	51
	C. Atividade específica de pepsina de larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão.....	52
<b>APÊNDICE 2</b>	Proteína solúvel presente nos extratos enzimáticos de larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão.....	53
<b>APÊNDICE 3</b>	Teste de inibição enzimática usando o inibidor específico de quimotripsina TPCK e metanol.....	54
<b>APÊNDICE 4</b>	Larvas de dourado durante a primeira semana de vida, cultivadas com uma temperatura d'água de $24,1 \pm 2,0$ °C.....	55

**ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

A	- Absorbância
AE	- Após a eclosão
BAPNA	- N <sub>α</sub> -Benzoil-DL-arginina-4-p-nitroanilida
Δ	- Delta – diferença
DMSO	- Dimetilsulfóxido
g	- Gramas
<i>g</i>	- Força gravitacional
°C	- Temperatura em graus-Celsius
CT	- Comprimento total
h	- Hora
L	- Litro
kcal	- Kilocaloria
kg	- Kilograma
M	- Molar
mg	- Miligrama
min	- Minuto
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
mm	- Milímetro
N	- Normal
nm	- Nanômetro
p/v	- Peso/volume
s	- Segundo
SAPNA	- N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida
TCA	- Ácido tricloroacético
TG	- Transição gradual
TLCK	- N <sub>α</sub> -Tosil-L-lisina clorometil cetona
TPCK	- N-p-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
TT	- Transição total
U	- Unidade de enzima
v/v	- Volume/volume

## RESUMO

Com o intuito de contribuir com o conhecimento biológico e de larvicultura do dourado (*Salminus brasiliensis*) foram realizados dois experimentos, os quais visaram a determinar a época e o manejo adequados para a realização da transição alimentar, do alimento vivo à ração. O primeiro experimento foi o estudo do desenvolvimento ontogenético enzimático do trato digestório da larva após a eclosão, através da quantificação das atividades enzimáticas de três proteinases: uma ácida (pepsina) e duas alcalinas (tripsina e quimotripsina). O objetivo deste estudo foi conhecer o grau de desenvolvimento funcional de tais órgãos, em larvas amostradas cada doze horas, durante sete dias. No segundo experimento foram testadas três diferentes épocas de transição do alimento vivo (larvas de curimba *Prochilodus lineatus*) para o artificial: no 3º, 5º ou 7º dia após a eclosão (AE) das larvas, de forma gradual (TG), mantendo o alimento vivo até dois dias após o início da transição alimentar, ou de forma total (TT), retirando-o totalmente no mesmo dia. A atividade de pepsina ( $0,0004 \pm 0,0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína) foi detectada a partir do terceiro dia, indicando a funcionalidade do estômago. Já a atividade de proteinases intestinais (tripsina e quimotripsina,  $0,088 \pm 0,0$  e  $0,018 \pm 0,0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente) foi observada doze horas após a eclosão, antes de as larvas abrirem a boca. Não foi constatada uma contribuição enzimática do alimento vivo usado. A aceitação da ração ocorreu a partir do quinto dia após a eclosão. No final do 9º dia AE, os maiores valores de comprimento total foram obtidos para as larvas cuja transição foi feita no 3º dia TT ( $20,93 \pm 1,33 \text{ mm}$ ) e no dia 7º dia TG ( $20,41 \pm 0,80 \text{ mm}$ ). Os valores obtidos nos outros tratamentos foram significativamente menores ( $P < 0,05$ ). Os maiores valores de peso foram obtidos para as larvas cuja transição foi feita no 3º dia TT ( $0,067 \pm 0,014 \text{ g}$ ) e no dia 7º dia TG ( $0,078 \pm 0,009 \text{ g}$ ). A sobrevivência foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) quando a transição ocorreu no terceiro e quinto dias, se comparada com a de larvas cuja transição ocorreu no 7º dia após a eclosão. Quando a transição alimentar foi feita no terceiro ou quinto dias a sobrevivência foi maior se feita em forma gradual. Os resultados obtidos demonstram a importância do alimento vivo logo após a eclosão das larvas do dourado e sugerem que a ração poderá ser oferecida, de forma gradual, a partir do sétimo dia após a eclosão.

## ABSTRACT

Two experiments were carried out to determine the best feeding protocol for weaning “dourado” larvae (*Salminus brasiliensis*) to artificial feed. The first experiment, focused on the ontogenetic development of proteases in the larval gut after hatching. Larvae were sampled every twelve hours after hatching, during seven days, and protease activities were determined. In the second experiment, weaning from live food (“curimba” larvae *Prochilodus lineatus*) was tested in the third, fifth or seventh day after hatching by gradual or total transition to artificial feed. Live food was either kept for two days after feeding the artificial diet (TG) or removed at the same day (TT). Pepsin activity ( $0.0004 \pm 0.0$  U (mg protein)<sup>-1</sup>) was detected in the third day after hatching, indicating stomach functionality at this time. Intestinal proteinases (trypsin and chymotrypsin,  $0.088 \pm 0.0$  and  $0.018 \pm 0.0$  U (mg protein)<sup>-1</sup>, respectively) activities were detected as early as twelve hours after the hatching, before the onset of exogenous feeding. Acceptance of the artificial diet started at the fifth day after hatching and enzymatic contribution of the live food was not evident. Total length was higher in larvae whose feed transition occurred in the third (TT) ( $20.93 \pm 1.33$  mm) or seventh day (TG) ( $P < 0.05$ ) ( $20.41 \pm 0.80$  mm). None of these parameters was affected by the form of alimentary transition ( $P > 0.05$ ). Total weight was higher in larvae whose feed transition occurred in the third (TT) ( $0.067 \pm 0.014$  g) or seventh day (TG) ( $P < 0.05$ ) ( $0.078 \pm 0.009$  g). The survival was significantly lower ( $P < 0.05$ ) when weaning occurred at the third and fifth day after hatching instead of the seventh day. However, for the most part, survival was superior when transition for the artificial feed was gradual. Our findings demonstrate the importance of live food soon after hatching for “dourado” larvae and suggest that the artificial feed could be offered, in a gradual form, as early on the seventh day after hatching.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. O DOURADO

O dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), sin. *maxillosus* Valenciennes, 1850 (GÉRY e LAUZANNE, 1990), é um characiforme típico da Bacia do Prata em toda a sua extensão, sendo encontrado nos três grandes rios formadores desta bacia: Paraná, Paraguai e Uruguai, no rio Jacuí, nas bacias do rio São Francisco e do rio Mamoré (Bolívia) e no Alto rio Chaparé (Bolívia) (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955; FROESE e PAULY, 2003). É um peixe reofílico migrador, habitando preferencialmente ambientes lóticos e encachoeirados (ZANIBONI FILHO, 1997; KOCH et al., 2000).

A reprodução se dá uma vez por ano, período no qual o dourado faz uma migração ascendente até a cabeceira dos rios, onde ocorre a desova. Após a fecundação, os ovos são transportados pelas águas em direção a remansos e lagoas marginais formadas nas épocas das chuvas, onde se desenvolvem até a fase juvenil, quando então retornam à calha dos rios para reiniciar o ciclo (KOCH et al., 2000).

O dourado é bastante apreciado pela excelente qualidade da sua carne (ZANIBONI FILHO, 1997; KOCH et al., 2000) e pelo potencial de cultivo como peixe de mesa, na pesca esportiva ou mesmo como ornamental (KUBITZA, 1995). Tem hábito alimentar carnívoro, alimentando-se, nas fases larval e juvenil, preferencialmente de peixes, microcrustáceos e insetos, e na fase adulta, exclusivamente de peixes (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955; WOYNAROVICH e SATO, 1989; BORGHETTI et al., 1990; ZANIBONI FILHO, 1997; KOCH et al., 2000).

Atualmente esta espécie vem sendo ameaçada de extinção pela poluição das águas e por alterações no ambiente, tal como construções de barragens, o que impede a migração reprodutiva e o fechamento de seu ciclo biológico na natureza (KOCH et al., 2000).

#### 1.1. Ciclo de vida

Após a desova e a fertilização, obtêm-se ovos livres e semidensos. A eclosão pode ocorrer em 15 h, com uma temperatura da água de 26 °C, ou até em 14 h, a 27 °C. A larva recém-eclodida tem um comprimento total médio de 4,8 mm, apresenta a cabeça praticamente formada, notando-se o esboço de um sulco (a futura boca) e os olhos em formação. Não apresenta pigmentos aparentes no corpo ou na cabeça, possuindo um órgão adesivo na região frontal da cabeça. O saco vitelínico é relativamente grande, sendo formado por duas partes de comprimento igual, uma parte anterior oval e uma parte posterior estreita, possuindo somente um quarto da largura do anterior (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955; NAKATANI et al.,

2001). Com quase 2 h de vida larval, nota-se o esboço da futura abertura anal e, com aproximadamente 9 h e 30 min, acentuam-se mais a futura boca e o globo ocular. A parte distal do saco vitelínico começa a afinar mais, paralelamente com a formação do trato intestinal e suas duas aberturas: a boca e o ânus. Meia hora mais tarde, os olhos apresentam-se razoavelmente pigmentados, e a incisão da futura boca é mais nítida. Notam-se os esboços das maxilas, como também dos cinco arcos branquiais. A abertura anal está prestes a acontecer, sendo seguida pela abertura bucal. O saco vitelínico continua a ser reduzido na parte distal (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955). Com 20 h após a eclosão, a larva mostra nas maxilas os esboços dos dentes, que são cônicos. Os olhos estão formados, pigmentando-se os esboços dos opérculos. O saco vitelínico apresenta-se ainda mais reduzido, estando já absorvido o prolongamento distal. A total absorção do saco vitelínico e a completa pigmentação dos olhos ocorrem quando a larva está com 6,75 mm de comprimento padrão (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955; NAKATANI et al., 2001). Santos e Godinho (2002) observaram que larvas cultivadas numa temperatura de 23 a 25 °C absorveram totalmente o saco vitelínico no terceiro dia após a eclosão.

Numa temperatura de 23 a 26 °C a abertura da boca e o início da ingestão começam de 25 a 28 h após a eclosão (ZANIBONI FILHO, 1997; SANTOS e GODINHO, 2002). Segundo alguns autores, nesta fase a larva pode começar a predação de algas unicelulares e protozoários e, posteriormente, microcrustáceos, como cladóceros e copépodos (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955). Outros autores, entretanto, afirmam que a larva começa a alimentar-se ativa e diretamente de zooplâncton, principalmente de cladóceros (ZANIBONI FILHO, 1997; LUZ et al., 2000) ou até exclusivamente de larvas de outros peixes (WOYNAROVICH e SATO, 1989). Pinto e Guglielmoni (1988) relatam que muitas larvas de dourado provenientes de ovos incubados a uma temperatura de 27-28 °C apresentavam a boca e ânus abertos e esboços de dentes nas maxilas no momento da eclosão, iniciando a ingestão de rotíferos após 6 h. Passadas 31 h da eclosão, a larva pode iniciar o consumo de presas maiores. Em larviculturas experimentais e comerciais tem-se verificado que, nesta etapa, a larva pode ser alimentada com pós-larvas de peixes (larvas forrageiras). É neste período que aparece o canibalismo (ZANIBONI FILHO, 1997).

Santos e Godinho (2002) relatam que o lúmen do estômago é evidente no terceiro dia após a eclosão. Moraes Filho e Schubart (1955) observaram o estômago e o intestino no quinto dia. Em condições de laboratório, no sexto dia de vida, a larva atinge um comprimento de 15 mm e 20 mg de peso (WOYNAROVICH e SATO, 1989; ZANIBONI FILHO, 1997).

O próximo estágio de desenvolvimento é o de alevino ou juvenil, que se inicia quando o dourado tem um comprimento total de aproximadamente 50 mm (aproximadamente 20 dias

após eclodir) (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955). Segundo Nakatani et al. (2001), a larva pode ser considerada juvenil a partir de 34,3 mm. Esta fase consiste basicamente no desenvolvimento e no crescimento em todas as dimensões, aumento de peso, certas modificações nas proporções corporais, matizes de cores e no aumento do número de dentes, entre outras. O estado juvenil termina com a maturação das gônadas, entrando então na fase adulta (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955; NAKATANI et al., 2001). A primeira maturação gonadal de machos e fêmeas ocorre no primeiro e segundo anos de vida, respectivamente, com cerca de 325 mm de comprimento total (NAKATANI et al., 2001).

## 1.2. Sistema digestório\*

Morais Filho e Schubart (1955) observaram o sistema digestório do dourado e descrevem que os órgãos de alimentação e digestão desta espécie são compostos das seguintes partes: na boca encontra-se a língua larga e grossa, enquanto o céu da boca é coberto de uma pele levemente enrugada em sentido longitudinal. O esôfago é largo e musculoso e continua sem limite nítido no próprio estômago. Pouco antes da metade do esôfago tem origem, no lado dorsal, o condutor da vesícula natatória, o *ductus pneumaticus*. O fim do esôfago é indicado pelo começo do estômago, que apresenta-se como um saco largo, de forma cônica, fechado na parte distal. Suas paredes são muito grossas, porém elásticas e bem resistentes, o que permite ao peixe abocanhar presas enormes de um terço até um médio do comprimento do seu corpo. O comprimento do estômago é igual ao do esôfago, e sua largura normal corresponde a cerca de um terço do seu comprimento.

O intestino tem paredes grossas e fortes e se inicia na porção antero-inferior do estômago, continuando primeiro à frente, curvando-se para cima e para trás e apresentando, nesta região, os cecos pilóricos. Passa ao lado direito do esôfago e vai em linha reta, além da parte distal do estômago, onde dobra depois para cima e para frente, e de novo continua em sentido contrário e linha reta, ascendente, até a altura do esôfago. Numa terceira e última curva, virado para cima e para trás, atinge o trecho final, o reto, descendo até a abertura anal, que se encontra anterior à abertura dos órgãos sexuais. O comprimento do intestino corresponde aproximadamente ao comprimento padrão do peixe. Os cecos pilóricos localizam-se na parte inicial desse órgão. Seu número é de cerca de setenta, sendo o tamanho de cada um variável entre um terço até um médio do comprimento do próprio estômago.

O fígado, situado na região anterior da cavidade abdominal, é composto de três lobos. A bile é conduzida para o intestino logo depois da região dos cecos pilóricos. O peso do fígado é de cerca de seis décimos do peso do corpo. Na região superior do estômago, quase por completo escondido pelo trato intestinal, lobos do fígado e gônadas, encontra-se o baço, órgão

---

\* A nomenclatura usada está de acordo com as recomendações da Federação Internacional das Associações de Anatomistas (ANEXO 2)



pequeno de cor marrom avermelhada, atingindo um pouco mais que a metade do comprimento do estômago.

## **2. LARVICULTURA**

No Brasil vem-se trabalhando para o desenvolvimento de sistemas de cultivo intensivos de algumas espécies nativas de importância comercial. O cultivo comercial de dourado é pouco realizado, devido principalmente à baixa taxa de fertilização, o hábito alimentar carnívoro desde as primeiras horas de vida, o acentuado canibalismo e a inabilidade das larvas em aceitar de imediato rações artificiais convencionais, obrigando à utilização de alimento natural. Todos estes fatores dificultam a produção do dourado em larga escala (WOYNAROVICH e SATO, 1989; KUBITZA, 1995; ZANIBONI FILHO, 1997; LUZ et al., 2000). O desenvolvimento de estratégias que reduzam as perdas na larvicultura pode criar novas perspectivas para o cultivo intensivo desta espécie.

Alguns dos grandes problemas com que se defronta a criação do dourado são a baixa sobrevivência e o crescimento nos primeiros dias de vida das larvas, os que estão ligados, entre outros fatores, à alimentação e nutrição destas (PIAIA et al., 1997; RADÜNZ NETO, 2000; BROMAGE e ROBERTS, 2001). Com a absorção do saco vitelínico ocorre a mudança no suprimento alimentar, de endógeno para exógeno, o que significa uma grande mudança metabólica. Esta é uma fase crítica, tanto na natureza como em cultivos comerciais, que influencia diretamente a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento dos peixes, devido principalmente a esta mudança alimentar (DABROWSKI, 1989; MUNILLA-MORAN e STARK, 1989; SEGNER et al., 1993; ZIMMERMANN e JOST, 1998; KUBITZA e LOVSHIN, 1999; GARCÍA ORTEGA, 2000; GAWLICKA et al., 2000; KIM et al., 2001).

Na natureza o zooplâncton constitui a primeira fonte de alimentação exógena na maioria dos peixes. Baseando-se neste fato, protocolos alimentares têm sido desenvolvidos para as diferentes espécies cultivadas, considerando como alimentos iniciais zooplâncton selvagem, rotíferos, cladóceros, poliquetas e larvas de peixes, entre outros (ROSELUND et al., 1997; ZANIBONI FILHO, 1997; KUBITZA e LOVSHIN, 1999; RADÜNZ NETO, 2000; SOUTHGATE e KOLKOVSKI, 2000; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001; HUNG et al., 2002).

Um aspecto fundamental a considerar no momento de estudar uma espécie com potencial aquícola, como o dourado, é o conhecimento de suas exigências nutricionais e qual manejo alimentar é mais adequado para seu crescimento. Com este conhecimento o organismo receberá o alimento adequado, natural ou artificial (em forma de rações balanceadas), possibilitando a obtenção de resultados produtivos satisfatórios em cada fase de desenvolvimento (ZAVALA-CAMIN, 1996; PEZZATO, 1997).

A produção intensiva de peixes carnívoros, como o dourado, é difícil com o uso exclusivo de alimento vivo, devido, entre outros fatores, aos altos custos de manutenção e/ou produção deste tipo de alimento (compra ou captura dos organismos, infra-estrutura de cultivo, mão-de-obra, energia, etc.), que chegam a quase 50% dos custos operacionais de uma larvicultura (ROSELUND et al., 1997; KUBITZA e LOVSHIN, 1999; SOUTHGATE e KOLKOVSKI, 2000; KOLKOVSKI, 2001). Outros problemas associados ao uso de alimento vivo são: variação na sua composição nutricional, idade e técnica de cultivo empregada (ALARCÓN e MARTINEZ, 1998); potencial como vetor de doenças (parasitas, bactérias, vírus, etc.) e problemas de disponibilidade no mercado (SOUTHGATE e KOLKOVSKI, 2000). As rações artificiais oferecem, em contraposição, menores custos de produção, facilidade de aquisição, melhores condições de estocagem, maior uniformidade da qualidade das matérias-primas utilizadas e maior flexibilidade nas fórmulas, podendo ajustar-se o tamanho e a composição de acordo com as exigências larvais (ROSELUND et al., 1997; ALARCÓN e MARTINEZ, 1998; RADÜNZ NETO, 2000; SOUTHGATE e KOLKOVSKI, 2000). Apesar de todas as vantagens do alimento inerte, seu uso em larviculturas tem resultado em baixa sobrevivência e pobre crescimento, se comparado com o uso de alimento vivo. Ainda não se conhece a razão desses maus resultados, acreditando-se que pode ser pela falta de mobilidade do alimento inerte, pela falta de substâncias atrativas na sua composição, pela pouca palatabilidade e estabilidade na água, formulações nutricionais inadequadas ou ainda pela falta de capacidade digestória adequada para a larva digerir e assimilar este tipo de alimento (GONÇALVES et al., 1991; ALARCÓN e MARTINEZ, 1998; KUBITZA e LOVSHIN, 1999; LAZO, 2000; RADÜNZ NETO, 2000; SOUTHGATE e KOLKOVSKI, 2000; CASTELL e BLAIR, 2001).

Portanto, para espécies que têm dificuldade de aceitar o alimento inerte no início da alimentação exógena têm-se idealizado protocolos alimentares unindo os dois tipos de alimento. Este esquema de alimentação pode resultar em diminuição de custos de produção, obtenção de bons crescimentos, baixas taxas de mortalidade larval e uma maior assimilação dos alimentos inertes (KOLKOVSKI et al., 1991; ROSELUND et al., 1997, SOUTHGATE e KOLKOVSKI, 2000; BROMAGE e ROBERTS, 2001). No caso específico do dourado, o uso de rações comerciais surge como alternativa para reduzir os custos, promovendo a produção intensiva de alevinos para comercialização (KUBITZA, 1995).

## **2.1. Transição alimentar**

O processo pelo qual a larva começa a aceitar alimento artificial (ração), deixando, parcial ou totalmente, o alimento natural (presas vivas), recebe o nome de transição alimentar ou “desmame”. É uma etapa muito crítica da larvicultura, na qual há grandes possibilidades de

mortalidade (HIDALGO, 1995; KUBITZA, 1995). O sucesso desta etapa, isto é, a obtenção de adequado crescimento e alta sobrevivência larval, está ligado ao conhecimento do momento certo para o início do oferecimento do alimento artificial. De maneira geral, a transição alimentar em peixes de água doce acontece mais precocemente que em peixes marinhos (JONES et al., 1993; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 1995; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001; CUVIER-PÉRES et al., 2001). O sucesso da transição alimentar está relacionado à capacidade digestória da larva, à qualidade da ração e ao adequado treino alimentar (FERNANDEZ et al., 2000; GAWLICKA et al., 2000).

Estudos sugerem que as exigências nutricionais de larvas e juvenis são diferentes, devido às mudanças na capacidade digestória durante o desenvolvimento. Rações que promovem bom crescimento e alta sobrevivência para juvenis podem mostrar pobres resultados quando usadas para larvas (CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Por isso, é fundamental o conhecimento das exigências nutricionais da larva para a formulação de uma ração adequada. Entretanto, estudos para a determinação das exigências nutricionais de larvas são extremamente difíceis de serem conduzidos. Recomenda-se, portanto, que a formulação de uma dieta para larvas seja feita considerando-se: a composição do alimento vivo usado, a composição corporal da espécie em estudo e a composição de rações usadas com sucesso em espécies semelhantes (ALARCÓN e MARTINEZ, 1998). Rações para larvas devem ser nutricionalmente completas, ter elevada digestibilidade e palatabilidade, maximizando a chance de captura, ingestão e assimilação. Há relatos em que rações nutricionalmente completas são rejeitadas pelas larvas; e rações desbalanceadas, aceitas. Isto demonstra que, além da qualidade nutricional da ração, é extremamente importante considerar suas propriedades físico-químicas (KOLKOVSKI et al., 1997; ZIMMERMANN e JOST, 1998; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Por exemplo, é importante que as partículas do alimento fiquem em suspensão, movendo-se com lentidão suficiente na coluna de água, facilitando sua captura pela larva (PIPER et al., 1982; PERSON LE RUYET et al., 1993; ALARCÓN e MARTINEZ, 1998; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001; D'ABRAMO, 2002). Atrativos visuais e químicos são adicionados com sucesso às rações, tais como pigmentos, aminoácidos livres, betaína, bem como extratos de crustáceos, moluscos, minhocas e peixes (POLAK e BEKLEVIK, 1997; ALARCÓN e MARTINEZ, 1998; KUBITZA e LOVSHIN, 1999; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Enzimas digestórias e mesmo hormônios (gastrina/colecistoquinina e da glândula tireóidea), os quais auxiliam na digestão larval, também têm promovido crescimento e sobrevivência satisfatórios durante o período de transição alimentar (PERSON LE RUYET et al., 1993; ALARCÓN e MARTINEZ, 1998; HARDY, 2000; RØNNESTAD, 2002). A aceitação de rações pode ser estimulada após um período de

aprendizado ou treino, no qual a larva vai se acostumando a comer um alimento inerte, enquanto ainda dispõe de alimento vivo (KUBITZA, 1995). Entre os fatores que podem influenciar neste período de transição podem-se citar: a densidade e o formato dos tanques de cultivo, a temperatura da água, a linhagem e o genótipo das larvas, as condições de luminosidade, fotoperíodo, a frequência e a taxa de arraçoamento (intervalo de tempo e quantidade de ração fornecida) e a existência de treinamento prévio. Porém, a palatabilidade da ração e o tamanho inicial das larvas têm um papel decisivo durante este período de treinamento (PIPER et al., 1982; SHEIKH-ELDIN et al., 1997; KUBITZA e LOVSHIN, 1999). Algumas estratégias usadas para o treinamento consistem no uso de rações extremamente palatáveis no início da transição, as quais são substituídas posteriormente por outras menos palatáveis. As rações de início teriam uma composição muito parecida com o alimento usado pela larva antes de tal transição. Na transição alimentar total, o alimento vivo é substituído diretamente pela ração final; enquanto na transição gradual o alimento vivo (ou ração de início) é substituído em quantidades crescentes até o oferecimento somente de ração. Estas estratégias, combinando alimento vivo e rações artificiais (“co-feeding”), têm resultado em períodos de transição curtos e em crescimento e sobrevivência satisfatórios (JONES et al., 1993; ROSELUND et al., 1997; LAZO, 2000).

## **2.2. Capacidade digestória da larva**

Para entender as exigências nutricionais nas várias fases do ciclo produtivo deve-se conhecer o desenvolvimento dos sistemas envolvidos na digestão, na absorção e no aproveitamento dos nutrientes em cada uma destas fases (ZIMMERMANN e JOST, 1998). Os primeiros estágios de vida de um peixe são caracterizados por processos de diferenciação funcional e morfológica que incluem modificações nos órgãos dos sentidos, nos sistemas respiratório e enzimático, bem como na fisiologia digestória, levando a mudanças na exigência de nutrientes (SEGNER et al., 1993; BROMAGE e ROBERTS, 2001). Durante a ontogenia dos peixes existe uma seqüência de vias de aquisição de nutrientes, que envolve alimentação endógena (vitelo, placenta, secreções), absorvível (secreções e do próprio meio ambiente), exógena (ingestão oral) e mistas (combinação de dois ou três tipos de alimentação) (ZAVALA-CAMIN, 1996). Conseqüentemente, as estruturas do sistema digestório mudam durante o primeiro tempo de vida do organismo, havendo desenvolvimento e diferenciação de órgãos especializados para a digestão e a absorção dos nutrientes (DABROWSKI, 1989). Este incremento da complexidade morfológica está vinculado ao desenvolvimento dos processos digestórios, sendo ambos determinados geneticamente (SEGNER et al., 1993; SILVA e ANDERSON, 1995; GALVÃO et al., 1997; KOVEN et al., 2001). O conhecimento detalhado das

mudanças ocorridas no desenvolvimento, ligadas aos processos de ingestão, digestão e assimilação do alimento, pode ser muito útil no cultivo de peixes, especialmente no estágio larval, que é a fase em que se inicia a alimentação exógena (HEMING e BUDDINGTON, 1988). O início dessa alimentação exógena comanda a formação definitiva do fenótipo dos órgãos do trato alimentar (DABROWSKI, 1989). As larvas têm sido divididas em dois grandes grupos, segundo o grau de desenvolvimento do aparelho digestório na eclosão: aquelas cujo aparelho digestório é muito rudimentar e aquelas cujo conjunto de órgãos digestórios aparece totalmente diferenciado. No primeiro grupo incluem-se as larvas procedentes de ovos pelágicos, enquanto no segundo, as de ovos demersais (SOLER, 1995; ALARCÓN e MARTINEZ, 1998).

Em muitas espécies de peixes a diferenciação do estômago é indicada como um evento decisivo, podendo ser usado como um sinal para o início da transição do alimento vivo ao inerte. A diferenciação do estômago facilitaria a digestão do alimento inerte, menos digestível que o vivo (DABROWSKI, 1984; SEGNER et al., 1993; KOLKOVSKI, 2001). Dabrowski (1984) propôs uma divisão das larvas de peixes em três grupos, segundo a morfologia e as enzimas digestórias secretadas no trato digestório. No primeiro grupo encontram-se as larvas de peixes que têm um estômago funcional antes da mudança do alimento endógeno para o exógeno. Tal é o caso das larvas de salmonídeos e ciclídeos, cujas glândulas gástricas se desenvolvem antes da total absorção das reservas vitelínicas. Mesmo tendo hábitos alimentares diferentes, estes dois grupos de peixes apresentam similaridade no desenvolvimento do trato digestório. Estes peixes podem ingerir rações artificiais no momento em que abrem a boca, não precisando ingerir alimento vivo. O segundo grupo abrange os peixes nos quais o estômago funcional ou glândulas digestórias desenvolvem-se após o início da alimentação exógena. Tal é o caso de larvas de coregonídeos, *Scophtalmus maximus* (COUSIN et al., 1987), *Solea solea* (CLARK et al., 1986) e *Mugil platanus* (GALVÃO et al., 1997). Neste tipo de larvas é observada, nos primeiros dias após a eclosão, a ação de enzimas digestórias no intestino (tripsina, quimotripsina, aminopeptidase), verificando-se somente a digestão alcalina. Após o desenvolvimento do estômago (de tempo variável, segundo a espécie), verifica-se a presença de digestão ácida, isto é, o início da ação do estômago como órgão funcional. Finalmente, o terceiro grupo corresponde às larvas de peixes agastros, incluindo representantes das famílias Cyprinidae, Catostomidae, Labridae, Scaridae, Odacidae, Blennidae, Cobitidae, Loricariidae, Gabiesocidae, Callionymidae, Acanthuridae, Molidae, Syngnathidae e os atheriniformes, os quais só possuem digestão alcalina para a degradação do alimento (ZAVALA-CAMIN, 1996; HORN, 1997). É importante considerar que espécies com ou sem estômago podem ocorrer dentro de uma mesma família ou de um mesmo gênero (ZIMMERMANN e JOST, 1998). Nestes peixes, as mudanças ontogenéticas em seu desenvolvimento são percebidas através

do alongamento do intestino. A atividade das enzimas se inicia no momento em que a larva inicia a alimentação exógena. A função da pepsina, então, é substituída pela das proteases alcalinas (SILVA e ANDERSON, 1995). Nestes três grupos as primeiras atividades enzimáticas apresentadas após a eclosão correspondem àquelas das enzimas pancreáticas tripsina e quimotripsina (LAUFF e HOFER, 1984; CLARK et al., 1986; COUSIN et al., 1987). Tem-se observado que, em peixes, a atividade enzimática intestinal aumenta com a idade do peixe devido ao incremento do tamanho do intestino e do peso da mucosa (KUZ'MINA, 1996).

A alimentação exógena pode começar poucos dias antes da absorção completa do vitelo, sendo o alimento digerido num sistema pouco desenvolvido (TOVAR-RAMIREZ et al., 2000). De forma geral, o início da ingestão oral é, em muitos casos, um sinal de digestão exclusivamente intestinal, como é o caso daquelas larvas de peixes nas quais o estômago tem um desenvolvimento tardio. Em alguns casos, entretanto, como acontece nas larvas nas quais existe uma mudança direta do período embrionário para o juvenil, o início da ingestão oral é acompanhado de digestão complexa estomacal e intestinal (DABROWSKI, 1989). A ausência de algumas enzimas digestórias nos primeiros estágios pode prejudicar a utilização de ração logo após a eclosão da larva (KUBITZA, 1995).

A capacidade digestória do organismo, que finalmente determina os tipos de nutrientes passíveis de serem absorvidos, será determinada pelo desenvolvimento de suas enzimas digestórias (LEE et al., 1984; DABROWSKI, 1989; VEGA-VILLASANTE et al., 1995). Através da identificação das enzimas digestórias e da medição de suas atividades relativas e mudanças durante a ontogênese, podem-se obter informações valiosas sobre o estado nutricional da larva. Os dados obtidos também podem ser relevantes para estabelecer o momento mais adequado para realizar a transição alimentar, além de auxiliar na adequada escolha de ingredientes e no desenvolvimento de estratégias alimentares apropriadas, baseadas na capacidade digestória do peixe (KUZ'MINA, 1996; ALARCÓN et al., 1997; GALVÃO et al., 1997; ALARCÓN e MARTINEZ, 1998; FERNÁNDEZ et al., 2000; GAWLICKA et al., 2000; CARA TORRES et al., 2002).

Alguns autores afirmam que as larvas podem aproveitar as enzimas do próprio alimento vivo, o que facilitaria os processos de digestão na larva até seu sistema digestório estar totalmente diferenciado e desenvolvido (LAUFF e HOFER, 1984; GALVÃO et al., 1997). Outros autores, entretanto, afirmam o contrário (SEGNER et al., 1993; KUROKAWA et al., 1998; GARCÍA ORTEGA, 2000; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001; KIM et al., 2001; KOLKOVSKI, 2001; CARA TORRES et al., 2002), o que torna imprescindível o estudo das enzimas das larvas em cultivo, mas também as do alimento vivo utilizado na larvicultura (DABROWSKI, 1984).

### 2.3. Enzimas digestórias

As enzimas digestórias são hidrolases, isto é, proteínas globulares capazes de catalisar a hidrólise de ligações entre carboidratos (carboidrases) e lipídios (lipases), e as ligações das proteínas (proteases) e ácidos nucléicos (nucleases). Algumas destas são secretadas na forma de precursores inativos ou zimogênios, que podem ser ativados pelos próprios sucos gástricos e/ou enzimas proteolíticas já ativas (COHEN, 1979; SCHMIDT-NIELSEN, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1: ENZIMAS DIGESTÓRIAS ENCONTRADAS EM PEIXES TELEÓSTEOS <sup>1</sup>

Órgão/Tipo	Enzima	Substrato/Especificidade
<b>A. Estômago</b>		
Enzimas secretadas pelas glândulas gástricas		
▪ Endoproteases (proteinasas)	- Pepsina <sup>2</sup>	Ligações peptídicas do lado amino dos resíduos de aminoácidos aromáticos e ácidos <sup>3</sup>
▪ Carboidrases	- Amilase <sup>4</sup> - Quitinase	Amido e glicogênio Polímero de N- acetilglicosamina (quitina)
▪ Esterases/ lipases	- Esterase - Lipase	Lipídios (ésteres) Lipídios (acilgliceróis)
<b>B. Pâncreas</b>		
▪ Endoproteases (proteinasas)	- Tripsina <sup>2</sup> - Quimotripsina <sup>2</sup> - Colagenase <sup>2</sup> - Elastase	Ligações peptídicas do lado carboxi dos resíduos dos aminoácidos lisina e arginina Ligações peptídicas do lado carboxi dos resíduos dos aminoácidos aromáticos Ligações peptídicas do lado carboxi dos resíduos dos aminoácidos glicina, leucina e isoleucina do colágeno Elastina
▪ Exoproteases (peptidases)	- Carboxipeptidase <sup>2</sup>	Ligações peptídicas dos resíduos de aminoácido com um grupo carboxi livre
▪ Carboidrases	- Amilase - Quitinase	Amido e glicogênio Quitina
▪ Esterases/ lipases	- Lipases - Carboxilesterases	Lipídios Lipídios (ésteres)
<b>C. Intestino</b>		
Enzimas secretadas pelo epitélio intestinal		
▪ Exoproteases (peptidases)	- Aminopeptidase <sup>2</sup>	Ligações peptídicas dos resíduos de aminoácido com um grupo amino livre
▪ Dipeptidases	- Dipeptidase <sup>2</sup>	Dipeptídeos
▪ Polinucleotidases	- ADNases, ARNases	Ácidos nucléicos (ligações fosfoésteres)
▪ Fosfolipases	- Lecitinase	Fosfolipídios (lecitina)
▪ Carboidrases	- Laminarinase	Laminarina

<sup>1</sup> Baseado em Silva e Anderson (1995).

<sup>2</sup> Enzimas secretadas em forma de zimogênios.

<sup>3</sup> Nelson e Cox (2000).

<sup>4</sup> Soler (1995) afirma que a amilase é apenas de origem pancreática e que a atividade encontrada no estômago seria uma "contaminação" por parte de enzimas provenientes do intestino, porém Silva e Anderson (1995) situam esta enzima no estômago.

A proteína é o nutriente que se apresenta em maior quantidade em dietas para larvas, portanto, um grande número de estudos têm sido orientados para a caracterização da atividade enzimática das proteases (HOFER, 1981; DIMES et al., 1994; MUNILLA-MORAN e SABORIDO-REY, 1996; HIDALGO et al., 1999; FERNÁNDEZ et al., 2000). As proteases são classificadas em proteinases (endopeptidases) e exopeptidases, dependendo do sítio de ação. Quando a hidrólise ocorre nas ligações peptídicas localizadas no centro da cadeia polipeptídica (proteína), as proteases são do tipo proteinases, e atuando nas ligações peptídicas de resíduos de aminoácidos terminais (extremidades) são do tipo exopeptidases (GARCÍA-CARREÑO e NAVARRETE, 1997). As proteinases mais importantes são a pepsina (EC 3.4.23.1), secretada pelas glândulas gástricas como zimogênio, agindo no estômago em pH ácido, a tripsina (EC 3.4.21.4) e a quimotripsina (EC 3.4.21.1), ambas de origem pancreática sintetizadas como zimogênios, agindo no intestino em pH alcalino. Os zimogênios são enzimas inativas que são ativadas quando um segmento da sua cadeia protéica é removido, o que é feito por outras enzimas proteolíticas específicas ativas. As proteases são sintetizadas e mantidas em forma inativa para evitar que exerçam atividade sobre as proteínas das membranas celulares e intracelulares do próprio organismo (SILVA e ANDERSON, 1995; GARCÍA-CARREÑO e NAVARRETE, 1997; LOVELL, 1998; ZIMMERMANN e JOST, 1998; NELSON e COX, 2000).

O presente trabalho visa a determinar a época e o manejo adequados para a transição alimentar de larvas de dourado durante a primeira semana de vida após a eclosão, de acordo com a capacidade digestória, a sobrevivência e o crescimento larval durante este período. No primeiro experimento foram medidas as atividades enzimáticas de três proteinases: uma ácida (pepsina), e duas alcalinas (tripsina e quimotripsina), com o objetivo de conhecer o desenvolvimento ontogenético dessas enzimas e a funcionalidade dos órgãos digestórios onde atuam. No segundo experimento, foram testadas conjuntamente três diferentes épocas de transição alimentar no 3º, 5º ou 7º dias após a eclosão das larvas, e duas formas de transição (gradual ou total), visando a conhecer a época e a estratégia adequadas para a transição alimentar do dourado.

O artigo científico apresentado está de acordo com as normas da Revista "Aquaculture" (Editora Elsevier), à qual será, posteriormente, submetido para publicação.



## LARVICULTURA DO DOURADO (*Salminus brasiliensis*): DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DE PROTEINASES DIGESTÓRIAS E TRANSIÇÃO ALIMENTAR

Orestes Manuel Vega-Orellana<sup>1</sup>, Débora Machado Fracalossi<sup>1</sup>, Juliet Kiyoko Sugai<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) - Departamento de Aqüicultura - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Fone-Fax: (48) 389-5216. orestesnaboo@yahoo.com; deboraf@cca.ufsc.br.

<sup>2</sup> Laboratório de Enzimologia Aplicada - Departamento de Bioquímica - Centro de Ciências Biológicas - UFSC. Fone: (48) 331-9795; Fax: (48) 331-9672. jsugai@mbox1.ufsc.br.

UFSC: Caixa Postal 476, 88040-900. Florianópolis, SC, Brasil.

### Resumo

Com o intuito de contribuir com o conhecimento biológico e de larvicultura do dourado (*Salminus brasiliensis*) foram realizados dois experimentos, os quais visaram a determinar a época e o manejo adequados para a realização da transição alimentar, do alimento vivo à ração. O primeiro experimento foi o estudo do desenvolvimento ontogenético enzimático do trato digestório da larva após a eclosão, através da quantificação das atividades enzimáticas de três proteinases: uma ácida (pepsina) e duas alcalinas (tripsina e quimotripsina). O objetivo deste estudo foi conhecer o grau de desenvolvimento funcional de tais órgãos, em larvas amostradas cada doze horas, durante sete dias. No segundo experimento foram testadas três diferentes épocas de transição do alimento vivo (larvas de curimba *Prochilodus lineatus*) para o artificial: no 3º, 5º ou 7º dia após a eclosão (AE) das larvas, de forma gradual (TG), mantendo o alimento vivo até dois dias após o início da transição, ou de forma total (TT), retirando-o totalmente no mesmo dia. A atividade de pepsina ( $0,0004 \pm 0,0$  U  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> de proteína) foi detectada a partir do terceiro dia, indicando a funcionalidade do estômago. Já a atividade de proteinases intestinais (tripsina e quimotripsina,  $0,088 \pm 0,0$  e  $0,018 \pm 0,0$  U  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente) foi observada doze horas após a eclosão, antes de as larvas abrirem a boca. Não foi constatada uma contribuição enzimática do alimento vivo usado. A aceitação da ração ocorreu a partir do quinto dia após a eclosão. No final do 9º dia AE, os maiores valores de comprimento total foram obtidos para as larvas cuja transição foi feita no 3º dia TT ( $20,93 \pm 1,33$  mm) e no dia 7º dia TG ( $20,41 \pm 0,80$  mm). Os valores obtidos nos outros tratamentos foram significativamente menores ( $P < 0,05$ ). Os maiores valores de peso foram obtidos para as larvas cuja transição foi feita no 3º dia TT ( $0,067 \pm 0,014$  g) e no dia 7º dia TG ( $0,078 \pm 0,009$  g). A sobrevivência foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) quando a transição ocorreu no terceiro e

quinto dias, se comparada com a de larvas cuja transição ocorreu no 7º sétimo dia após a eclosão. Quando a transição alimentar foi feita no terceiro ou quinto dias a sobrevivência foi maior se feita em forma gradual. Os resultados obtidos demonstram a importância do alimento vivo logo após a eclosão das larvas do dourado e sugerem que a ração poderá ser oferecida, de forma gradual, a partir do sétimo dia após a eclosão.

*Palavras-chave:* *Salminus*, transição alimentar, enzimas digestórias, desenvolvimento ontogenético.

## 1. Introdução

O dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), sin. *maxillosus* Valenciennes, 1850 (Géry e Lauzanne, 1990), é um habitante típico da Bacia do Prata em toda a sua extensão, sendo encontrado nos três grandes rios formadores desta bacia: Paraná, Paraguai e Uruguai, no rio Jacuí, nas bacias do rio São Francisco e do rio Mamoré (Bolívia) e no Alto rio Chaparé (Bolívia) (Morais Filho e Schubart, 1955; Froese e Pauly, 2003). Possui potencial de cultivo para peixe de mesa, pesca esportiva ou mesmo como ornamental. É uma espécie carnívora, alimentando-se, nas fases larval e juvenil, preferencialmente de peixes, microcrustáceos e insetos, e na fase adulta, exclusivamente de peixes (Morais Filho e Schubart, 1955; Woynarovich e Sato, 1989; Zaniboni-Filho, 1997).

Estudos relacionados à larvicultura do dourado ainda são escassos, e seu cultivo comercial pouco realizado, devido, entre outros fatores, a seu hábito alimentar carnívoro desde as primeiras horas de vida (Luz et al., 2000). Peixes carnívoros, como o dourado, não podem ser produzidos intensivamente com o uso exclusivo de alimento natural, devido aos altos custos envolvidos na sua produção (Kubitza e Lovshin, 1999). O uso de rações surge como alternativa para reduzir estes custos. A transição das larvas do alimento natural (presas vivas) para rações artificiais é um processo conhecido como “desmame”, sendo uma etapa crítica. Esta transição alimentar deve ser feita no momento exato em que a larva está fisiologicamente preparada para digerir o alimento inerte, menos digestível que o alimento vivo, o que geralmente ocorre quando o estômago é funcional (Segner et al., 1993; Kolkovski, 2001). Uma ferramenta para determinar tal funcionalidade é o estudo bioquímico das classes de enzimas digestórias e suas mudanças durante a ontogênese do animal. Estes estudos auxiliam no estabelecimento do momento mais adequado para a realização da transição alimentar e no desenvolvimento de estratégias alimentares apropriadas para fases larvais (Alarcón e Martinez, 1998; Cara Torres et al., 2002).

Com o intuito de contribuir com o conhecimento biológico e de larvicultura do dourado foram realizados dois experimentos, os quais visaram a determinar a época e o manejo adequados para a realização da transição alimentar, do alimento vivo ao inerte. O primeiro foi o estudo do desenvolvimento ontogenético enzimático das larvas durante a primeira semana de vida AE, mediante a medição das atividades enzimáticas de três proteinases: uma ácida (pepsina) e duas alcalinas (tripsina e quimotripsina), com o propósito de conhecer o grau de desenvolvimento e funcionalidade dos órgãos onde elas atuam. No segundo experimento testaram-se simultaneamente três diferentes épocas de transição alimentar: 3º, 5º ou 7º dias AE e duas formas de transição: gradual ou total.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1. Larvicultura*

Os experimentos foram realizados na Estação de Piscicultura de São Carlos-EPISCar (São Carlos (latitude 27°04'39" sul, longitude 53°00'14" oeste), SC, Brasil) em dezembro/2001. Foram usadas larvas de dourado provenientes de desovas induzidas com reprodutores selvagens. Passadas 24 h da eclosão, as larvas foram contadas individualmente e estocadas em tanques plásticos circulares. Uma amostra de trinta larvas foi selecionada para medidas de peso e comprimento total (CT).

No experimento 1 (desenvolvimento ontogenético de três proteinases) e 2 (uso de três diferentes épocas de transição do alimento vivo para o artificial, de forma gradual ou total) as condições de cultivo foram similares, diferenciando-se apenas no volume dos tanques usados como unidades experimentais, sendo estes de 30 e 12-L, respectivamente. A densidade de cultivo utilizada em ambos foi de 15 larvas/L. As unidades experimentais tiveram uma renovação de 50% da água ao dia, aeração artificial constante e fotoperíodo natural de 15 h /dia.

Pela manhã e à noite, o fundo dos tanques foi sifonado, retirando-se os detritos. Diariamente foram medidos a temperatura e o oxigênio dissolvido da água de cultivo, usando-se um oxímetro (YSI modelo 55, Yellow Springs, OH, EUA) e o potencial hidrogeniônico (pH), usando um pHmetro (Digimed modelo DM2, São Paulo, SP, Brasil). A concentração de nitrito e amônia foi medida usando-se "kits" colorimétricos (LabCon Test, Camboriú, SC, Brasil). Todos estes parâmetros foram medidos pela manhã, e a temperatura e o oxigênio dissolvido também foram medidos à tarde e à noite. Durante o período experimental, os parâmetros físico-químicos se mantiveram em níveis adequados ao cultivo de peixes (Vinatea, 1997). A temperatura média da água durante o período experimental foi de 24,1±2,0 °C. O oxigênio

dissolvido e o pH da água tiveram valores médios de  $7,65 \pm 0,65$  mg/L e  $6,90 \pm 0,36$ , respectivamente. A taxa de renovação de água foi suficiente para manter sua qualidade com níveis de amônia e nitrito inferiores a 0,25 mg/L e 0,01 mg/L, respectivamente.

## 2.2. Experimento 1: desenvolvimento ontogenético de três proteinases

### 2.2.1. Manejo e coleta das larvas

Durante os sete dias de duração deste experimento, as larvas de dourado foram alimentadas exclusivamente com alimento vivo, que se constituiu de larvas de curimba (*Prochilodus lineatus*) de 24 ou 48 h AE, na proporção de 5 a 16 larvas de curimba/larva de dourado/dia, sendo esta quantidade ajustada de acordo com o consumo diário observado. O alimento foi fornecido no começo da noite. Foram amostradas 30 larvas de dourado a cada 12 h, pela manhã e à noite antes da alimentação. Depois de retirada a amostra, o volume de água era ajustado, mantendo-se assim a densidade larval inicial. Também foram coletadas amostras de 20 larvas de curimba (24 e 48 h AE) para análises enzimáticas. As larvas foram coletadas, rapidamente embrulhadas em papel alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, onde se mantiveram até o momento das análises. As 30 larvas coletadas foram juntadas para compor uma amostra a cada 12 h provenientes de três unidades experimentais.

### 2.2.2. Análises bioquímicas

#### 2.2.2.1. Extratos enzimáticos

As amostras de larvas coletadas nas primeiras 48 h AE foram utilizadas inteiras devido ao seu menor tamanho. As larvas das outras amostras foram individualmente dissecadas no gelo, desprezando-se a cauda, a cabeça e a musculatura dorsal. Foram juntadas as triplicatas de cada amostragem dos primeiros cinco dias de experimento, obtendo-se uma amostra única a cada 12 h, com um número suficiente de larvas para os ensaios. Cada grama (peso úmido) da larva inteira ou sua parte foi homogeneizado com 6,5 volumes (mL) de água destilada gelada (1:6,5, p/v) em um homogeneizador van Potter, por 2,5 min (5 agitações de 30 s com intervalos de 1 min para resfriamento) e centrifugada a  $27.167 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi usado para as determinações enzimáticas. Suas proteínas solúveis foram quantificadas com o método de Lowry et al. (1951) usando-se albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Chemical Co., EUA) como padrão. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

#### 2.2.2.2. Atividade de pepsina

A atividade da pepsina foi determinada pelo método preconizado por Anson (1938), descrito por Herriott (1955) e modificado por Sugai, J.K. (comunicação pessoal, 2001) como descrito a seguir. O sistema de reação (2 mL) continha: 0,028 a 0,071 mg ou 0,026 a 0,032 mg de proteína do homogenato de larvas de dourado ou curimba, respectivamente, 0,5 mL do substrato (hemoglobina bovina (Sigma Chemical Co., EUA) a 2% (p/v) dissolvido em HCl 0,06 N) e 0,1 mL de NaCl 0,1 N, sendo incubado a 28 °C. A reação foi interrompida após 30 min usando 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Após 5 min em repouso, foi centrifugado a 1.100 x g por 5 min. Para a determinação da tirosina liberada na reação foram incubados, por 5 min, 0,1 mL do sobrenadante; 1,0 mL de NaOH 0,5 N; 0,3 mL de Reagente de Folin 1 N (Dinâmica, Rio de Janeiro, Brasil) e HCl 0,2 M o suficiente para completar 2,0 mL do sistema de reação. Posteriormente a absorbância da coloração foi lida a 660 nm. A quantificação da tirosina liberada foi feita utilizando uma curva padrão de tirosina (Merck S.A., Alemanha). Para cada determinação da atividade de pepsina foi feito um controle do extrato enzimático seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém, colocando TCA no sistema de reação antes da adição do substrato. Paralelamente foi feito um controle usando pepsina porcina comercial (Sigma Chemical Co., EUA). Uma unidade de atividade (1 U) de pepsina foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina solúvel em TCA produzida, por mL de extrato bruto, por min de reação. A atividade de pepsina foi expressa em atividade específica como  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 2.2.2.3. Atividade de tripsina

A atividade da tripsina foi determinada através da hidrólise do substrato sintético  $\text{N}_\alpha$ -benzoil-DL-arginina-4-p-nitroanilida (BAPNA) (Sigma Chemical Co., EUA), segundo o método descrito por Erlanger et al. (1961). O sistema de reação (1,5 mL) continha: 0,043 a 0,129 mg ou 0,053 a 0,065 mg de proteína do homogenato de larvas de dourado ou curimba, respectivamente, 0,1 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5 contendo 20 mM  $\text{CaCl}_2$  e 1 mL de BAPNA 1 mM, dissolvido inicialmente em 1 mL de DMSO (Merck S.A., Alemanha) e completando o volume final com o mesmo tampão Tris/HCl contendo cloreto de cálcio. A reação foi interrompida pela adição de 0,25 mL de ácido acético 40% após 5 min de incubação a 37 °C. A absorbância do produto p-nitroanilida foi determinada a 410 nm. Para cada determinação foi feito um controle do extrato enzimático seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém, colocando o ácido acético no sistema de reação antes da

adição do substrato. Paralelamente foi feito um controle usando tripsina porcina comercial (Sigma Chemical Co., EUA). Uma unidade de atividade (1 U) de tripsina foi definida como a diferença da absorvância óptica a 410 nm ( $\Delta A_{410\text{nm}}$ ) entre o sistema enzimático e o seu controle, por mL de extrato bruto, por min de reação. A atividade de tripsina foi expressa em atividade específica como  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 2.2.2.4. Atividade de quimotripsina

A atividade da quimotripsina foi determinada através da hidrólise do substrato sintético N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPNA) (Sigma Chemical Co., EUA) segundo o descrito por Del Mar et al. (1979). O sistema de reação (1,5 mL) continha: 0,045 a 1,242 mg ou 0,328 a 0,133 mg de proteína do homogenato de larvas de dourado ou curimba, respectivamente, 0,3 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5 contendo 20 mM  $\text{CaCl}_2$ . A reação foi iniciada pela adição de 1 mL de SAPNA 0,1 mM (preparação fresca) dissolvido no mesmo tampão Tris/HCl contendo cloreto de cálcio. As mudanças na absorvância óptica a 410 nm foram acompanhadas a cada 30 s por 5 min a  $25 \pm 5$  °C. Para cada determinação foi feito um controle do extrato seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém, substituindo o substrato por tampão Tris/HCl. Também foram feitos um controle da auto-hidrólise do SAPNA e outro do sistema de reação utilizando quimotripsina bovina comercial (Sigma Chemical Co., EUA). Uma unidade de atividade (1 U) de quimotripsina foi definida como a diferença da absorvância óptica a 410 nm, por mL de extrato bruto, por min de reação. A atividade de quimotripsina foi expressa em atividade específica como  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 2.2.2.5. Ensaio com inibidores de proteinases

Com o objetivo de confirmar a classe de proteases presentes nos extratos, estes foram incubados com inibidores específicos de proteases em cada ensaio. Não foram feitos ensaios de inibição da atividade péptica por se considerar o pH do sistema de reação enzimática limitante para a ação de outras enzimas digestórias sobre o substrato. Após as incubações com os respectivos inibidores, as atividades residuais foram avaliadas incubando-se a solução extrato-inibidor com os respectivos substratos como o descrito nos itens 2.2.2.3. e 2.2.2.4. A percentagem (%) de inibição da atividade foi calculada pela seguinte relação:  $(\text{atividade enzimática do extrato incubado com inibidor}) \cdot (\text{atividade enzimática do extrato incubado sem inibidor})^{-1} \cdot 100$ .

#### 2.2.2.5.1. Inibição de tripsina

O extrato enzimático foi pré-incubado por 60 min a 20-25 °C com o inibidor N<sub>α</sub>-Tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) (Sigma Chemical Co., EUA) 10 mM, dissolvido em HCl 1 mM (García-Carreño, 1992), em uma proporção de 1:1 (v/v).

#### 2.2.2.5.2. Inibição de quimotripsina

O extrato enzimático foi pré-incubado por 60 min a 20-25 °C com o inibidor N-p-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) (Sigma Chemical Co., EUA) 5 mM, dissolvido em metanol (Merck S.A., Alemanha) (García-Carreño, 1992), usando uma proporção de 1:1 (v/v). Paralelamente foi feito um controle do solvente (metanol) do inibidor com o objetivo de detectar qualquer inibição por parte deste, incubando o extrato com um volume de metanol igual ao da solução do inibidor.

### 2.3. Experimento 2: uso de três diferentes épocas de transição do alimento vivo para o artificial, de forma gradual ou total

Foram testadas três épocas para a substituição do alimento vivo: no 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia AE das larvas. Em cada época foi também testada a forma de transição do alimento vivo para o alimento inerte, se gradual ou total. Na transição gradual (TG) o alimento vivo foi mantido por dois dias após o início da transição, e na transição total (TT) o alimento vivo foi retirado totalmente no dia em que se iniciou a transição alimentar. O alimento vivo utilizado foi fornecido nos mesmos método e proporção que no experimento 1. A ração de transição utilizada foi formulada e analisada no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), segundo as recomendações de Lazo (2000). A composição da ração de transição é mostrada na Tabela 1. Esta ração (0,2 a 0,6 mm de diâmetro) foi oferecida *ad libitum* a cada duas horas, exceto no período noturno (entre 1:00 e 7:00 h).

Tabela 1

Composição da ração como oferecida usada na transição alimentar de larvas de dourado

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (%)</b>
Farinha de peixe <sup>1</sup>	56,40
Farinha de minhoca <sup>2</sup>	11,70
Farinha de ovo <sup>3</sup>	4,25
Amido pré-gelatinizado <sup>4</sup>	10,63
Óleo de fígado de bacalhau <sup>5</sup>	4,25
Óleo de canola <sup>6</sup>	3,19
Lecitina de soja <sup>7</sup>	1,06
Fosfato bicálcico	1,06
Cloreto de colina <sup>8</sup>	3,19
Premix vitamínico-mineral <sup>9</sup>	4,25
Vitamina C <sup>10</sup>	0,20

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (%)</b>
Matéria seca	91,34
Proteína bruta	51,12
Extrato etéreo	19,62
Extratos não nitrogenados	12,14
Fibra bruta	1,13
Cinzas	7,33

<sup>1</sup> Farinha de peixe feita exclusivamente com filé de pescada (*Cynoscion* sp). Proteína: 73,15%, lipídios: 14,43%.

<sup>2</sup> Brazil Eco-Worms (Lajeado, RS, Brasil). Proteína: 64%, lipídios: 6,56%, fibra: 3,3%, extratos não-nitrogenados (ENN): 17,6%, cinza: 7,59%; cálcio: 0,5%, fósforo: 0,9%, energia digestível: 4.060 kcal/kg.

<sup>3</sup> Cami, Mizumoto Alimentos (São Paulo, SP, Brasil). Proteína: 44%, lipídios: 38%, cinzas: 5%.

<sup>4</sup> Sinha, Caramuru Alimentos (Apucarana, PR, Brasil). Proteína: 6%, lipídios: 2%, fibra: 4%, ENN: 74%; energia bruta: 3.400 kcal/kg.

<sup>5</sup> Delaware LTDA (Porto Alegre, RS, Brasil).

<sup>6</sup> Bunge Alimentos (Gaspar, SC, Brasil). Em 100 mL: lipídios totais: 93,3 %; ácidos graxos saturados: 6,7 %; ácidos graxos monossaturados: 60,0 %; ácidos graxos poliinsaturados: 26,7 %; n-3: 6,7 %; vitamina E: 20 mg. Energia bruta: 8.000 kcal/L.

<sup>7</sup> Bunge Alimentos (Gaspar, SC, Brasil).

<sup>8</sup> Sigma Chemical Co. (EUA).

<sup>9</sup> Nutron Alimentos S.A (Campinas, SP, Brasil). Suplemento Mineral Vitamínico para peixes 805 AP Plus. Níveis de garantia por kg de produto: ácido fólico: 250 mg; ácido pantotênico: 5.000 mg; antioxidante: 0,60 g; biotina: 125 mg; cobalto: 25 mg; cobre: 2.000 mg; colina: 75.000 mg; ferro: 13.820 mg; iodo: 100 mg; manganês: 3.750 mg; niacina: 5.000 mg; selênio: 75 mg; vitamina A: 1.000.000 UI; vitamina B<sub>1</sub>: 1.250 mg; vitamina B<sub>12</sub>: 3.750 mg; vitamina B<sub>2</sub>: 2.500 mg; vitamina B<sub>6</sub>: 1.875 mg; vitamina C: 42.000 mg; vitamina D<sub>3</sub>: 500.000 UI; vitamina E: 20.000 UI; vitamina K<sub>3</sub>: 500 mg; zinco: 17.500 mg.

<sup>10</sup> Basf (EUA).

Ao final do experimento, no 9º dia AE, foi realizada a contagem das larvas sobreviventes em cada unidade experimental. Estas foram fixadas em formol tamponado 3,7% (0,4 g de fosfato de sódio monobásico anidro, 0,45 g de fosfato de sódio dibásico heptaidratado, 10 mL de formalina 37% e quantidade suficiente de água destilada para 100



mL). Os parâmetros analisados foram: taxa de sobrevivência (%) ( $[\text{número final de larvas}] \cdot [\text{número inicial de larvas}]^{-1} \cdot 100$ ), CT (mm) e peso médio individual (g). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial com seis tratamentos e três repetições.

#### 2.4. Análises estatísticas

Os dados de ambos os experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, ao teste de Tukey para a comparação entre as médias aritméticas, adotando-se um nível de significância de 5%. Os resultados de sobrevivência foram transformados aplicando a raiz quadrada e o arco seno antes da aplicação da ANOVA. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico “SigmaStat” para Windows (versão 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, EUA).

### 3. Resultados

#### 3.1. Experimento 1: desenvolvimento ontogenético de três proteinases

##### 3.1.1. Crescimento

As larvas de dourado já apresentaram a boca aberta 24 h AE, aumentando de  $0,0015 \pm 0,0001$  a  $0,0372 \pm 0,0085$  g durante os sete dias de experimento, representando um incremento de 24,8 vezes do peso total individual inicial (Fig. 1).

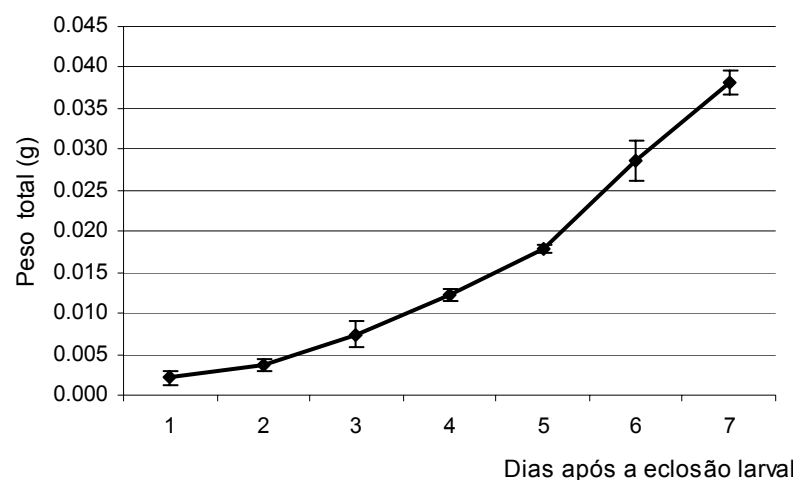


Fig. 1. Crescimento em peso úmido total diário (g) das larvas de dourado durante o período experimental (sete dias). Os valores correspondem à média de 20 indivíduos por dia.

### 3.1.2. Atividades enzimáticas

O perfil das atividades específicas (média  $\pm$  desvio padrão) das enzimas em função do tempo AE é mostrado na Fig. 2.

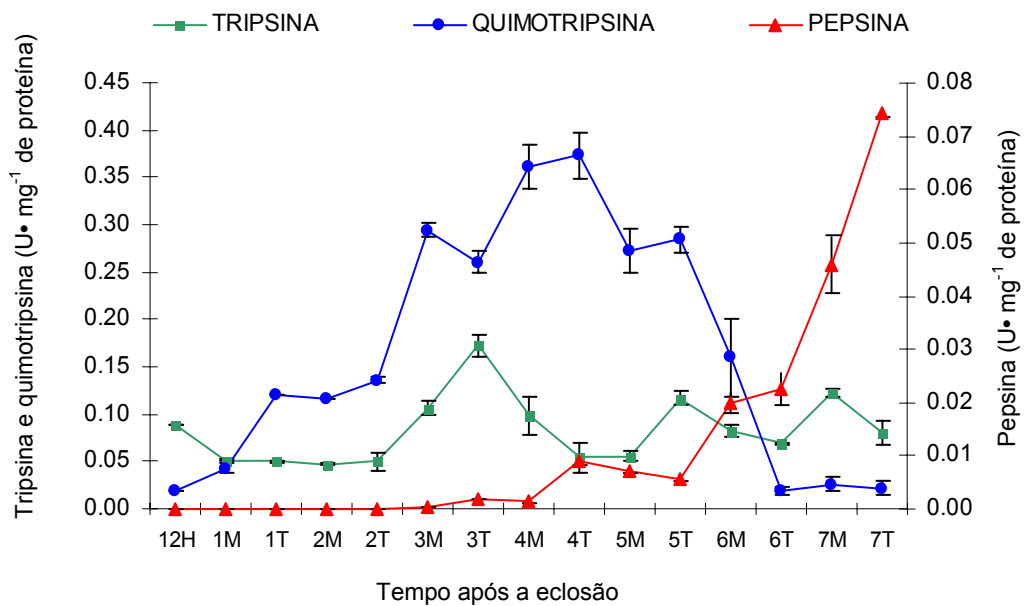


Fig. 2. Perfil da atividade enzimática (média  $\pm$  desvio padrão) de tripsina ( $\Delta A_{410nm} \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$  de proteína), quimotripsina ( $\Delta A_{410nm} \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$  de proteína) e pepsina ( $\mu mol$  de tirosina  $\cdot mL^{-1} \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$  de proteína) em larvas de dourado alimentadas com larvas de curimba, durante a primeira semana após a eclosão (AE). 12H = 12 h AE, os números precedidos por M (manhã) ou T (noite) indicam os dias após a eclosão.

A atividade de tripsina e quimotripsina foi detectada precocemente, quando as larvas estavam com doze horas de vida (12H) ( $0,088 \pm 0,0$  e  $0,018 \pm 0,0$  U  $\cdot mg^{-1}$  de proteína, respectivamente). A atividade específica de tripsina atingiu o máximo valor no terceiro dia AE à noite (3T) ( $0,173 \pm 0,011$  U  $\cdot mg^{-1}$  de proteína); enquanto em 12H, no quinto dia AE (5T) e no sétimo dia AE de manhã (7M), foram detectados três picos menores de atividade ( $0,088 \pm 0,0$ ,

0,116±0,008 e 0,122±0,004 U • mg<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente). Entre 1M a 2T, a atividade se manteve constante (entre 0,047±0,001 e 0,051± 0,001 U • mg<sup>-1</sup> de proteína).

A atividade de quimotripsina incrementou rapidamente entre 12H e 4T (0,018±0,0 a 0,373±0,025 U • mg<sup>-1</sup> de proteína), diminuindo posteriormente a partir de 4T até 6T (0,272 ±0,023 a 0,019±0,047 U • mg<sup>-1</sup> de proteína) e daí mantendo-se constante até o final do experimento. Entre 1T e 6M a atividade de quimotripsina foi maior quando comparada àquela de tripsina, chegando a ser 6,9 vezes maior em 4T. Porém, nos demais períodos, aconteceu o inverso, chegando a tripsina a ser 4,8 vezes maior que a atividade de quimotripsina (12H).

A atividade específica de pepsina (0,0004±0,0 U • mg<sup>-1</sup> de proteína) foi detectada somente a partir de 3M. Notórios incrementos foram detectados entre 4M a 4T, e 5T a 6M (0,0015±0,0005 a 0,0091±0,0007 e 0,0056±0,0003 a 0,020±0,0019 U • mg<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente). Posteriormente, a atividade de pepsina foi aumentando até o final do experimento, atingindo um valor de 0,074±0,008 U • mg<sup>-1</sup> de proteína em 7T. Foi evidente a gradual diminuição da atividade específica de quimotripsina, entre 4T e 6T, à medida que a atividade péptica aumentava.

As atividades enzimáticas encontradas nas duas amostragens (24 e 48 h AE) de curimba foram de 0,083±0,002 e 0,110±0,003 U • mg<sup>-1</sup> de proteína para tripsina e 0,043±0,001 e 0,064±0,0 U • mg<sup>-1</sup> de proteína para quimotripsina. Não foi detectada atividade de pepsina, nas condições ensaiadas, em nenhum dos dois estágios larvais de curimba. A atividade de tripsina foi maior em ambas as idades de curimba se comparadas com aquelas encontradas em dourado. No entanto, a atividade de quimotripsina foi igual em ambas as espécies 24 h AE, e maior em dourado 48 h AE. A tabela 2 mostra as atividades das enzimas de dourado e curimba 24 e 48 h AE.

Tabela 2

Comparação das atividades específicas (U • mg<sup>-1</sup> de proteína) de tripsina e quimotripsina de larvas de dourado e curimba 24 e 48 h AE.

Larva	Enzima	Atividade específica (U • mg <sup>-1</sup> de proteína)	
		24 h AE	48 h AE
Curimba	Tripsina	0,083	0,110
	Quimotripsina	0,043	0,064
Dourado	Tripsina	0,052	0,048
	Quimotripsina	0,043	0,117

### 3.1.3. Atividade em presença de inibidores

A percentagem de inibição da atividade de tripsina usando TLCK foi de 100% em todos os extratos amostrados, confirmando a classe da enzima ensaiada.

O uso de TPCK no ensaio para quimotripsina mostrou percentagens de inibição entre 38,1 a 99,5% (5T e 7T, respectivamente) (Fig. 3). A incubação com metanol não influenciou a atividade específica nos ensaios de quimotripsina, com exceção em 6M (36,6% de inibição da atividade específica total). Não foi possível fazer testes de inibição com as amostras 12H a 2T, nem com aquelas de curimba, devido à pouca quantidade de extrato bruto disponível.

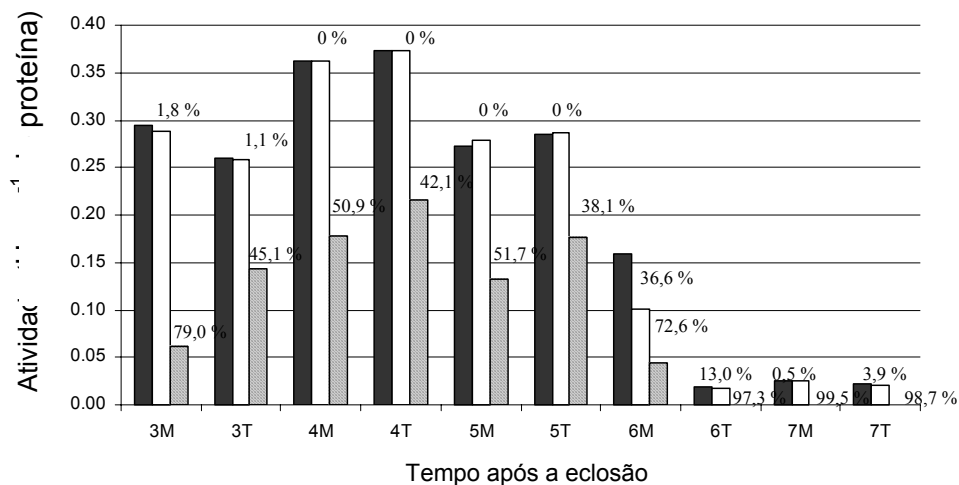


Fig. 3. Efeito do inibidor TPCK e do solvente metanol sobre a atividade da quimotripsina ( $U \cdot mg^{-1}$  de proteína) em larvas de dourado durante a primeira semana de vida após a eclosão. Os números indicam a percentagem de inibição da atividade total obtida por amostragem. Colunas pretas: atividade específica total; colunas brancas: atividade com metanol; colunas listradas: atividade com TPCK.

*3.2. Experimento 2: uso de três diferentes épocas de transição do alimento vivo para o artificial, de forma gradual ou total*

A aceitação da ração ocorreu a partir do 5º dia AE, naquelas larvas que foram submetidas a TG e TT nesse mesmo dia. As larvas que foram submetidas à transição alimentar (TG e TT) no 3º dia AE também iniciaram a ingestão de ração somente a partir do 5º dia AE. A sobrevivência (Fig. 4) foi significativamente menor ( $P<0,05$ ) no 3º e 5º dias AE se comparada com a obtida pelas larvas cuja transição ocorreu no 7º dia AE. Neste dia não houve diferença significativa entre a sobrevivência de TT e TG ( $48,66\pm1,76\%$  e  $61,99\pm11,85\%$ , respectivamente). Nos outros tratamentos a sobrevivência foi sempre superior quando a transição foi gradual.

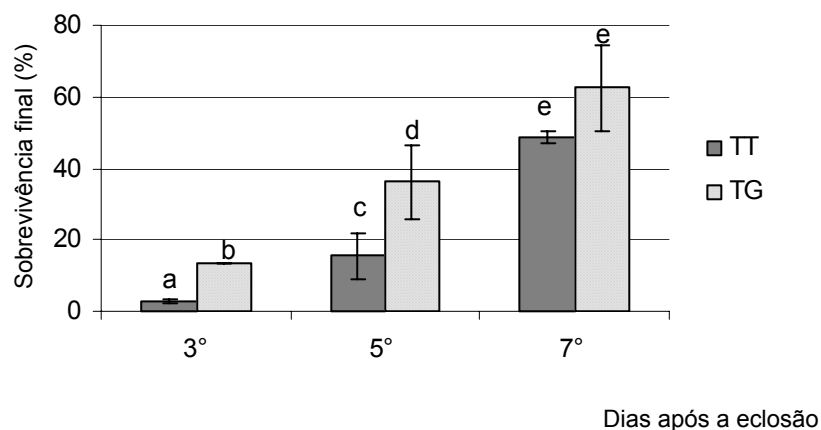


Fig. 4. Perfil de sobrevivência final de larvas de dourado no 9º dia após eclosão (AE), submetidas a transição alimentar no 3º, 5º ou 7º dias AE, com transição total (TT) ou gradual (TG) do alimento vivo. *Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P<0,05$ ).*

O peso inicial médio das larvas utilizadas (12 h AE) foi de  $0,0015\pm0,001$  g, e o CT, de  $6,0\pm0,2$  mm. No final do 9º dia AE, os maiores valores de CT foram obtidos para as larvas cuja transição foi feita no 3º dia TT ( $20,93\pm1,33$  mm) e no dia 7º dia TG ( $20,41\pm0,80$  mm). Os valores obtidos nos outros tratamentos foram significativamente menores ( $P<0,05$ ). Os maiores valores de peso foram obtidos para as larvas cuja transição foi feita no 3º dia TT ( $0,067\pm0,014$  g) e no dia 7º dia TG ( $0,078\pm0,009$  g) (Fig. 5 A, B).

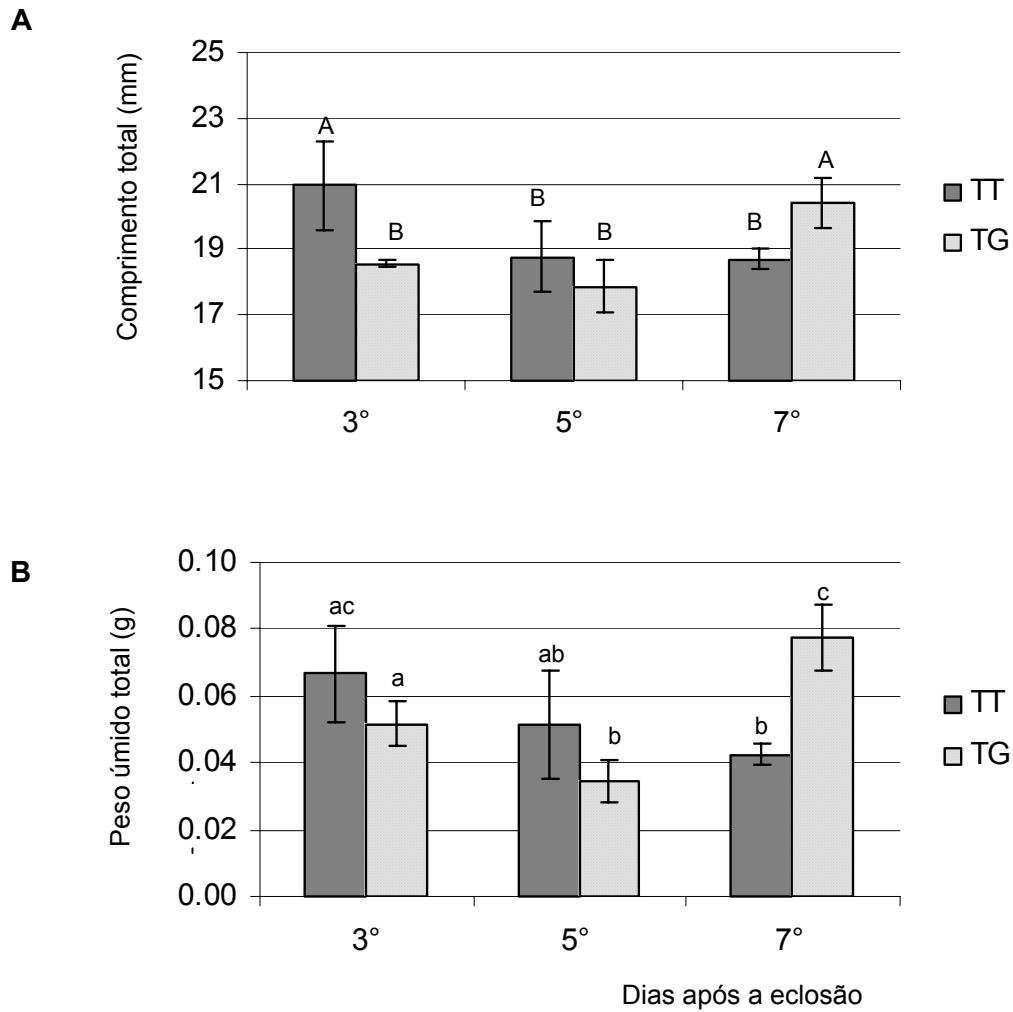


Fig. 5. Comprimento total (**A**) e peso úmido total (**B**) de larvas de dourado no 9° dia após eclosão (AE), submetidas a transição alimentar no 3°, 5° ou 7° dias AE, com transição total (TT) ou gradual (TG) do alimento vivo. Os valores correspondem à média das triplicatas. *Letras diferentes indicam diferença significativa de comprimento total (A, B) e peso total (a, b, c) ( $P < 0,05$ ).*

## 4. Discussão

O principal objetivo na alimentação larval deve ser o fornecimento de nutrientes de fácil digestão e assimilação usando-se para isto alimento vivo, inerte ou uma combinação de ambos com baixo custo. A estratégia de alimentação durante a fase de larvicultura de peixes vai depender da informação disponível sobre o desenvolvimento do sistema digestório: indicadores morfológicos, tais como o tamanho e o momento da abertura da boca e do ânus e a formação do estômago, do intestino e de outros órgãos com funções digestórias como o pâncreas e o fígado, e fisiológicos, como o aparecimento da atividade das diversas enzimas envolvidas nos processos de digestão e absorção de nutrientes (Segner et al., 1993; Chong et al., 2002).

### 4.1. Desenvolvimento ontogenético de enzimas digestórias em larvas de dourado

O presente estudo mostrou o aparecimento tardio da pepsina em larvas de dourado, com notáveis incrementos a partir de 108 h AE (4T). Alguns estudos têm mostrado que esta enzima apresenta pouca atividade nos primeiros estágios larvais (Clark et al., 1986; Moyano et al., 1991; Walford e Lam, 1993). Kawai e Ikeda (1973) (apud Chong et al., 2002), porém, relataram atividades significativas de pepsina em alevinos de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, com dois a três dias de idade. As observações do presente estudo mostram que, apesar de a larva de dourado apresentar estômago no 3º dia AE (Nakatani et al., 2001; Santos e Godinho, 2002), a atividade da pepsina foi notória somente no final do 4º dia AE. Observações similares foram relatadas em larvas do bagre-africano *Clarias gariepinus* e do acará-disco *Symphysodon aequifasciata*, nos quais a atividade de pepsina foi encontrada cerca de cinco a seis dias após a formação do estômago (Verreth et al., 1992; Chong et al., 2002). Ribeiro et al. (1999) descreveram que no linguado-do-Senegal, *Solea senegalensis*, a atividade péptica foi detectada no dia 27 AE, enquanto estruturas rudimentares do estômago já estavam formadas dois dias AE, mostrando que as glândulas secretoras não estariam ativas até o dia 27. Estes relatos indicam que a aparição do estômago como estrutura não implicaria a sua funcionalidade. Segner et al. (1993) propuseram a definição de “estômago larval” como uma estrutura que possui glândulas digestórias, parede do piloro diferenciada, ambiente ácido no lúmen e presença de atividade significativa de pepsina. A baixa atividade de pepsina nos primeiros estágios larvais tem sido sugerida como uma das maiores razões para o baixo desempenho de rações microformuladas (Dabrowski, 1984; Segner et al., 1993; Kolkovski, 2001). Estudos com o bagre-africano e o turbot, *Scophthalmus maximus*, relataram que o uso de alimentação exógena resultou em crescimento satisfatório somente quando a larva

alimentada apresentava estômago funcional. A diferenciação funcional do estômago, portanto, é um evento decisivo, podendo ser usado como um sinal para a transição do alimento vivo ao inerte nessas espécies (Verreth et al., 1992; Segner et al., 1993). Em contraposição, alguns autores indicam que alguns parâmetros bioquímicos, tais como presença e níveis de certas proteases, bem como a presença de certos órgãos do sistema digestório, considerados vitais nos processos de digestão das larvas, não estão relacionados a sua capacidade de digerir rações artificiais. Este é o caso de alguns coregonídeos e do linguado-do-Senegal, os quais têm capacidade de aceitar alimentação exógena artificial mesmo antes de ter o estômago totalmente formado (Segner et al., 1993; Walford e Lam, 1993; Ribeiro et al., 1999).

Nos primeiros dias do estágio larval do dourado foram observadas atividades de tripsina e quimotripsina, mesmo antes de a larva abrir a boca. O mesmo foi relatado para larvas de diversas espécies como: o linguado-legítimo, *Solea solea* (Clark et al., 1986), o pargo, *Sparus aurata* (Moyano et al., 1991), o barramundi, *Lates calcarifer* (Walford e Lam, 1993), o linguado-do-Senegal (Ribeiro et al., 1999), o “seabass”, *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante e Cahu, 2001), o acará-disco (Chong et al., 2002), o “pacific threadfin”, *Polydactylus sextifilis*, o xaréu-barbatana-azul, *Caranx melanpygus* (Kim et al., 2001), a perca, *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres e Kestemont, 2002), e o sargo, *Diplodus sargus* (Cara Torres et al., 2002). No turbot estas enzimas estão presentes depois de a larva abrir a boca (Munilla-Moran e Stark, 1989). Estas enzimas e as glândulas responsáveis pela sua secreção também têm sido detectadas no saco vitelínico de algumas larvas, o que poderia explicar sua presença nos primeiros estágios larvais (Chong et al., 2002).

Em larvas do dourado o aparecimento da atividade de quimotripsina e tripsina foi simultânea em 12 h AE (12H), tal como no linguado-legítimo (Clark et al., 1986), a perca (Cuvier-Péres e Kestemont, 2002) e o barramundi (Walford e Lam, 1993). Em algumas espécies de peixes marinhos e de água doce tem se observado um aparecimento tardio de quimotripsina quando comparado com tripsina (Chong et al., 2002). No presente estudo a quimotripsina foi identificada como a maior atividade proteolítica alcalina entre o 1° e 6° dias AE nas larvas do dourado, concordando como o relatado para o linguado-legítimo (Clark et al., 1986) e a carpa (Ragyanszky, 1980) os quais apresentam essa relação durante a maioria dos seus estágios de desenvolvimento. Em contraposição, estudos feitos com o pargo (Chong et al., 2002), o “seabass” (Eshel et al., 1993) e o bagre-africano (Verreth et al., 1992) demonstram que nessas espécies a principal enzima proteolítica alcalina é a tripsina. No presente trabalho a atividade de tripsina foi maior que quimotripsina em 12H, 6T e 7T. O uso do inibidor de quimotripsina, TPCK, mostrou percentagens de inibição entre 38,1 e 99,7% (5T e 7T, respectivamente), provavelmente indicando, onde a percentagem de inibição distancia de



100% (3T a 5T), a presença de enzimas tipo-quimotripsina (“chymotrypsin-like”) insensíveis a TPCK, as quais estariam auxiliando na digestão alcalina protéica em fases do desenvolvimento larval do dourado. Além da proporção inibidor:extrato 1:1 (v/v) também foi testada a proporção 10:1 (v/v), com o objetivo de confirmar que a pouca inibição entre 3M e 6M não era devida à pouca quantidade de inibidor ou metanol incubada com os extratos enzimáticos. O grau de inibição do metanol e do TPCK foram iguais aos obtidos na proporção original. O grau de inibição por parte de inibidores específicos tem se mostrado muito variável entre as diferentes espécies de peixes (Alarcón et al., 1997). Em larvas de dourado o metanol usado como solvente do inibidor TPCK não inibiu a atividade enzimática de quimotripsina, diferente do encontrado em fases juvenis (cinco e nove meses de idade) de dourado (Sugai et al., 2002), o que poderia indicar a presença de diferentes formas da mesma enzima (isoformas) com sensibilidade diferente ao metanol nos variados estágios de crescimento desta espécie.

Foi evidente a diminuição da atividade de quimotripsina à medida que a atividade péptica aumentava. Tal comportamento poderia ser explicado considerando-se o local de ação das enzimas: a pepsina age hidrolizando ligações peptídicas do lado amino-terminal dos resíduos de aminoácidos aromáticos e ácidos; enquanto a quimotripsina, nas ligações do grupo carbonila desses mesmos resíduos (Nelson e Cox, 2000). A alta atividade de quimotripsina, enquanto ainda não existe atividade péptica, poderia ser um meio de compensar a falta da digestão ácida da pepsina. Uma relação pepsina-tripsina tem sido relatada em larvas do barramundi, observando um decréscimo da atividade de tripsina com o incremento na atividade de pepsina (Walford e Lam, 1993). Tem sido observado que, em geral, à medida que a atividade das proteinases ácidas aumenta, a das alcalinas diminui (Horn, 1997).

O comportamento oscilante da atividade de tripsina nas larvas de dourado é muito similar ao encontrado em larvas do barramundi (Walford e Lam, 1993), do linguado-do-Senegal (Ribeiro et al., 1999), do “seabass” (Zambonino-Infante e Cahu, 2001) e da perca (Cuvier-Péres e Kestemont, 2002). Nestes estudos foi observado um pico de maior atividade no início do estágio larval, seguido por picos de atividade menores. Para as espécies citadas o pico de maior atividade foi detectado entre o 5° e 17° dia AE; enquanto em larvas de dourado foi detectado precocemente no 3° dia AE, devido à alta taxa de crescimento dessa espécie, que acaba acelerando o desenvolvimento digestório da larva.

Acredita-se que não houve uma contribuição das enzimas do alimento vivo para a digestão em larvas de dourado devido à ausência de pepsina nas duas fases de curimba usadas como alimento, bem como pelo fato de que as atividades de tripsina e quimotripsina foram detectadas antes de as larvas começarem a se alimentar (12 h AE), não se observando uma relação entre as mudanças de atividade nas larvas de dourado e aquela apresentada por

curimba nas fases posteriores. As larvas de dourado apresentaram uma atividade menor de tripsina, se comparadas com a de larvas de curimba de 24 e 48 h AE. Os valores de atividade de quimotripsina foram iguais em ambas espécies de larvas 24 h AE, sendo que 48 AE a atividade desta enzima foi superior no dourado. Estudos recentes têm verificado a capacidade da larva de produzir a maioria das enzimas digestórias próximo ou quando inicia a alimentação exógena, sugerindo a contribuição de enzimas exógenas desnecessária nos seus processos digestórios (Segner et al., 1993; Cahu e Zambonino-Infante, 2001; Kim et al., 2001; Cara Torres et al., 2002). Mesmo assim, Kolkovski (2001) mostra a importância da contribuição de enzimas do alimento vivo em algumas espécies (carpa comum *Cyprinus carpio*, carpa capim *Ctenopharyngodon idellus*, truta arco-íris, turbot, pargo e *Coregonus* sp), relatando que a percentagem de contribuição de certas enzimas pode chegar até 98% da atividade enzimática total no trato digestório larval. Alguns autores afirmam que, além de contribuir com enzimas digestórias, o alimento vivo poderia prover alguns fatores que estimulariam respostas endócrinas, as quais, por sua vez, estimulariam as secreções pancreáticas nas larvas predadoras (Zambonino-Infante e Cahu, 2001).

Vários autores têm estudado o perfil e o aparecimento das enzimas proteolíticas em larvas de peixes, observando um aumento da atividade de tais enzimas em relação ao aumento de tamanho corporal e da idade do organismo (Alarcón et al., 1997). Porém, em algumas espécies a atividade específica detectada nos estágios larvais tem sido maior que aquela encontrada em fases juvenis ou adultas e tem sido atribuída às modificações anatômicas e fisiológicas durante o desenvolvimento (Walford e Lam, 1993). Apesar de haver uma grande flutuação das atividades enzimáticas proteolíticas alcalinas na primeira semana de vida do dourado, estas atividades são em geral menores se comparadas àquelas encontradas em fases juvenis (cinco e nove meses de idade) (0,283 e 0,186 U • mg<sup>-1</sup> de proteína (pepsina), 0,206 e 1,147 U • mg<sup>-1</sup> de proteína (tripsina) e 0,938 e 9,681 U • mg<sup>-1</sup> de proteína (quimotripsina)) (Sugai et al., 2002). É importante considerar que devido ao fato de a atividade enzimática ser expressa em relação à quantidade de proteínas solúveis presentes nos homogenatos (atividade específica), as alterações das diferenças de atividade entre as diferentes fases de crescimento, principalmente as que levam à diminuição progressiva da atividade específica, são devidas à manutenção das quantidades de enzimas sintetizadas e/ou secretadas e ao incremento da quantidade de proteínas solúveis no organismo em desenvolvimento. Esta possibilidade é mais freqüente em larvas em fase de crescimento, já que sua fração tissular vai aumentando e, conseqüentemente, o conteúdo em proteína solúvel do corpo também aumenta progressivamente (Cara Torres et al., 2002). No presente estudo a quantidade de proteína solúvel dos extratos usados foi semelhante na maioria dos

homogenatos, o que justificaria a real expressão da atividade enzimática mesmo baseada na quantidade de proteína do extrato bruto utilizado.

#### 4.2. Transição alimentar em larvas de dourado

No presente estudo, as larvas de dourado, cultivadas e mantidas a uma temperatura d'água de  $24,1 \pm 2,0$  °C, ingeriram larvas de curimba desde a primeira vez em que estas últimas foram ofertadas (24 h AE), similarmente ao descrito por Zaniboni-Filho et al. (1988), Zaniboni-Filho (1997) e Santos e Godinho (2002). No entanto, Morais Filho e Schubart (1955) observaram que larvas de dourado cultivadas a uma temperatura de 26 °C iniciaram a ingestão do alimento exógeno somente no 5° dia AE. Pinto e Guglielmoni (1986) observaram o início da ingestão do alimento às 6 h AE, em larvas de dourado cultivadas entre 27 a 28 °C. Todos estes estudos afirmam que a larva de dourado apresenta uma evidente preferência alimentar por larvas de peixes como curimba e piapara (*Leporinus elongatus*), quando comparada com a ingestão de *Artemia* (natural e congelada) ou ração (Pinto e Guglielmoni, 1986; Zaniboni-Filho et al., 1988; Luz et al., 2000).

No presente estudo observou-se que os valores mais altos de sobrevivência registrados sempre foram obtidos nos tratamentos nos quais a transição foi feita de forma gradual, exceto nos tratamentos 7 TT e 7 TG, mostrando claramente a necessidade de uma etapa de treinamento de mais de um dia, no qual a ração é ofertada simultaneamente com o alimento vivo. Ficou evidente a grande importância do alimento vivo na taxa de sobrevivência. É sugerido que o alimento vivo seria mais atrativo pelo seu movimento, que estimularia o instinto natural de caça das larvas de peixes (Jones et al., 1991), ou ainda por possuir substâncias químicas atrativas (Kolkovski, 2001), além do seu grande valor nutricional (Kubitza e Lovshin, 1999).

Neste estudo se observou que a ração foi aceita no 5° dia AE pelas larvas que nesse dia sofriam a transição alimentar (gradual ou total). Similarmente, as larvas que foram submetidas à transição alimentar dois dias antes aceitaram a ração também no 5° dia AE. Luz et al. (2000) relatam que larvas de dourado cultivadas a uma temperatura média de 26,1 °C começaram a aceitar ração comercial para camarão (56% de proteína bruta) no 3° dia AE. No final do período experimental de quatro dias o máximo valor de sobrevivência obtido foi de 13,7%, correspondente ao tratamento alimentado com a ração comercial e larvas de curimba. É importante associar estes resultados ao fato de que, para algumas espécies de peixes, é de fundamental importância que a larva possua um estômago funcional para poder aproveitar os nutrientes contidos nas rações, já que estas são menos digestíveis que o alimento vivo.

Problemas de aceitabilidade e digestibilidade de ração são comuns em larvas de peixes carnívoros (Jones et al., 1991). A ração fornecida no presente estudo foi formulada com ingredientes selecionados, que apresentam alta digestibilidade de nutrientes e atratividade. A farinha de filé de pescada (*Cynoscion* sp) é um ingrediente rico em proteína, possuindo um perfil de aminoácidos adequado para peixes, além de ácidos graxos essenciais (Lovell, 1998). A farinha de minhoca vem sendo utilizada como atrativo, tendo inibido o canibalismo em rações formuladas para larvas e alevinos de várias espécies de peixes como a truta, entre outras, devido a seu elevado conteúdo protéico e à qualidade dos seus ácidos graxos. Tem substituído a farinha de peixe, em rações para tilápia, mostrando bons resultados quando usada numa concentração de até 50% da ração (Rotta, 2000).

No presente estudo observou-se que as larvas apenas consumiam a ração quando esta ainda se encontrava na coluna de água (decantando para o fundo do tanque). O comportamento das larvas era de “caça” à ração. Tem sido relatado que rações nutricionalmente completas são rejeitadas pelas larvas, e rações desbalanceadas, aceitas. Isto demonstra que, além da qualidade nutricional da ração, é extremamente importante considerar-se outros fatores ligados às suas propriedades físico-químicas (Kolkovski et al., 2001; Cahu e Zambonino-Infante, 2001).

Apesar do oferecimento de alimento (vivo ou inerte) durante todo o período experimental, foi registrada uma alta ocorrência de canibalismo. Este fenômeno tem sido amplamente descrito em larvas de dourado, sendo considerado como o grande entrave para o cultivo desta espécie (Morais Filho e Schubart, 1955; Pinto e Gugliemone, 1986; Zaniboni-Filho et al., 1988; Luz et al., 2000). No presente estudo o canibalismo não foi quantificado, mais foi observado em todos os tratamentos. Foi evidente o aumento do comportamento agressivo e canibal das larvas, acompanhado da mudança na maneira de se agrupar e distribuir no tanque de cultivo uma vez retirado o alimento vivo. As larvas, que no primeiro tempo agrupavam-se e mostravam um comportamento de cardume, começavam a apresentar um comportamento canibal e ficar isoladas, sem formar grupos. O tratamento no qual o alimento vivo foi retirado primeiro (3° TT) mostrou baixa taxa de sobrevivência ( $2,66 \pm 0,66\%$ ), a qual foi devida provavelmente à alta percentagem de canibalismo, durante o período sem alimento vivo e quando a ração ainda não era aceita. As larvas mantidas quase até o final do período experimental com alimento vivo (7° TG) não mostraram tal mudança do comportamento, atingindo uma alta sobrevivência ( $61,99 \pm 11,85\%$ ). Luz et al. (2000) observaram e quantificaram altas taxas de canibalismo num período de quatro dias de experimento, quando o mesmo tipo de alimento vivo utilizado no presente estudo foi empregado para larvas de dourado. Tal fato provavelmente está relacionado às menores quantidades de alimento vivo fornecido, que foram

de somente 3 larvas de curimba/larva de dourado/dia, quando comparado com 5 a 16 larvas usadas no presente estudo. Pinto e Guglielmoni (1986) observaram comportamento canibal 24 h AE em larvas de dourado, quando zooplâncton selvagem foi usado como alimento. Zaniboni et al. (1988) observaram semelhante comportamento no 6° dia AE, usando larvas de piapara como alimento vivo. Em trabalhos conduzidos no LAPAD (resultados não publicados) obteve-se uma sobrevivência de 72,4 % durante seis dias de larvicultura de dourado, quando ofertaram-se 32 larvas forrageiras ao longo do período experimental. Em outro trabalho no LAPAD, procurando estabelecer o consumo diário de larvas forrageiras por pós-larvas de dourado, observou-se que aproximadamente 40 larvas forrageiras de curimba/larva de dourado foram consumidas no sétimo dia de larvicultura, e o consumo médio nos primeiros sete dias AE foi de aproximadamente 16 larvas forrageiras por larva de dourado por dia; não sendo observado canibalismo. No presente estudo a densidade de cultivo do dourado foi de 15 larvas/L, número considerado adequado para o crescimento do dourado nessa fase (dados não publicados, LAPAD). No cultivo de larvas, o canibalismo pode estar associado à homogeneidade de tamanho e à densidade larval, como também às quantidades de alimento oferecido (Kubitza e Lovshin, 1999). No presente estudo possivelmente a quantidade do alimento vivo influenciou o comportamento canibal e, conseqüentemente, as taxas de sobrevivência do cultivo, tal como indicado por alguns autores (Kubitza e Lovshin, 1999).

Os maiores valores de peso total individual e comprimento total foram obtidos pelas larvas submetidas aos tratamentos 3° TT e 7° TG. Entretanto, quando estes resultados são analisados em conjunto com a sobrevivência obtida em cada tratamento, observa-se que, apesar de apresentar bom crescimento, as larvas que sofreram “desmame” no 3° dia AE apresentaram baixas taxas de sobrevivência. Para entender este fato é importante considerar que houve um aumento do canibalismo observado no momento em que o alimento vivo foi retirado e o fato de que a aceitação da ração se deu somente a partir do 5° dia AE. Pode-se supor que os indivíduos que foram submetidos à transição nos primeiros dias e sobreviveram até o final do experimento eram os “canibais”, já que não ingeriram ração nos dois primeiros dias após a transição e não tinham larvas de curimba disponíveis. Assume-se que estes indivíduos teriam predado seus congêneres, atingindo, conseqüentemente, um maior crescimento final. Por outro lado, aqueles tratamentos que sofreram a transição alimentar no 7° dia apresentaram bom crescimento e altas taxas de sobrevivência.

## 5. Conclusões

As larvas de dourado, desde 12 h AE, possuem potencial capacidade para digerir proteínas através das atividades de tripsina e quimotripsina, apesar de não ingerirem alimento nesta fase. A atividade péptica foi detectada no 3º dia AE, mas um aumento expressivo dessa atividade no 7º dia AE juntamente com a verificação da aceitação do alimento inerte indicariam que é recomendável realizar a transição alimentar neste último dia, em forma gradual, ofertando-se o alimento vivo por pelo menos dois dias após o início do oferecimento da ração. Destaca-se, entretanto, a capacidade da larva de dourado de aceitar ração desde o 5º dia AE. Faz-se necessário o aprofundamento dos estudos na área de nutrição da larva do dourado, visando a otimizar a formulação de uma ração de transição para larvas desta espécie.

## Agradecimentos

Os autores deste trabalho agradecem o suporte financeiro de Tractebel Energia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil) pela bolsa de estudos de O.V.O., à Profª Aimê Rachel Magenta Magalhães pelo homogeneizador Van Potter cedido e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio a J.K.S.

## Referências

- Alarcón, F. J., Díaz, M., Moyano, F. J. 1997. Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications. In: Tacon A. G. J., Basurco B. (eds.). Feeding tomorrow's fish: proceedings of the workshop of the CIHEAM Network on... Zaragoza: Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes; FAO; Instituto Español de Oceanografía, pp.113-121.
- Alarcón López, F. J., Martínez Díaz, M. I. 1998. Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. Revista Aquatic. 5, Zaragoza. Disponível em: < <http://www.revistaaquatic.com/>>.
- Anson, M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J Gen Physiol. 22, 79-85.
- Cahu, C., Zambonino-Infante, J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200, 161-180.

- Cara Torres, J. B., Moyano, F. J., Fernández Días, C., Yúfera, M. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). In: I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA), 2002. Disponible em <<http://www.civa2002.org>>, 110-121.
- Chong, A., Hashim, R., Lee, L., Ali, A. b. 2002. Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciata* larva. *Aquacult. Nutr.* 33, 663-672
- Clark, E., Murray, K. R., Stark, J. R. 1986. Protease development in Dover sole [*Solea solea* (L)]. *Aquaculture* 53, 253-262.
- Cuvier-Péres, A., Kestemont, P. 2002. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 279-285.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present <<state of the art>> and perspectives. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 24 (6), 807-833.
- Del Mar, E., Largman, C., Brodrick, J., Geokas, M. 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 99, 316-320.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Eshel, A., Lindner, P., Smirnoff, P., Newton, S., Harpaz, S. 1993. Comparative study of the proteolytic enzymes in the digestive tracts of the european sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 106, 627-634.
- Froese, R., Pauly, D. (Eds.). 2003. FishBase. Disponible em: <[www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)>.
- García-Carreño, F. L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Educ.* 3, 145-150.
- Géry, J., Lauzanne, L. 1990. Les types des espèces du genre *Salminus* Agassiz, 1829 (Ostariophysi, Characidae) du Musée National d'Histoire Naturelle de Paris. *Cybium* 14 (2), 113-124.
- Herriott, R. M. 1955. Swine pepsin and pepsinogen. In: *Methods in Enzymology* Vol. II. Colwick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds). Academic Press, New York, USA. pp. 3-7.
- Horn, M. H. 1997. Feeding and digestion. In: EVANS, D. H. (Ed.). *The physiology of fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 52-55.
- Jones, D. A., Kamarudin, M.S., Le Vay, L. 1991. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *J. World Aquacult. Soc.* 24 (2), 199-210.

- Kim, B. G., Divakaran, S., Brown, C. L., Ostrowski, A. C. 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiol. Biochem.* 24, 225-241.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.
- Kubitza, F., Lovshin L. L. 1999. Formulated diets, feeding strategies, and cannibalism control during intensive culture of juvenile carnivorous fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7(1), 1-22.
- Lazo, J. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A., Civera-Cerecedo, R., (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, México.* 300-312.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-272.
- Lovell, R. T. 1998. *Nutrition and feeding of fish. II Edição.* Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 71-76.
- Luz, R. K., Ferreira, A. A., Reynalte-Tataje, D. A., Maffezzolli, G., Zaniboni Filho, E. 2000. Larvicultura de dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849), nos primeiros dias de vida. In: V Simpósio Brasileiro de Aqüicultura 2000, Florianópolis, Brasil. Não paginado. CD-ROM.
- Morais Filho, M.B. de e Schubart, O. 1955. Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). Ministério de Agricultura, São Paulo, Brasil, pp. 1-50.
- Moyano, F. J., Alarcón, F. J., Díaz, M., Muñoz-Cueto, J. A., Yúfera, M., Saraquete, M. C. 1991. Changes of digestive enzyme activities during larval development in seabream (*Sparus aurata*). In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (eds.), LARVI'91 – Fish & Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, 27-30 August 1991. Gent, Belgium. Special Publication 24, 297-300.
- Munilla-Moran, R., Stark, J. R. 1989. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture* 81, 315-327.



- Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialetzki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., Pavanelli, C. S. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação. Editora da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Brasil, pp. 115-119.
- Nelson, D. V., Cox, M. M. 2000. Lehninger - Princípios de Bioquímica. Savier. São Paulo, Brasil, pp. 377.
- Pinto, M. L. G., Guglielmoni, L. A. 1988. Observações sobre o desenvolvimento e comportamento alimentar de larvas de dourado. In: IV Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, 1988, Cuiabá, Brasil. 35-47.
- Ragyanszky, M. 1980. Preliminary investigations on the proteolytic digestive enzymes in carp fry. *Aquacult. Hung (Szarvas)* 2, 27-30.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465-473.
- Rotta, M. A. 2000. Influência de diferentes níveis de farinha de minhoca, como substituto da farinha de peixe, no crescimento de pós-larva de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado em Zoologia. Universidade Federal de Rio Grande do Sul- Brasil. 100 pp.
- Santos, J. E. Dos; Godinho, H. P. 2002. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. *Revta.bras.Zool.* 19(1), 163-162.
- Segner, H., Rösch, R., Verreth, J., Witt, U. 1993. Larval nutrition physiology: Studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.* 24 (2), 121-134.
- Sugai, J. K., Vega-Orellana, O. M., Fracalossi, D. M. 2002. Digestive enzymes in the larval and juvenile stage of "Dourado" *Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849. In: *Aquamar International*'2002. October/2002. México. Não-paginado. CD-ROM.
- Verreth, J., Torreale, E., Spazier, E., Sluiszen, A. V. D., Rombout, J., Booms, R., Segner, H. 1992. The development of a functional digestive system in the african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 23 (1), 286-298.
- Vinatea, L. 1997. Princípios químicos de qualidade de água em aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil. 300 pp.
- Walford, J., Lam, T. J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109, 187-205.

- Woynarovich, E., Sato, Y. Criação especial de larvas de pós-larvas de matrinhã (*Brycon lundii*) e de dourado (*Salminus brasiliensis*). In: Workshop on larval rearing on finfish. Encontro de larvicultura. 1989. Pirassununga, Brasil. 134-136.
- Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. L. 2001. Review. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 477-478.
- Zaniboni-Filho, E., Torquato, V. C., Barbosa, N. D. C., Meireles, A. D. 1988. Considerações sobre a reprodução induzida e larvicultura de dourado *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1849) In: VI Encontro Anual de Aqüicultura 1988. Belo Horizonte, Brasil. 23.
- Zaniboni-Filho, E. 1997. Piscicultura das espécies nativas de água doce. Apostila. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. 20.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Das técnicas usadas*

No presente trabalho foram utilizadas técnicas de determinação enzimática baseadas naquelas descritas em trabalhos de bioquímica e aplicadas em diversas espécies aquáticas. Porém, aplicar estas técnicas no estudo de espécies das quais não existem referências anteriores não é fácil. O problema reside, principalmente, no fato de que a maioria das técnicas foi desenvolvida usando espécies (crustáceos e peixes) que não necessariamente requerem as mesmas condições para os ensaios enzimáticos que o dourado.

A realização do presente estudo corresponde ao resultado de quase um ano de aprendizado das metodologias e a adaptação e padronização das técnicas já usadas, começando pelo preparo adequado do extrato bruto (escolha do método e tempos de maceração dos tecidos, determinação das partes do peixe a usar, etc.) até chegar a testar os tempos de incubação das reações, concentração e quantidade de reagentes e extrato bruto para a detecção e determinação da atividade das diferentes enzimas em estudo. Devido à pouca quantidade de material disponível (larvas de dourado), foi necessário testar as metodologias previamente. Para isto, foram usados exemplares de diferentes estágios juvenis de robalo (*Centropomus parallelus*), cedidos gentilmente pelo Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina; e de dourado, cedidos pelo LAPAD. Os resultados obtidos com esse material serviram para se ter uma visão aproximada de como trabalhar e supor o que poderia acontecer com as atividades enzimáticas nas larvas de dourado. Mesmo assim foi necessário ajustar cada técnica à medida que foram se utilizando as próprias larvas do experimento definitivo.

- *Do material biológico usado*

A dificuldade enfrentada foi a pouca quantidade de larvas de dourado disponíveis para os ensaios enzimáticos. Tal problema deveu-se, primeiro, à pouca quantidade de larvas coletadas devido à falta de conhecimento da quantidade necessária de indivíduos requerida para cada uma das técnicas usadas por não ter idéia da atividade das enzimas testadas em diferentes fases larvais e segundo, à pouca quantidade de larvas resultantes na desova na quais estas deveriam ser coletadas. No presente trabalho o número mínimo de larvas coletadas foi de 30 indivíduos por triplicata. Para futuros experimentos semelhantes com larvas de dourado recomenda-se coletar pelo menos 50 larvas por cada triplicata do experimento.

- *Dos resultados obtidos*

Os resultados obtidos no presente estudo são de extrema importância para o conhecimento biológico do dourado, sendo um dos passos iniciais e mais uma ferramenta no entendimento dos fatores a serem considerados no desenvolvimento de protocolos de cultivo para esta espécie.

A revisão bibliográfica feita para o presente estudo serviu para conhecer as diferentes técnicas aplicadas em algumas espécies de peixes no período de transição alimentar, as quais podem ser aplicadas na larvicultura do dourado, como por exemplo: a adição de microalgas na água de cultivo (cultivo com "água verde"), a adição de enzimas e hormônios, bem como o uso de ingredientes não tradicionais (farinhas de moluscos, crustáceos, de penas, etc.) nas rações de transição alimentar e o cultivo sob diferentes condições de luminosidade e fotoperíodos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- ALARCÓN, F. J.; DÍAZ, M.; MOYANO, F. J. Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications. In: TACON A. G. J.; BASURCO B. (Eds.). **Feeding tomorrow's fish: proceedings of the workshop of the CIHEAM Network on...** Zaragoza: Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes; FAO; Instituto Español de Oceanografía, p. 113-121. 1997.
- ALARCÓN LÓPEZ, F. J.; MARTINEZ DÍAZ, M. I. Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa, **Revista Aquatic**, Zaragoza, n. 5, não paginado, nov. 1998. Disponível em: < <http://www.revistaaquatic.com/>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2003.
- BORGHETTI, J. R.; CANZI, C.; FERNÁNDEZ, D. R. A influência de diferentes níveis de proteína no crescimento do dourado (*Salminus maxillosus*), **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 33, n. 3, p. 683-689. 1990.
- BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. **Broodstock management and egg and larval quality**. Chapter 15: Larval Foods. Institute de Aquaculture, Stirling: Blackwell Science. p. 373-391. 2001.
- CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources, **Fish Phys. Biochem.**, v.14, n. 6, p. 431-437. 1995.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae, **Aquaculture**, v. 200, p.161-180. 2001.
- CARA TORRES, J. B.; MOYANO, F. J.; FERNÁNDEZ DÍAS, C.; YÚFERA, M. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). In: CONGRESO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA (CIVA), 1., 2002. **Resumos...** Disponível em <<http://www.civa2002.org>>: p. 110-121. Acesso em: 22 de set. de 2002.
- CASTELL, J. D.; BLAIR, T. J. Progress toward development of a microdiet to replace live food organisms in mollusks and larval fish and crustacean culture. **Current Issues in Salmonid & Marine Fish Nutrition – Part2**. Disponível em <[http://www.aquacultureassociation.ca/ac2001/Salmonid2.htm#Progress Toward Development](http://www.aquacultureassociation.ca/ac2001/Salmonid2.htm#Progress%20Toward%20Development)>, 2001. Acesso em: 21 de maio de 2002.
- CLARK, E.; MURRAY, K. R.; STARK, J. R. Protease development in Dover sole [*Solea solea* (L)], **Aquaculture**, v. 53, p. 253-262. 1986.
- COHEN, A. **Handbook of cellular chemistry**. London: Mosby Co. p. 226. 1979.
- COUSIN, J. C. B.; BAUDIN-LAURENCIN, F.; GABAUDAN, J. Ontogeny of enzymatic activities in feed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L., **J. Fish Biol.**, v. 30, p. 15-33. 1987.

CUVIER-PÉRES, A.; JOURDAN, S.; FONTAINE, P.; KESTEMONT, P. Effects of light intensity on animal husbandry and digestive enzyme activities in sea bass *Dicentrarchus labrax* post-larvae, **Aquaculture**, v. 202, p. 317-328. 2001.

D'ABRAMO, L. R. Challenges in developing successful formulated feed for culture of larval fish and crustaceans. In: AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA VI. SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 6., 2002, Cancún. **Memorias...**: México, CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; GAXIOLA-CORTÉS, M. G.; SIMOES, N. (Eds.). p. 143-151.

DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present <<state of the art>> and perspectives, **Reprod. Nutr. Dévelop.**, v. 24, n. 6, p. 807-833. 1984.

DABROWSKI, K. Ontogenetic changes in the fish larval gut. In: ENCONTRO DE LARVICULTURA, 1989, Pirassununga, **Sumário, resumos e apresentações**: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Eds.). Canadian International Development Agency (ICSU), Brasil. p. 167.

DIMES, L. E.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; HAARD, N. F. Estimation of protein digestibilidade- III Studies on the digestive enzymes from the pyloric caeca of rainbow trout and salmon, **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 109, n. 2, p. 394-360. 1994.

FERNÁNDEZ, I.; MOYANO, F. J.; DÍAZ, M.; MARTÍNEZ, T. Characterization of  $\alpha$ -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei), **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 262, p. 1-12. 2000.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds.). **FishBase**. Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em: 10 de junho de 2003.

GALVÃO, M. S. N.; YAMANAKA, N.; FENERICH-VERANI, N.; PIMENTEL, C. M. M. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil, **Bol. Inst. Pesca**, v. 24, p. 101-110. 1997.

GARCÍA ORTEGA, A. Valor nutricional de los quistes de Artemia y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. In: AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA V. SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Memorias...**: México, CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Eds.). p. 287-293.

GARCÍA-CARREÑO, F.; NAVARRETE, M. Classification of proteases without tears, **Biochemical Education**, v. 25, n. 3, p. 161-167. 1997.

GAWLICKA, A.; PARENT, B.; HORN, M.; ROSS, N.; OPSTAD, I.; TORRISSEN, O. J. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding, **Aquaculture**, v. 184, p. 303-314. 2000.

GÉRY, J.; LAUZANNE, L. Les types des espèces du genre Salminus Agassiz, 1829 (Ostariophysi, Characidae) du Musée National d'Histoire Naturelle de Paris, **Cybium**, v. 14, n. 2, p. 113-124. 1990.

- GONÇALVES, J. M.; DINIS, M. T.; POSÃO-FERREIRA, P. Ensaio de adaptações a alimento inerte de larvas de dourada *Sparus aurata* L. In: SEMINÁRIO DE AQUICULTURA MEDITERRÂNEA. 1991. Lisboa. **Resumos...**: Portugal. p. 215-223.
- HARDY, R. New development in aquatic feed ingredients and potential of enzyme supplements. In: AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA V. SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Memorias...**: México, CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Eds.). p. 216-226.
- HEMING, T.; BUDDINGTON, R. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL D. J. (Eds). **Fish Physiol.**, Vol. XIA, New York: Kluwer Academic Publishers. p. 110-115. 1988.
- HIDALGO, M. C. La fábrica de peces, **Boletín de la Agencia de Transferencia de Investigación**, Granada: Universidad de Granada. v. 3, p. 5, Out. 1995.
- HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities, **Aquaculture**, v. 170, p. 267-283. 1999.
- HOFER, R. Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid, **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 72, n. 1, p. 55-63. 1981.
- HORN, M.H. Feeding and digestion. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press. p. 52-55. 1997.
- HUNG, L. T.; TUAN, N. A.; CACOT, P.; LAZARD, J. Larval rearing of the Asian Catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time, **Aquaculture**, v. 212, p. 115-127. 2002.
- JONES, D. A.; KAMARUDIN, M. S.; LE VAY, L. The potential for replacement of live feeds in larval culture, **J. World Aquacult. Soc.**, v. 24, n. 2, p. 199-210. 1993.
- KIM, B. G.; DIVAKARAN, S.; BROWN, C. L.; OSTROWSKI, A. C. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*), **Fish Physiol. Biochem.**, v. 24, p. 225-241. 2001.
- KOCH, W. R.; MILANI, P. C.; GROSSER, K. M. **Guia ilustrado de Peixes, Parque Delta do Jacuí**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. p. 28. 2000.
- KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, G. W. The effect of dietary enzymes with age on protein and lipid assimilation and deposition in *Sparus aurata* larvae, **Fish Nutrition in Practice**, Les Colloques, v. 61, p. 569-578, Jun. 1991.
- KOLKOVSKI, S.; ARIELI, A.; TANDLER, A. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae, **Aquacult. Int.**, v. 5, p. 527-536. 1997.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets, **Aquaculture**, v. 200, p. 181-201. 2001.

KOVEN, W.; KOLKOVSKI, S.; HADAS, E.; GAMSIZ, K.; TANDLER, A. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review, **Aquaculture**, v. 194, p. 107-121. 2001.

KUBITZA, F. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Campos do Jordão. **Resumos...**: CYRINO, J. E. P. (Ed.). Colégio Brasileiro de Nutrição Animal (CBNA), SP, Brasil. p. 53-68.

KUBITZA, F.; LOVSHIN L. L. Formulated diets, feeding strategies, and cannibalism control during intensive culture of juvenile carnivorous fishes, **Rev. Fish. Sci.**, v. 7, n.1, p. 1-22. 1999.

KUROKAWA, T.; SHIRAISHI M.; SUZUKI, T. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanoticus*) larvae, **Aquaculture**, v. 161, p. 491-499. 1998.

KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts, **Aquaculture**, v. 148, p. 25-37. 1996.

LAUFF, M.; HOFER, R. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes, **Aquaculture**, v. 37, p. 335-346. 1984.

LAZO, J. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA V. SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Memorias...**: México, CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Eds.). p. 314-320.

LEE, P. G.; SMITH, L. L.; LAURENCE, A. L. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* boone: relationship between enzyme activity, size and diet, **Aquaculture**, v. 12, p. 225-239. 1984.

LOVELL, R. T. **Nutrition and feeding of fish**. II Edição. New York: Kluwer Academic Publishers. p. 71-76. 1998.

LUZ, R. K.; FERREIRA, A. A.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; MAFFEZZOLLI, G.; ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura de dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849), nos primeiros dias de vida. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA (SIMBRAq), 10., 2000, Florianópolis. **Anais...**: Sonopress, Brasil, Simbraq, 2000. Não paginado, CD-ROM.

MORAIS FILHO, M. B. DE; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)**. São Paulo: Ministério de Agricultura do Brasil. p. 21-50. 1955.

MUNILLA-MORAN, R.; STARK, J. R. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.), **Aquaculture**, v. 81, p. 315-327. 1989.

MUNILLA-MORAN, R.; SABORIDO-REY, F. Digestive enzymes in Marine Species. I. Proteinase Activities in Gut from Redfish (*Sebastes mentella*), Seabream (*Sparus aurata*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*), **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 113, n. 2, p. 395-402. 1996.



NAKATANI, K., AGOSTINHO, A. A., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P. V., MAKRAKIS, M. C., PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce**. Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: Universidade Estadual de Maringá (EDUAM). p. 115-119. 2001.

NELSON, D. V.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier. p. 377. 2000.

PERSON LE RUYET, J.; ALEXANDRE, J. C.; THÉBAUD, L.; MUGNIER, C. 1993. Marine fish larvae feeding: Formulated diets or live prey?, **J. World Aquacult. Soc.**, v. 24, n. 2, p. 211-223. 1993.

PEZZATO, L. E. O estabelecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes cultivadas. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba. **Resumos...**: CYRINO, J.E.P.; KUBITZA, F. (Eds.). Colégio Brasileiro de Nutrição Animal (CBNA) e Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo (LZT-ESALQ-USP), SP, Brasil. p. 45-62.

PIAIA, R.; ULIANA, O.; FILIPETTO, J.; RADÜNZ NETO, J. Alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), com dietas artificiais, **Rev. Ciência e Natura**, v. 19, p. 119-131. 1997.

PINTO, M. L. G., GUGLIELMONI, L. A. Observações sobre o desenvolvimento e comportamento alimentar de larvas de dourado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 4., 1988, Cuiabá. **Resumos...**: Brasil. p. 35-47.

PIPER, R. G.; McELWAIN, I. B.; ORME, L. E.; McCRAREN, J. P.; FAWLER, L.; LEONARD, J. R. **Fish Hatchery Management**. Fish and Wildlife Service, Washington: American Fisheries Society, U.S.A. p. 254-257. 1982.

POLAK, A.; BEKLEVIK, G. The importance of betaine and some attractive substances as fish feed additives. In: TACON, A. G. J.; BASURCO, B. (Eds.). **Feeding tomorrow's fish: proceedings of the workshop of the CIHEAM Network on...** Zaragoza: Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes; FAO; Instituto Español de Oceanografía p. 99-112. 1997.

RADÜNZ NETO, J. **Alimento natural versus ração balanceada na larvicultura de peixes**. 2000. Disponível em <<http://www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz/Radunz.htm>>. Acesso em: 15 de maio de 2002.

RØNNESTAD, I. Control and efficiency of digestive function of marine fish larvae. In: AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA VI. SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 6., 2002, Cancún. **Memorias...**: México, CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; GAXIOLA-CORTÉS, M. G.; SIMOES, N. (Eds.). p. 152-164.

ROSELUND, G.; STOSS, J.; TALBOT, C. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets, **Aquaculture**, v. 155, p. 183-191. 1997.

SANTOS, J. E. DOS; GODINHO, H. P. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions, **Revta.bras.Zool.**, v. 19, n. 1, p.163-162. 2002.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal. Adaptação e Meio Ambiente.** São Paulo: Santos. p. 488-498. 1999.

SEGNER, H.; RÖSCH, R.; VERRETH, J.; WITT, U. Larval nutrition physiology: Studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*, **J. World Aquacult. Soc.**, v. 24, n. 2, p. 121-134. 1993.

SHEIKH-ELDIN, M.; SILVA, S. S. DE; INGRAM, B. A. Effects of diets and feeding rate on the survival and growth of Macquarie perch (*Macquaria australasica*) larvae, a threatened Australian native fish, **Aquaculture**, v. 157, p. 35-50. 1997.

SILVA, S. DE; ANDERSON, T. **Fish Nutrition in Aquaculture.** London: Chapman & Hall. p. 100-123. 1995.

SOLER, M. **Fundamentos de nutrición y alimentación en Acuicultura.** Santa Fe de Bogotá: INPA - Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura de la República de Colombia. Serie Fundamentos v. 3. p. 342. 1995.

SOUTHGATE, P.; KOLKOVSKI, S. **STATUS REVIEW 5: Formulated diets.** In: LITTMANN, M. (Ed.). HATCHERY FEEDS: Research and Development Plan 2000-2005. The Fisheries Research Development Corporation. Australia. Disponível em <<http://www.aims.gov.au/pages/research/hatchery-feeds/r&d-plan.rtf>>. Acesso em: 15 de maio de 2002.

TOVAR-RAMIREZ, D.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; CAHU, C.; GATESOUBE, F. J.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. In: AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA V. SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Memorias...**: México, CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; CIVERA-CERECEDO, R. (Eds.). p. 33-46.

VEGA-VILLASANTE, F.; NOLASCO, H; CIVERA, R. The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* - II. Properties of protease activity in the whole digestive tract, **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 1, p. 123-129. 1995.

WOYNAROVICH, E.; SATO, Y. Criação especial de larvas e pós-larvas de matrinhã (*Brycon lundii*) e de dourado (*Salminus brasiliensis*). In: WORKSHOP ON LARVAL REARING ON FINFISH. ENCONTRO DE LARVICULTURA, 1989, Pirassununga. **Sumário, resumos e apresentações**: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Eds.). Canadian International Development Agency (ICSU), Brasil. p. 134-136.

ZANIBONI FILHO, E. **Piscicultura das espécies nativas de água doce.** Apostila. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. p. 20. 1997

ZAVALA-CAMIN, L. A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá (EDUAM). p. 3-13. 1996.

ZIMMERMANN, S.; JOST, H. C. Recentes avanços na nutrição de peixes: a nutrição por fases em piscicultura intensiva. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Resumos...**: CYRINO, J. E. P.; MACHADO, J. F. M.; MIYADA, V. S. (Eds.). Colégio Brasileiro De Nutrição Animal (CBNA), SP, Brasil p. 123-162.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

Nome científico e comum, hábito alimentar e hábitat das espécies de peixes citadas no trabalho<sup>1</sup>

Nome científico	Nome comum		Hábito alimentar	Hábitat
	Inglês	Português		
<i>Caranx melanpygus</i>	Bluefin trevally	Xaréu-barbatana-azul	Carnívoro	Marinho
<i>Clarias gariepinus</i>	North African catfish, African catfish	Bagre-africano	Onívoro	Água doce
<i>Coregonus</i> sp.	De acordo à espécie	-		Água doce
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Grass carp	Carpa capim	Onívoro	Água doce
<i>Cyprinus carpio carpio</i>	Common carp	Carpa comum	Onívoro	Água doce
<i>Dicentrarchus labrax</i>	European seabass	Robalo europeu	Carnívoro	Marinho e Água doce
<i>Diplodus sargus</i>	White seabream	Sargo	Carnívoro	Marinho
<i>Lates calcarifer</i>	Barramundi, seabass	Barramundi	Carnívoro	Marinho e Água doce
<i>Leporinus</i> sp	-	Piapara	Herbívoro	Água doce
<i>Mugil platanus</i>	-	Tainha	Carnívoro	Marinho
<i>Oreochromis niloticus</i>	Nile tilapia	Tilápia	Herbívoro	Água doce
<i>Perca fluviatilis</i>	European perch	Perca-européia	Carnívoro	Água doce
<i>Polydactylus sextifilis</i>	Sixfinger threadfin, Pacific threadfin.	-	Carnívoro	Marinho e Água doce
<i>Salmo gairdneri</i> = <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	Truta Arco-íris	Carnívoro	Água doce
<i>Scophthalmus maximus</i>	Turbot	Turbot	Carnívoro	Marinho
<i>Solea senegalensis</i>	Senegalese sole	Linguado-do-Senegal	Carnívoro	Marinho
<i>Solea solea</i>	Common sole, Dover sole	Linguado-legítimo	Carnívoro	Marinho
<i>Sparus aurata</i>	Gilthead seabream	Dourada, Pargo	Carnívoro	Marinho e Água doce
<i>Symphysodon aequifasciata</i>	Blue discus	Acará-disco	Carnívoro	Água doce

<sup>1</sup> Baseado em Froese e Pauly (2003)

## ANEXO 2

### NOMENCLATURA ANATÔMICA

Em agosto de 1997, a Federação Internacional das Associações de Anatomistas reuniu-se em São Paulo para apresentar a nova *Nomina Anatomica*, documento que define a nomenclatura das estruturas do corpo. O Ministério da Educação tem recomendado o uso desta terminologia científica atualizada.

O SISTEMA DIGESTIVO muda seu nome para SISTEMA DIGESTÓRIO (*systema digestorium*).

#### *Fontes:*

Editora Moderna. **Anatomia Globalizada: a *Nomina Anatomica* de São Paulo**. Disponível em: < <http://www.moderna.com.br/artigos/biologia/0003> >. Acesso em: 14 de novembro de 2003.

Editora Saraiva. **TABELA DE ATUALIZAÇÃO DA NOMENCLATURA**. Disponível em: < <http://www.editorasaraiva.com.br/biosonialopes/> >. Acesso em: 14 de novembro de 2003.

## APÊNDICES

## APÊNDICE 1

### A. Atividade específica de tripsina em larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão

Amostra	Repetições			U • mg <sup>-1</sup> de proteína * (média ± desvio padrão)
	1	2	3	
12H	0,088	0,088		0,088 ± 0,000**
1M	0,051	0,053		0,052 ± 0,001**
1T	0,051	0,049		0,050 ± 0,001**
2M	0,047	0,048		0,048 ± 0,001**
2T	0,044	0,057		0,050 ± 0,010**
3M	0,101	0,111		0,106 ± 0,008**
3T	0,165	0,181		0,173 ± 0,011**
4M	0,112	0,084		0,098 ± 0,020**
4T	0,043	0,066		0,054 ± 0,016**
5M	0,060	0,051		0,056 ± 0,006**
5T	0,111	0,122		0,117 ± 0,008**
6M	0,077	0,088	0,081	0,082 ± 0,006***a
6T	0,067	0,070	0,070	0,069 ± 0,002***a
7M	0,127	0,121	0,119	0,122 ± 0,004***b
7T	0,066	0,091	0,084	0,081 ± 0,013***a

\*  $\Delta A_{410 \text{ nm}} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína

\*\* valores resultantes de determinações feitas de uma amostra única

\*\*\* valores resultantes de determinações feitas das triplicatas por separado

*Letras diferentes representam diferença significativa ( $P < 0,05$ )*

**B. Atividade específica de quimotripsina em larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão**

Amostra	Repetições			U • mg <sup>-1</sup> de proteína * (média ± desvio padrão)
	1	2	3	
12H	0,0183	0,0183		0,0183 ± 0,0000**
1M	0,0386	0,0463		0,0425 ± 0,0055**
1T	0,1196	0,1196		0,1196 ± 0,0000**
2M	0,1168	0,1168		0,1168 ± 0,0000**
2T	0,1330	0,1378		0,1354 ± 0,0034**
3M	0,2991	0,2885		0,2938 ± 0,0075**
3T	0,2690	0,2518		0,2604 ± 0,0121**
4M	0,3456	0,3780		0,3618 ± 0,0229**
4T	0,3552	0,3908		0,3730 ± 0,0251**
5M	0,2457	0,2858	0,2858	0,2724 ± 0,0231**
5T	0,2967	0,2704	0,2858	0,2843 ± 0,0132**
6M	0,1267	0,2056	0,1471	0,1598 ± 0,0410***a
6T	0,0245	0,0155	0,0176	0,0192 ± 0,0047***b
7M	0,0287	0,0308	0,0175	0,0257 ± 0,0072***b
7T	0,0147	0,0302	0,0209	0,0219 ± 0,0078***b

\*  $\Delta A_{410 \text{ nm}} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína

\*\* valores resultantes de determinações feitas de uma amostra única

\*\*\* valores resultantes de determinações feitas das triplicatas por separado

*Letras diferentes representam diferença significativa (P < 0,05)*



C. Atividade específica de pepsina de larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão

Amostra	Repetições			U • mg <sup>-1</sup> de proteína * (média ± desvio padrão)
	1	2	3	
12H	0			0**
1M	0			0**
1T	0			0**
2M	0			0**
2T	0			0**
3M	0,0007	0,0001		0,0004 ± 0,0004**
3T	0,0020	0,0014		0,0017 ± 0,0004**
4M	0,0011	0,0019		0,0015 ± 0,0005**
4T	0,0086	0,0095		0,0091 ± 0,0007**
5M	0,0072	0,0068		0,0070 ± 0,0003**
5T	0,0058	0,0054		0,0056 ± 0,0003**
6M	0,0220	0,0200	0,0180	0,0200 ± 0,0019***a
6T	0,0210	0,0260	0,0210	0,0225 ± 0,0031***a
7M	0,0400	0,0500	0,0470	0,0457 ± 0,0053***b
7T	0,0740	0,0742	0,0750	0,0742 ± 0,0008***c

\* μmol de tirosina • mL<sup>-1</sup> • min<sup>-1</sup> • mg<sup>-1</sup> de proteína

\*\* valores resultantes de determinações feitas de uma amostra única

\*\*\* valores resultantes de determinações feitas das triplicatas por separado

*Letras diferentes representam diferença significativa (P < 0,05)*

## APÊNDICE 2

Proteína solúvel presente nos extratos enzimáticos de larvas de dourado durante a primeira semana após a eclosão

Amostra	Proteína (mg • mL <sup>-1</sup> ) (média±desvio padrão)*		
	1	2	3
12H	2,26		
1M	6,47		
1T	6,48		
2M	6,42		
2T	5,26		
3M	7,11 ±0,05		
3T	4,37 ±0,16		
4M	4,63 ±0,11		
4T	5,63 ±0,26		
5M	7,00 ±0,05		
5T	6,47 ±0,05		
6M	8,56 ±0,13	10,56 ±0,33	9,44 ±0,22
6T	5,75 ±0,10	10,03 ±0,20	8,84 ±0,00
7M	7,90 ±0,26	8,28 ±0,18	6,95 ±0,23
7T	7,16 ±0,23	7,61 ±0,26	6,60 ±0,13

\* valores resultantes de determinações feitas em triplicata.

## APÊNDICE 3

Teste de inibição enzimática usando o inibidor específico de quimotripsina TPCK e metanol. O número entre parênteses corresponde à percentagem de inibição em relação à atividade total

Amostras	Atividade de quimotripsina ( U • mg <sup>-1</sup> de proteína)*	Atividade ( U • mg <sup>-1</sup> de proteína)* em presença de:	
		metanol	TPCK
12H	0,0183		
1M	0,0425		
1T	0,1196		
2M	0,1168		
2T	0,1354		
3M**	0,2938	0,2885 (1,8)	0,0618 (79,0)
3T**	0,2604	0,2576 (1,1)	0,1429 (45,1)
4M**	0,3618	0,3618 (0)	0,1776 (50,9)
4T**	0,3730	0,3730 (0)	0,2160 (42,1)
5M**	0,2724	0,2786 (0)	0,1316 (51,7)
5T**	0,2843	0,2858 (0)	0,1759 (38,1)
6M**	0,1598	0,1013 (36,6)	0,0437 (72,6)
6T***	0,0192	0,0167 (13,0)	0,0005 (97,3)
7M***	0,0257	0,0256 (0,5)	0,0001 (99,5)
7T***	0,0219	0,0211 (3,9)	0,0003 (98,7)

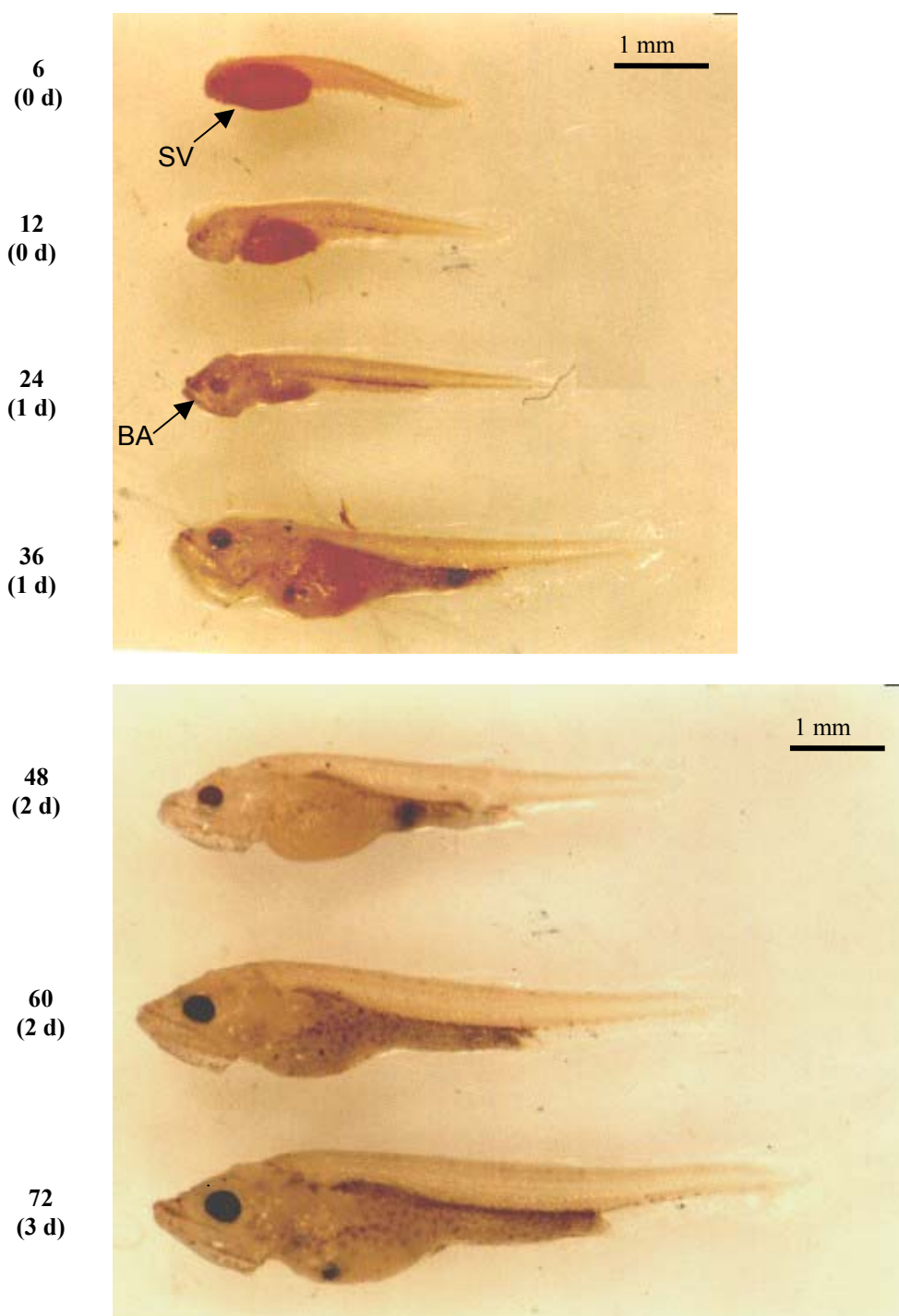
\*  $\Delta A_{410 \text{ nm}} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína

\*\* extrato enzimático: inibidor; 1:10 (v/v)

\*\*\* extrato enzimático: inibidor; 1:1 (v/v)

**APÊNDICE 4**

Larvas de dourado durante a primeira semana de vida, cultivadas com uma temperatura d'água de  $24,1 \pm 2,0$  °C. Os números indicam o número de horas após a eclosão. Entre parênteses é indicado o número de dias após a eclosão. SV: Saco vitelínico. BA: boca aberta.



84  
(3 d)



96  
(4 d)



108  
(4 d)



120  
(5 d)

