

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LÍPÍDEOS NA DIETA DE REPRODUTORES DE LINGUADO, *Solea senegalensis*, NA QUANTIDADE E QUALIDADE DAS POSTURAS

Nédia MATUSSE^{1,2}; Ana GAMBOA¹; Laura RIBEIRO¹; Ana CANDEIAS MENDES¹;
Fernando Moreira da SILVA²; Florbela SOARES¹

RESUMO

A qualidade dos ovos de linguado (*Solea senegalensis*) alimentados com dietas com diferentes níveis de lipídeos foi avaliada (dieta controle (DC) e outra contendo 6,7% mais lipídeos (grupo DE)). Foi avaliada a quantidade e periodicidade de posturas e os níveis de atividade de catepsinas do tipo B e D na fração viável e inviável dos ovos de ambos os grupos. O número de posturas e a taxa de eclosão foram significativamente maiores ($p<0,05$) no grupo alimentado com a dieta DE. A catepsina D apresentou valores significativamente mais elevados de actividade nos ovos inviáveis do tratamento DE. O uso da dieta DE resultou num maior número de posturas, o que indica que esta dieta aumenta a fecundidade e a taxa de eclosão.

Palavras chave: Pleuronectiformes; alimentação; reprodução; ovos

THE EFFECT OF DIETARY LIPID SUPPLEMENTATION TO *Solea senegalensis* BROODSTOCK, ON THE QUANTITY AND QUALITY OF SPAWNS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of dietary supplementation with lipids of sole (*Solea senegalensis*) broodstock diets on the quantity and quality of spawns. One group (DE group) was fed daily with a diet supplemented with lipids (6.7% more than control diet (DC group)). The activities of cathepsins B and D were determined on the viable and nonviable fraction of the spawns from both of groups. The number of spawns and the quantity of eggs was higher for the breeders fed diet DE. The hatching rate was significantly higher ($p<0.05$) in the group fed with DE diet. Some differences were observed when comparing viable and nonviable eggs. Cathepsin D activities were significantly higher for nonviable fraction when compared with viable eggs. The use of DE diet resulted in a larger number of spawns, suggesting that this diet seems to increase fertility and the hatching rate.

Keywords: flounder; feeding; reproduction; eggs

Nota Científica: Recebida em 24/05/2014 – Aprovada em 30/05/2015

¹ Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). Av. 5 de Outubro, s/nº - CEP: 8700-305 – Olhão – Portugal. e-mail: nemalia2000@uvigo.es; agamboa@ipma.pt; lribeiro@ipma.pt; ana.mendes@ipma.pt; fsoares@ipma.pt (autora correspondente)

² Universidade dos Açores. Rua Capitão João d'Ávila – Pico da Urze – 9700-042 – Angra do Heroísmo – Açores – Portugal

INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, a aquacultura do sul da Europa assentou maioritariamente na produção de dourada *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) e de robalo *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), embora, na perspectiva econômica, seja importante desenvolver cultivos de novas espécies com potencial para a aquacultura (DINIS *et al.*, 1999). Um dos candidatos promissores à diversificação da produção é o linguado do Senegal (*Solea senegalensis* Kaup, 1858), da família *Soleidae*, que é uma espécie bem adaptada a climas temperados e produzida em pisciculturas ao longo da costa sul de Portugal, Espanha, França e Itália (DINIS *et al.*, 1999; MORAIS *et al.*, 2014). Nos últimos 30 anos, vem sendo desenvolvida muita investigação dedicada a esta espécie. Não obstante, o esforço na produção do linguado no sul da Europa tem sido muito baixo, representando, em 2012, cerca de 0,04% (514 t) do total da produção europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

Como estrangimentos à produção desta espécie têm sido destacados a elevada incidência de patologias, problemas na adaptação ao alimento inerte durante o desmame dos juvenis e problemas relacionados com a reprodução (CABRITA *et al.*, 2006; BEIRÃO *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2014), levando à produção de juvenis de baixa qualidade e, consequentemente, elevadas mortalidades. No entanto, por se tratar de uma espécie com grande procura e, por isso, valorizada economicamente, nos últimos cinco anos a sua criação tem atraído elevados investimentos no sul da Europa com o objetivo de intensificar a sua produção (HOWELL *et al.*, 2011).

Os linguados são peixes gonocóricos que tem, normalmente, duas épocas de postura; uma na primavera (março a julho) e outra no outono (setembro a dezembro), nas condições ambientais da costa Portuguesa. A maturação sexual ocorre naturalmente quando atingem três a quatro anos de vida. Nessa fase, geralmente apresentam tamanhos entre 25-32 cm de comprimento (SARASQUETE, 2005). Em *S. senegalensis* a fecundação é externa, ocorrendo na água.

A alimentação dos reprodutores pode afetar significativamente a sua maturação, a quantidade e qualidade das posturas, o tamanho dos ovos produzidos (BROMAGE, 1995), o tamanho das

larvas e o bom desenvolvimento das mesmas até à abertura da boca.

Sabe-se que uma dieta contendo lipídeos, principalmente ácidos graxos essenciais, influencia positivamente a qualidade das posturas, pois estes favorecem o crescimento e desenvolvimento normal em espécies marinhas (IZQUIERDO *et al.*, 2001), melhoram a mobilidade e a resistência aos efeitos osmóticos do sêmen, que são os principais fatores de sucesso na reprodução e sobrevivência da prole. A redução da taxa de alimentação e consequente diminuição na ingestão de lipídeos em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) e bacalhau *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758) na fase reprodutiva reduz o número de posturas e afeta a quantidade de fêmeas a desovar (KUBTIZA, 1999; SALZE *et al.*, 2005). É de conhecimento geral que a composição das reservas vitelínicas reflete nas reservas de nutrientes maternos, as quais dependem da dieta dos reprodutores (ULIANA *et al.*, 2001). Desta forma, alimentando os reprodutores de linguado com uma dieta suplementada em ácidos graxos, devem ser observados efeitos positivos na qualidade e quantidade das posturas obtidas.

A avaliação da qualidade dos ovos em peixes é um tema que tem sido amplamente estudado, e tem a ver como as características que determinam a sua capacidade de sobrevivência. As variáveis mais usadas para avaliação da qualidade dos ovos são a taxa de eclosão e viabilidade dos ovos, o diâmetro e peso dos ovos, composição química e colonização microbiológica. Ovos de maior diâmetro e/ou peso têm normalmente maior conteúdo em vitelo, o que permite às larvas recém-eclodidas uma maior sobrevivência, quando comparadas com as larvas oriundas de ovos de menor diâmetro (LAHNSTEINER *et al.*, 2008). O uso de novas ferramentas para caracterização da qualidade dos ovos permitirá centrar a produção em posturas de elevada qualidade, minimizando perdas econômicas que possam advir do uso de ovos de qualidade inferior. Os produtos sintetizados no ovo, incluindo enzimas como as catepsinas, e os mecanismos que controlam as suas expressões, desempenham um papel crucial na determinação da qualidade dos ovos (BROOKS *et al.*, 1997).

As catepsinas, durante o desenvolvimento embrionário, são as enzimas responsáveis pela

degradação das proteínas do vitelo. A sua atividade consiste na degradação de substratos, formando proteínas específicas, as quais são responsáveis pelo crescimento dos oócitos até o final da maturação. Segundo CARNEVALI *et al.* (2006), no final da fase de reprodução, as enzimas lisossomais encontram-se também envolvidas com a reabsorção dos ovócitos e são reguladas por diversos fatores, incluindo hormônios sexuais, tal como o estradiol. A degeneração dos folículos que não atingiram a maturação (atrésia folicular) ocorre sob controle das catepsinas e afetam o potencial da fecundidade. As catepsinas B e D atuam de forma diferente nos ovos viáveis e inviáveis, entre espécies distintas ou até na mesma espécie de peixe (CARNEVALI *et al.*, 2008). A atividade da catepsina B é normalmente maior no início da vitelogenese e decresce progressivamente até ao final da vitelogenese. A atividade enzimática da catepsina D é mais elevada em ovos inviáveis, indicando que pode ser considerada como possível indicador de ovos de má qualidade em dourada e robalo (CARNEVALI *et al.*, 1999; CARNEVALI *et al.*, 2001).

Segundo FU *et al.* (1998), as funções normais da catepsina B estão relacionadas com processos celulares envolvidos na degradação de proteínas da matriz extra-celular, no processo de reciclagem de proteínas e durante o metabolismo do vitelo em oócitos de peixes (TINGAUD-SIQUEIRA *et al.*, 2010). Além disso, especula-se que esta pode estar envolvida na ativação inicial das catepsinas D e L, e no controle da morte celular programada, a apoptose. Desta forma, a identificação de diferenças entre a presença de catepsinas em ovos viáveis e inviáveis também pode contribuir como indicador-da qualidade dos ovos (CARNEVALI *et al.*, 2001).

Este trabalho teve como objetivo comparar a qualidade e quantidade de posturas provenientes

de reprodutores alimentados por uma ração enriquecida em lipídeos e uma dieta controle, bem como a sua influência no desenvolvimento larval até a abertura da boca. Como objetivo secundário, verificou-se se a atividade das catepsinas B e D podem ser consideradas bioindicadores da qualidade de ovos em *S. senegalensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este ensaio foi realizado na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) – IPMA, no Algarve (36°59'0"N; 7°55'0"W), Portugal, no período de setembro de 2011 a janeiro de 2012.

Reprodutores

Para o ensaio, foram utilizados 44 reprodutores de linguado provenientes do meio selvagem e mantidos em cativeiro há cinco anos. Os peixes foram divididos de acordo com o seu tamanho e peso e na relação 1 macho:1 fêmea, de forma a obter dois grupos homogêneos (Tabela 1). Os grupos de reprodutores foram mantidos em tanques retangulares de alvenaria, com 18 m³, com entrada e saída de água constante (circuito aberto) e com taxa de renovação de 20 L min⁻¹. A salinidade variou, ao longo do ensaio, de acordo com as condições ambientais da área, sendo a média 36,6 ± 0,8. Os tanques dos reprodutores, localizados em área externa (fotoperíodo natural), foram parcialmente cobertos por redes sombreadoras, variando a intensidade luminosa ao longo do dia entre 330 e 800 lux (TES 1335 Light meter, TES Electrical Electronic Corp., Taiwan).

Os parâmetros físico-químicos da água, temperatura, nível de oxigênio dissolvido (OD; mg L⁻¹) e porcentagem de saturação de OD (%) foram verificados diariamente por meio de oxímetro "Oxy Guard"; a salinidade foi verificada com refratômetro.

Tabela 1. Características dos reprodutores de *Solea senegalensis* submetidos aos tratamentos: DC = Dieta controle e DE = Dieta enriquecida.

	Tratamento DC	Tratamento DE
Número de reprodutores	22	22
Comprimento total médio (cm)	51,9 ± 4,6	53,0 ± 2,4
Peso total médio (g)	1.721,3 ± 470,4	1.669,5 ± 319,2
Densidade (kg m ⁻²)	2,1	2,0
Biomassa (kg)	37,87	36,73
Relação (macho:fêmea)	1:1	1:1

Os reprodutores foram alimentados diariamente com cerca de 3% da biomassa presente no tanque. Os alimentos avaliados consistiram em duas rações semi-húmidas, formuladas e fabricadas pela Sparos® (Portugal) (MORAIS *et al.*, 2014): a dieta Controle (DC), com

16,8% de lipídeos, nível normalmente usado em dietas para reprodutores de linguado (MORAIS *et al.*, 2014); e a dieta Enriquecida (DE), com 23,5% de lipídeos (Tabela 2). Estas dietas começaram a ser fornecidas aos reprodutores em setembro de 2010 (um mês antes da época de posturas).

Tabela 2. Composição química das dietas fornecidas aos reprodutores de *Solea senegalensis*, de acordo com o fabricante (Sparos®) (% por kg de ração). DC = Dieta controle e DE = Dieta enriquecida.

Composição	Tratamento DC (%)	Tratamento DE (%)
Farinha de peixe e hidrolizado de peixe ^a	61,0	63,0
Outros ingredientes marinhos ^b	5,0	7,5
Farinha de soja 48 ^c	6,0	5,0
Farelo de trigo e amidos	18,5	7,0
Óleo de peixe ^d	7,5	11,5
Óleo de Krill ^e	0,0	1,0
Premix de vitaminas e minerais ^f	2,0	4,0
Óleo concentrado de DHA ^g	0,0	1,0
Arginina	3,20	3,25
Histamina	1,99	1,65
Isoleucina	1,86	1,88
Leucina	4,55	4,08
Lisina	4,24	3,83
Treonina	2,32	2,22
Triptofano	0,58	0,54
Valina	3,45	3,04
Metionina + Cisteína	1,92	1,97
Fenilalanina + Tirosina	4,39	4,14
Fosforo disponível	1,03	1,13
<i>Composição proximal</i>		
Umidade (%)	16,8	17,3
Proteína bruta (% de matéria seca)	58,6	58,2
Gordura bruta (% de matéria seca)	16,8	23,5
Cinzas (% de matéria seca)	9,3	10,8
Energia bruta (Kj g ⁻¹ matéria seca)	21,4	24,0

^a Farinha de peixe Peruana LT: 67% proteína bruta (PB), 9% gordura bruta (GB), EXALMAR, Peru; CPSP 90: 84% PB, 12% GB, Sopropêche, França; CPSP G: 74% PB, 22% GB, Sopropêche, França.

^b Farinha de lula: 80% PB, 3,2% GB, Sopropêche, França; KRILL Aqua Meal: 56% PB, 8% GB, Aker Biomarine, Noruega.

^c Solvente extraído de farelo de soja: 47% PB, 2,6% GB, SORGAL SA, Portugal.

^d Óleo marinho ômega 3: Henry Lamotte Oils GmbH, Alemanha.

^e KRILL oil, Aker Biomarine, Noruega.

^f Premix para peixes marinhos, PREMIX Lda, Portugal. Vitaminas (IU ou g kg⁻¹ premix): DL-alpha tocopherol acetate, 10 g; sodium menadione bisulphate, 2,5 g; acetato de retinol, 2000 IU; DL-colecalciferol, 200 IU; tiamina, 3 g; riboflavina, 3 g; piridoxina, 2 g; cyanocobalamin, 0,01 g; ácido nicotínico, 20 g; ácido fólico, 1,5 g; ácido ascórbico, 100 g; inositol, 50 g; biotina, 0,3 g; panthotenato de cálcio, 10 g; cloreto de colina, 100 g; betaína, 50 g. Minerais (g ou g kg⁻¹ premix): carbonato de cobalto, 0,065 g; sulfato de cobre, 0,9 g; sulfato férrico, 0,6 mg; iodeto de potássio, 0,05 g; óxido de manganês, 0,96 g; selenito de sódio, 0,001 g; sulfato de zinco, 0,75 g; cloreto de sódio, 40 g; carbonato de cálcio, 186 g; excipiente de farelo de trigo.

^g Algatrium DHA70, Brudy Technology, Espanha.

A fecundação nesta espécie é externa, sendo as posturas obtidas de forma natural. Dessa forma, desde o início do ensaio (setembro) até o final da época reprodutiva, foram colocados externamente, na saída de água de cada tanque, coletores de ovos, de forma a recolher a totalidade dos ovos e permitir caracterizar o padrão de posturas. Os coletores foram examinados diariamente, pela manhã (entre as 09:30 h e as 11:00 h).

Ovos

Sempre que ocorreram posturas, os ovos foram recolhidos com o auxílio de uma rede de 250 µm e transferidos para um recipiente de 5 L com água oriunda do tanque de postura, garantindo as mesmas condições ambientais. A separação entre os ovos viáveis dos não viáveis foi efetuada através do método de decantação. Este processo consiste em manter os ovos durante meia hora sem arejamento e, como a fração viável flutua, separa-se da fração inviável, que se deposita no fundo. Após a separação, cada fração, viável e inviável, foi pesada com o auxílio de uma balança (Sartorius modelo Pro-11, precisão de 1 µg). A taxa de viabilidade foi calculada com base no peso da fração de ovos viáveis (Taxa de viabilidade = $100 \times \text{peso total de ovos viáveis} / \text{peso total da postura}$).

A cada postura (n = 62), foram recolhidas amostras da porção de ovos viáveis para observação do estado de desenvolvimento embrionário (30 ovos por postura); determinação do diâmetro (20 ovos por postura), medido com auxílio de uma lupa e uma ocular micrométrica; e peso seco, em triplicata (30 ovos por réplica, 90 ovos por postura). O peso seco dos ovos foi determinado após liofilização (liofilizador RVT 400, Savant, NY) das amostras e posterior pesagem, com o auxílio de balança (Sartorius Pro 11; com uma precisão de 1 µg).

Para a determinação da taxa de eclosão, de cada postura foram recolhidos 90 ovos viáveis, os quais foram divididos em três grupos (réplicas) e incubados à mesma temperatura em que ocorreu a postura em copos de 100 mL, construídos em rede de 500 µm, e colocados a flutuar num tanque de incubação de ovos de 200 L. Ao fim de 24 h, foi possível determinar a percentagem dos ovos eclodidos, pela contagem do número de larvas presentes em cada copo.

Larvas

Após a eclosão de cada amostra, foi registrado o comprimento total das larvas recém-eclodidas (20 larvas por postura), com auxílio de uma lupa e uma ocular micrométrica. Posteriormente, foi determinado o peso seco da mesma amostra de larvas, conforme procedimento descrito acima para os ovos.

Catepsinas

Para determinação da atividade das catepsinas B e D, foram recolhidos 200 mg de ovos (viáveis e inviáveis) (de acordo com metodologia proposta por CARNEVALI *et al.*, 2001) de todas as posturas, os quais foram conservados em nitrogênio, após lavagem com água destilada, para posterior análise. No final da época de postura, foram selecionadas as amostras para análise. Para esta seleção, foram considerados os seguintes pressupostos: os ovos viáveis estarem no mesmo estado de desenvolvimento embrionário (blástula, dado que é o estado no qual são recolhidos os ovos no coletor exterior dos tanques) e a taxa de eclosão dos ovos viáveis da postura do qual a amostra foi obtida ter sido de 100%. Nestas condições, foram analisadas amostras de ovos (viáveis e inviáveis) de 11 posturas (2 do tratamento DC e 9 do tratamento DE). A atividade das catepsinas foi quantificada apenas em ovos na fase de desenvolvimento embrionário blástula para que os valores obtidos fossem comparáveis, uma vez que LACOUÉ-LABARTHE *et al.* (2010) referem que a evolução da atividade das catepsinas varia com o estado de desenvolvimento dos ovos.

A determinação dos níveis de atividade das catepsinas foi adaptado do protocolo estabelecido por CARNEVALI *et al.* (2008).

Ensaio do desenvolvimento larval até à abertura de boca

Foi avaliado o efeito da dieta no desenvolvimento larval até à abertura da boca (fim da alimentação endógena). Para tal, foram utilizadas duas posturas, uma de cada tratamento (DE e DC), obtidas no mesmo dia. Os ovos (estado de desenvolvimento embrionário gástrula) foram colocados em tanques cilíndrico-cônicos de 200 L, com arejamento e renovação de água de 30 L h⁻¹, a uma densidade de 43 g 200 L⁻¹, mantidos a uma temperatura controlada de 16 ± 1 °C e salinidade

de 35. Neste ensaio, também foi avaliada a taxa de eclosão e o diâmetro médio dos ovos (20 ovos) de acordo com o procedimento previamente descrito. Foi ainda registrado o tempo que demorou a ocorrer a eclosão dos ovos em cada tratamento (DE e DC).

O desenvolvimento larval prosseguiu no circuito onde foram incubados os ovos e nas mesmas condições. Foi obtido o comprimento total e o peso seco das larvas ($n = 20$) para cada dia após a eclosão, até à abertura da boca. Para determinar o comprimento total das larvas, foi utilizada uma lupa Nikon SMZ1000; a medição das larvas foi realizada após fotografia, com recurso ao software de análise de imagem da máquina fotográfica Nikon DS-L3. Para determinar o peso seco total das larvas, estas foram previamente lavadas com água destilada, para remover o sal, e liofilizadas em liofilizador (RVT 400, Savant, NY), sendo o peso seco registrado em balança (Sartorius Pro 11) com precisão de 1 µg.

Análise estatística

Foi confirmada a normalidade e homogeneidade da variância dos dados por meio dos testes de Kolgomorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Para a comparação das médias das taxas de viabilidade e eclosão, diâmetro dos ovos, comprimento das larvas, peso seco de ovos e larvas e níveis de catepsinas, foi realizado um teste T simples. Os dados em percentagem foram transformados em arcoseno (ZAR, 1996). Consideraram-se estatisticamente significativos os testes cujo valor p foi igual ou inferior a 0,05

($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico, SPSS (versão 20.0®, IBM, USA).

RESULTADOS

Durante o período de estudo, a temperatura da água nos tanques dos reprodutores variou entre 9,8 e 21,8°C (média $18,1 \pm 0,7$ °C). O nível de oxigênio dissolvido variou entre 5,3 - 6,7 mg L⁻¹ e o nível de saturação de oxigênio variou entre 100 e 118%.

Foram recolhidas, de outubro a janeiro, um total de 62 posturas, das quais 47 provenientes dos reprodutores do tratamento DE e 15 provenientes do tratamento DC. Os reprodutores do tratamento DE apresentaram uma frequência de posturas mais regular, quando comparados com o tratamento DC (Tabela 3). O período de posturas foi mais extenso para os linguados alimentados com a dieta do tratamento DE, no qual foram observadas posturas desde o início de outubro de 2011 até ao final de janeiro de 2012. No tratamento DC, as posturas ocorreram desde meados de outubro até meados de dezembro de 2011. A frequência de posturas também foi superior para os peixes alimentados com a dieta do tratamento DE.

O peso médio das posturas, o diâmetro e a taxa de viabilidade dos ovos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Por outro lado, a taxa de eclosão foi significativamente superior no tratamento DE, enquanto o peso seco dos ovos viáveis foi significativamente superior no tratamento DC (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros referentes aos ovos e larvas de *Solea senegalensis*, provenientes de reprodutores alimentados com a dieta controle (DC) e dieta enriquecida (DE). Média $\pm$ desvio padrão; m = mínimo e M = máximo.

Parâmetros	Tratamento DC	Tratamento DE
Número de posturas	15	47
Peso total de ovos obtidos (g)	2091	6325
Peso médio das posturas (g) (m-M)	147,80 $\pm$ 25,50 (30-443)	134,60 $\pm$ 6,70 (30-258)
Taxa de viabilidade	98,15 $\pm$ 4,58 ^a	97,35 $\pm$ 5,41 ^a
Taxa de eclosão média (%)	79,10 $\pm$ 18,79 ^b	85,05 $\pm$ 13,44 ^a
Diâmetro ovos viáveis (mm)	0,98 $\pm$ 0,02 ^a	0,96 $\pm$ 0,03 ^a
Peso seco ovos viáveis (µg)	49,90 $\pm$ 5,06 ^a	41,79 $\pm$ 5,06 ^b
Comprimento larvas 0 DAE (mm)	2,09 $\pm$ 0,31 ^a	2,00 $\pm$ 0,27 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (teste T simples; $p < 0,05$).

Os valores de atividade da catepsina B e D nos ovos provenientes dos tratamentos DC e DE apresentaram níveis elevados nos ovos inviáveis

comparativamente com os ovos viáveis, sendo estas diferenças significativas no tratamento DE para a catepsina D (Tabela 4).

Tabela 4. Média ($\pm$ desvio padrão) da atividade das catepsinas B e D (U mg^{-1}) nos ovos (viáveis e inviáveis) de *Solea senegalensis* nos dois tratamentos: DE = Dieta enriquecida (ovos provenientes de nove posturas) e DC = Dieta controle (ovos provenientes de duas posturas).

	Catepsina B (U mg^{-1})		Catepsina D (U mg^{-1})	
	Tratamento DC	Tratamento DE	Tratamento DC	Tratamento DE
Ovos Viáveis	162,29 $\pm$ 75,88 ^a	10,35 $\pm$ 9,74 ^a	54,69 $\pm$ 58,37 ^a	5,56 $\pm$ 6,57 ^b
Ovos Inviáveis	199,04 $\pm$ 93,10 ^a	27,37 $\pm$ 31,04 ^a	624,71 $\pm$ 666,74 ^a	45,60 $\pm$ 28,95 ^a

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (teste T simples; $p < 0,05$).

Durante o ensaio específico de incubação dos ovos de ambos os tratamentos à mesma temperatura e acompanhamento do cultivo larval até à abertura da boca das larvas, verificou-se que os ovos do tratamento DE eclodiram 12 horas após a postura, com uma taxa de eclosão média de 86,67 $\pm$ 5,77%, enquanto os ovos do tratamento DC levaram 24 horas para eclodir, tendo sido a média da taxa de eclosão de 64,44 $\pm$ 3,85%. Não

foram observadas diferenças entre a média dos diâmetros dos ovos dos tratamentos DE (0,96 $\pm$ 0,03 mm) e DC (0,98 $\pm$ 0,02 mm) (Figura 1).

Durante o período desde a eclosão até à abertura da boca (3 DAE), as larvas do tratamento DC apresentaram um comprimento total significativamente superior em relação às larvas do tratamento DE (Figura 1) ($p < 0,05$).

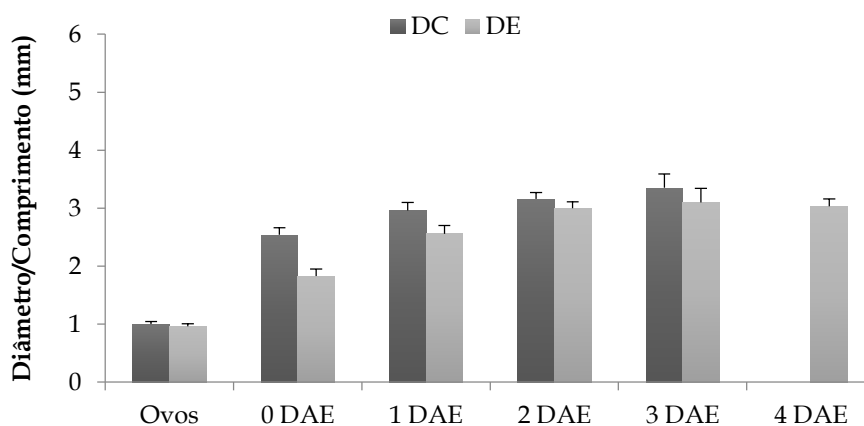


Figura 1. Diâmetro dos ovos (mm) de *Solea senegalensis* e evolução dos comprimentos (mm) das larvas após a eclosão (DAE) até à abertura da boca, provenientes dos tratamentos DC (dieta controle) e DE (dieta enriquecida). Valores apresentados como médias $\pm$ desvio padrão. (A abertura da boca ocorreu aos 3 DAE, para o tratamento DC, e após 4 DAE, para o tratamento DE).

O valor médio do peso seco dos ovos provenientes do tratamento DC (47 $\pm$ 4,0 μg) foi significativamente superior ao peso médio dos ovos do tratamento DE (40 $\pm$ 0,5 μg). As larvas originárias do tratamento DC e DE

apresentaram peso seco semelhante até à abertura de boca (Figura 2). Contudo, as larvas do tratamento DC abriram a boca após 3 DAE, enquanto as larvas do tratamento DE, após 4 DAE.

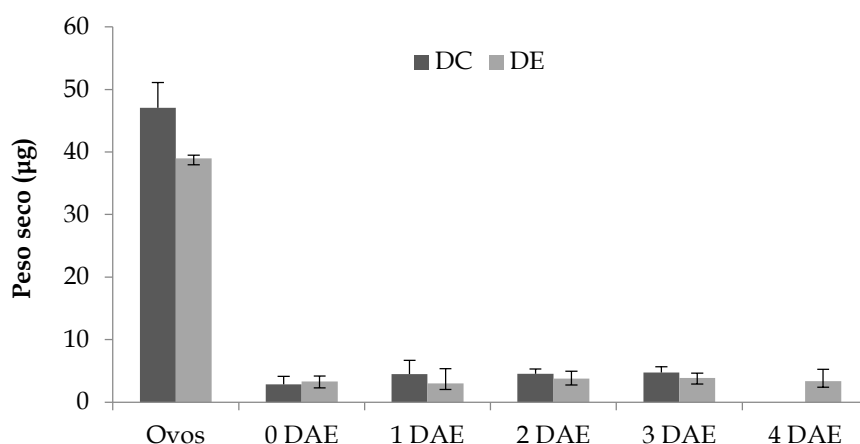


Figura 2. Peso seco (μg) de ovos de *Solea senegalensis* provenientes de cada tratamento (DC = dieta controle e DE = dieta enriquecida) e média diária do peso seco das larvas após a eclosão (DAE) até a abertura da boca. Valores apresentados com médias $\pm$ desvio padrão. (A abertura da boca ocorreu aos 3 DAE, para o tratamento DC, e após 4 DAE, para o tratamento DE).

DISCUSSÃO

As posturas dos reprodutores de linguado ocorreram durante o período do ano em que a temperatura da água foi considerada adequada para esta espécie (DINIS *et al.*, 1999), uma vez que a emissão de ovos é influenciada por fatores abióticos. Segundo DINIS *et al.* (1999) a emissão de ovos é interrompida a valores inferiores a 16 °C, enquanto valores superiores a 21 °C afetam negativamente a qualidade dos gametas, aumentando a probabilidade da ocorrência de ovos inviáveis (LE FRANÇOIS *et al.*, 2010).

As dietas utilizadas no ensaio, para a alimentação dos dois lotes de reprodutores, possuíam níveis semelhantes de proteína (aproximadamente 58%) e diferentes níveis de lipídeos. O fato de se ter observado 32 posturas a mais nos peixes alimentados com a dieta enriquecida com lipídeos, em relação ao alimento controle (47 posturas no tratamento DE *versus* 15 posturas no tratamento DC), sugere que o maior teor lipídico da dieta favoreceu/estimulou o desenvolvimento das gônadas, melhorando as condições fisiológicas para a reprodução dos peixes. Está descrito na literatura que dietas ricas em lipídeos favorecem a fluidez do esperma durante a reprodução, dando resistência aos efeitos osmóticos durante a sua libertação na água, sendo os principais fatores de sucesso na reprodução e sobrevivência da prole

(LAHNSTEINER *et al.*, 2008), sendo também decisiva para o sucesso do desenvolvimento dos ovos, com implicações no desenvolvimento do tecido neural das larvas, retina, nervo óptico e estruturas relacionadas com os órgãos de sentido na maioria das espécies marinhas (SARGENT, 1995; LUND *et al.*, 2008). FERNÁNDEZ-PALACIOS e IZQUIERDO (2009) afirmam que, em algumas espécies marinhas como a dourada (*S. aurata*) e o pargo japonês (*Pargus pargus*), a otimização da composição interna dos ovos é diretamente afetada pela dieta ingerida pelos reprodutores, mesmo que esta seja oferecida em períodos curtos antes das posturas. Assim, uma dieta enriquecida em lipídeos, como a do tratamento DE, poderá contribuir para a otimização da composição das gônadas e, consequentemente, dos ovos de linguado.

A dieta não afetou o peso médio das posturas, diâmetro dos ovos nem a taxa de viabilidade. Foram observadas taxas de eclosão superiores em posturas provenientes de reprodutores alimentados com a dieta enriquecida (DE), o que vem de encontro aos resultados obtidos por (IZQUIERDO *et al.*, 2001) e por (CARNEVALI *et al.*, 2001), que indicam que a alimentação de reprodutores com dietas ricas em lipídeos influencia a composição proteica do saco vitelínico das larvas, aumentando a taxa de eclosão e sobrevivência das larvas em robalo (*D. labrax*). O

peso seco superior dos ovos provenientes do tratamento DC pode estar relacionado com o fato de se terem obtido menor quantidade de posturas neste tratamento quando comparado com o tratamento DE. Assim, a obtenção de um maior número de posturas num período mais longo, levou a um maior consumo de reservas energéticas que, possivelmente, originaram ovos de menor peso (BONISŁAWSKA *et al.*, 2001). A diminuição do diâmetro dos ovos ao longo da época de postura já foi reportada para esta espécie (DINIS *et al.*, 1999) e para *Solea vulgaris* (BAYNES *et al.*, 1993).

A catepsina B apresentou níveis de atividade ligeiramente mais altos nos ovos inviáveis do que nos ovos viáveis em ambos os tratamentos, embora as diferenças não tenham sido significativas. Estes resultados vêm de encontro ao observado por CARNEVALI *et al.* (2001), onde, muito embora a atividade da catepsina B tenha sido visível em todos os estados de desenvolvimento embrionário em ovos de robalo, os níveis de atividade da catepsina B foram superiores nos ovos inviáveis quando comparados com os ovos viáveis no estado de blástula, porém, não sendo significativas as diferenças encontradas. A catepsina B é indicada como a responsável pela segunda clivagem proteolítica de proteínas de vitelo, sendo visível em ovos inviáveis e durante todos os estados de desenvolvimento embrionário dos ovos viáveis CARNEVALI *et al.* (2001), o que pode justificar a inexistência das diferenças significativas encontradas entre os ovos viáveis e inviáveis. Desta forma, a catepsina B não parece ser um bom indicador para a qualidade dos ovos.

Os níveis de atividade da catepsina D registrados nos ovos inviáveis do tratamento DE foram significativamente mais elevados que nos ovos viáveis. Estes resultados estão de acordo ao referido por CARNEVALI *et al.* (1999) para dourada e robalo (CARNEVALI *et al.*, 2001). Isto provavelmente ocorre pelo fato da catepsina D se encontrar em muitos tipos de células e estar envolvida no processo apoptótico, o qual aumenta no processo de eliminação das células danificadas existentes nos ovos inviáveis. Nos ovos viáveis, esta catepsina é importante para o desenvolvimento embrionário, uma vez que está envolvida na eliminação do tecido larval

durante a metamorfose (CARNEVALI *et al.*, 1999). A catepsina D tem sido considerada um biomarcador na qualidade dos ovos (CARNEVALI *et al.*, 1999; 2001) em várias espécies de peixes marinhos (CARNEVALI *et al.*, 2006), sendo a sua presença vital para o desenvolvimento embrionário (LAHNSTEINER *et al.*, 2008). No entanto o reduzido número de amostras analisadas e a grande variabilidade dos resultados obtidos neste estudo, não nos permite dizer, para o caso do linguado, se a presença desta catepsina só por si pode ser usada como indicador para a qualidade dos ovos.

Poucos são os estudos que observam os efeitos de alterações da dieta dos reprodutores nas larvas. Durante o ensaio específico para avaliação do desenvolvimento larval de ambos tratamentos, em que estiveram expostos às mesmas condições de cultivo, verificaram-se diferenças significativas, relativamente ao período de tempo que os ovos levaram a eclodir, sendo que as larvas do tratamento DC levaram 12 h a mais para eclodir do que as larvas do tratamento DE. O tempo de eclosão encontra-se dentro do normal para a espécie pois, segundo (FERNÁNDEZ-PALACIOS e IZQUIERDO, 2009), os ovos de linguados podem levar até 42 h para eclodirem a 19 °C, que é considerada a temperatura ideal para o desenvolvimento larval.

O valor médio do peso seco dos ovos de *S. senegalensis* foi superior no tratamento DC, apresentando também as larvas maior comprimento até à abertura da boca. Este resultado vem de encontro ao observado por DINIS *et al.* (1999) para esta espécie, onde ovos de maior peso originam larvas de maior comprimento. No entanto, a melhor taxa de eclosão foi verificada nos ovos provenientes do tratamento DE, de peso seco inferior. Este fato pode estar relacionado com o observado por IZQUIERDO *et al.* (2001), onde um melhoramento na qualidade nutricional da dieta dos reprodutores conduz ao aumento da qualidade dos ovos. Por outro lado, se os reprodutores forem mantidos em condições favoráveis, um maior diâmetro/peso dos ovos obtidos não é um fator determinante na qualidade dos mesmos (DINIS *et al.*, 1999), podendo ovos menores apresentar melhores taxas de eclosão. A abertura da boca das larvas mais tardia (4 DAE) observada no

tratamento DE pode favorecer o desenvolvimento larval, podendo ser vantajoso para a produção de larvas de melhor qualidade. A abertura da boca das larvas mais tardia permite que, estruturalmente e em termos enzimáticos, a larva esteja mais desenvolvida, acedendo e digerindo mais facilmente o alimento vivo fornecido. De acordo com vários autores (SARGENT, 1995; IZQUIERDO *et al.*, 2001) a composição da dieta tem grande impacto na qualidade dos ovos e larvas, o que, neste trabalho, foi comprovado pelo maior número de posturas e taxas de eclosão dos ovos superiores, obtidas dos reprodutores alimentados com a dieta do tratamento DE, mais rica em lipídeos.

CONCLUSÕES

A dieta enriquecida com lipídeos, fornecida a reprodutores de *S. senegalensis*, afetou positivamente a sua performance reprodutiva, uma vez que proporcionou a ocorrência de um maior número de posturas, com taxas de eclosão superiores, aspectos muito valorizados no setor produtivo, pois proporcionam uma maior flexibilidade na gestão da produção e valorização econômica.

Quanto aos níveis de atividade das catepsinas B e D, os resultados não foram conclusivos devido ao pequeno número de amostras avaliadas e à grande variabilidade observada. Assim, estudos posteriores devem ser realizados para determinar se as catepsinas podem ser utilizadas como bioindicadores da qualidade dos ovos para esta espécie.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro pelo projecto da FCT-EFARFISH (PTDC/MAR/67017/2006), FCT-“Programa Ciência 2008”, IPAD - Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento e ao Aquagroup (CCMAR), por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização de algumas análises.

REFERÊNCIAS

- BEIRÃO, J.; SOARES, F.; HERRÁEZ, M.P.; DINIS, M.T.; CABRITA E. 2009 Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theriogenology*, 72(9): 1251-1261.
- BAYNES, S.M.; HOWELL, B.R.; BEARD, T.W. 1993 A review of egg production by captive sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture and Fish Management*, 24(2): 171-180.
- BONISŁAWSKA, M.; FORMICKI, K.; KORZELECKA-ORKISZ, A.; WINNICKI, A.; 2001 Fish egg size variability: biological significance, *Ejpa*, 4(2): 1-2.
- BROMAGE, N. 1995 Broodstock management and seed quality - general considerations. In: BROMAGE, N. e ROBERTS, R.J. (eds), *Broodstock Management and egg and larval quality*. Blackwell science. Oxford, UK. 118p.
- BROOKS, S.; TYLER, C.R.; CARNEVALI, O.; COWARD, K.; SUMPTER, J.P. 1997 Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene*, 201(1-2): 45-54.
- CABRITA, E.; SOARES, F.; DINIS, M.T. 2006 Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture*, 261(3): 967-975.
- CARNEVALI, O.; CENTONZE, F.; BROOKS, S.; MAROTA, I.; SUMPTER, J.P. 1999 Molecular cloning and expression of ovarian cathepsin D in seabream, *Sparus aurata*. *Biology of Reproduction*, 61(3): 785-791.
- CARNEVALI, O.; MOSCONI, G.; CAMBI, A.; RIDOLFI, S.; ZANUY, S.; POLZONETTI-MAGNI, A.M. 2001 Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. *Aquaculture*, 202(3-4): 249-256.
- CARNEVALI, O.; CIONNA, C.; TOSTI, L.; LUBZENS, E.; MARADONNA, F. 2006 Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 146(3): 195-203.
- CARNEVALI, O.; CIONNA, C.; TOSTI, L.; CERDA, J.; GIOACCHINI, G. 2008 Changes in cathepsin gene expression and relative enzymatic activity during gilthead sea bream oogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, 75(1): 97-104.
- EUROPEAN COMMISSION, 2012 *Facts and figures on the Common Fisheries Policy: basic statistical data*. Facts and figures on the CFP. Fisheries. 48p.

- DINIS, M.T.; RIBEIRO, L.; SOARES, F.; SARASQUETE, C. 1999 A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176(1-2): 27-38.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. e IZQUIERDO, M.S. 2009 Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta. In: ESTÉVEZ, M.A.C. *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Madrid. p.338-400.
- FU, Y.H.; NISHINAKA, T.; YOKOYAMA, K.; CHIU, R. 1998 A retinoblastoma susceptibility gene product RB, targeting protease is regulated through the cell cycle. *FEBS Letters*, 421: 89-93.
- HOWELL, B.; PRICKET, R.; CAÑAVATE, P.; MAÑANÓS, E.; DINIS, M.T.; CONCEIÇÃO, L.; VALENTE, L.M.P. 2011 Sole farming: there or thereabouts! A report of the 5th Workshop on the Cultivation of Soles. *Aquaculture Europe*, 36: 42-45.
- IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; TACON A.G.J. 2001 Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197(1-4): 25-42.
- KUBTIZA, F. 1999 Nutrição e Alimentação de Tilápias - Parte 2. *Panorama da Aquicultura*, 9: 41-49.
- LACOUÉ-LABARTHE, T.; LE BIHAN, E.; BORG, D.; KOUETA, N.; BUSTAMANTE, P. 2010 Acid phosphatase and cathepsin activity in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: the effects of Ag, Cd, and Cu exposure *ICES Journal of Marine Science*, 67(7): 1517-1523.
- LAHNSTEINER, F.; SOARES, F.; RIBEIRO, M.; DINIS, M.T. 2008 Egg Quality Determination. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁREZ, M.P. (eds) *Teleost Fish Methods In Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. CRC Press (Taylor and Francis). p.149-180.
- LUND, I.; STEENFELDT, S.J.; SUHR K.I.; HANSEN, B.W. 2008 A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture Nutrition*, 14(6): 544-555.
- LE FRANÇOIS, N.R.; JOBLING, M.; CARTER, C.; BLIER, P.U.; SAVOIE, A. 2010 *Finfish aquaculture diversification*. SPI, Pondicherry, India. 51: 681p.
- MORAIS, S.; CANDEIAS MENDES, A.; CASTANHEIRA, M.F.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N.; DIAS, J.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; POUSÃO-FERREIRA, P. 2014 New formulated diets for *Solea senegalensis* broodstock: effects of parental nutrition on biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids and performance of early larval stages and juvenile fish. *Aquaculture*, 432: 374-382.
- SALZE, G.; TOCHER, D.R.; ROY, W.J.; ROBERTSON, D.R. 2005 Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipid in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research*, 36(15): 1488-1499.
- SARASQUETE, J.M.A.C. 2005 *Atlas histológico del Lenguado senegalés Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 18: 184p.
- SARGENT, J. 1995 Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: BROMAGE, N.R. e ROBERTS, R.J. (eds) *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science Ltd., Oxford, U.K. p.353-372.
- TINGAUD-SEQUEIRA, A.; CARNEVALI, O.; JOAN CERDÀ, J. 2010 Cathepsin B differential expression and enzyme processing and activity during *Fundulus heteroclitus* embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 158(2): 221-228.
- ULIANA, O.; SILVA, J.H.S.; NETO, J.R.; 2001 Diferentes fontes de lipídios testadas na criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), pisces, pimelodidae. *Ciência Rural*, 31(1): 129-133.
- ZAR, J.H., 1996 Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 3ª Edição. 718p.